



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

DISTRIBUCIÓN, AMENAZAS Y ESTRUCTURA
GENÉTICA DE LA RANA DE PATAS ROJAS
(*Rana draytonii*) EN BAJA CALIFORNIA

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Ecología de Zonas Áridas)

Presenta

ANNY PERALTA GARCÍA

La Paz, Baja California Sur, Febrero de 2017.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 3 del Mes de Enero del 2017, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Distribución, amenazas y estructura genética de la rana de patas rojas (*Rana draytonii*) en Baja California"

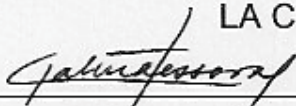
Presentada por el alumno:

Anny Peralta García

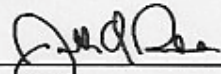
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Ecología de Zonas Áridas

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

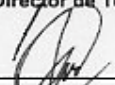
LA COMISIÓN REVISORA



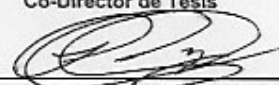
Dra. Patricia Galina Tessaro
Co-Director de Tesis



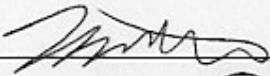
Dr. Jonathan Richmond
Co-Director de Tesis



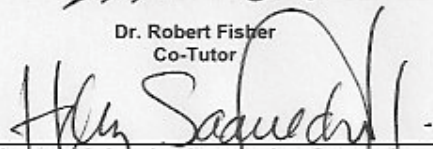
Dr. Gorgonio Ruiz Campos
Co-Tutor



Dr. Pedro Cruz Hernández
Co-Tutor



Dr. Robert Fisher
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Patricia Galina Tessaro

Co-Director

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

Dr. Jonathan Richmond

Co-Director

US Geological Survey, Western Ecological Research Center.

Dr. Gorgonio Ruiz Campos

Co-Tutor

Universidad Autónoma de Baja California.

Dr. Pedro Cruz Hernández

Co-Tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

Dr. Robert Fisher

Co-Tutor

US Geological Survey, Western Ecological Research Center.

Comité revisor de tesis

Dra. Patricia Galina Tessaro

Dr. Jonathan Richmond

Dr. Pedro Cruz Hernández

Dr. Gorgonio Ruiz Campos

Dr. Robert Fisher

Jurado de examen de tesis

Dra. Patricia Galina Tessaro

Dr. Jonathan Richmond

Dr. Pedro Cruz Hernández

Dr. Gorgonio Ruiz Campos

Dr. Robert Fisher

Suplentes

Dr. Gustavo Arnaud

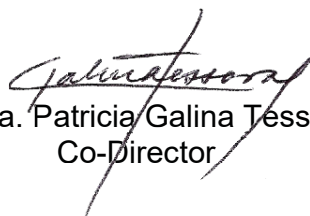
Dr. Sergio Álvarez

RESUMEN

La rana de patas rojas (*Rana draytonii*) ha sufrido severos declives a lo largo de su distribución en el oeste de Norteamérica, particularmente en el sur de California. En Estados Unidos el gobierno federal incluyó a la especie como amenazada en el Acta de Especies Amenazadas de 1970, pero la carencia de información sobre las poblaciones de Baja California no había permitido que se incluyera en normas de protección mexicanas. Para determinar el estado actual de las poblaciones de *R. draytonii* en México, se realizaron muestreos en búsqueda de la especie y se registraron amenazas para la persistencia de sus poblaciones. Durante el 2013 al 2015 se realizó trabajo de campo desde la frontera de Estados Unidos hasta la distribución sureña de la especie. *Rana draytonii* se encontró en seis de 15 sitios históricos y cuatro de 24 sitios adicionales. Los 10 sitios se encuentran ubicados en tres cuencas de la Sierra San Pedro Mártir (dos en Arroyo San Rafael, dos en el Arroyo San Telmo, y seis en el Arroyo Santo Domingo). Los muestreos indicaron que la distribución actual representa el 15% de la distribución histórica de la especie en Baja California. Sitios con *R. draytonii* mostraron valores significativamente más altos de vegetación acuática, pozas bajas y sustrato rocoso en el banco del arroyo. Modelos lineales generalizados incorporando variables ecológicas indicaron que la distancia a zonas urbanas, porcentaje de área natural, la presencia de ganadería y especies exóticas son factores importantes que afectan la ocurrencia de *R. draytonii*. Se encontraron valores zoospóricos no letales de *Batrachochytridium dendrobatidis* (*Bd*), el patógeno causante de la enfermedad de anfibios llamada quitridiomycosis en todos los sitios con *R. draytonii*, las cargas de infección tienen una correlación positiva con altitud, temporada y año de muestreo. Información genética basada en 11 microsatélites y polimorfismos de un solo nucleótido (448 a 2,303 SNPs) obtenidos mediante enzimas de restricción asociadas a secuencias de DNA indican que las poblaciones se encuentran estructuradas genéticamente por cuenca, con el arroyo Santo Domingo mostrando estructura adicional en el sitio de mayor elevación en La Grulla. La diversidad genética fue baja en todos los sitios, especialmente en La Grulla, cuya población tiene el mayor riesgo de extirpación debido a su aislamiento, disturbio de hábitat y ubicación en ambiente extremo. Santo Domingo es la población más grande y tiene la diversidad genética más alta, pero presentó valores significantes de endogamia. La diversidad genética de las poblaciones de Baja California son significativamente menores al compararse con poblaciones similares en el sur de California y en el norte de Sierra Nevada. Se recomienda la creación de hábitat para reproducción, migración asistida, monitoreo de especies exóticas y prevención de dispersión, así como realizar estudios que examinen los efectos del pastoreo (particularmente en La Grulla) para prevenir la extirpación de *R. draytonii* en Baja California.

Palabras clave: anfibios, genética, exóticos, quitridiomycosis.

Vo.Bo.


Dra. Patricia Galina Tessaro
Co-Director

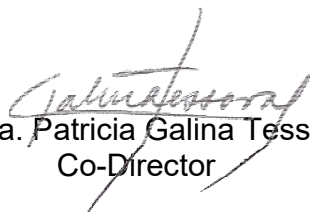

Dr. Jonathan Richmond
Co-Director

ABSTRACT

The California Red-legged Frog (*Rana draytonii*) has experienced severe population declines in many parts of its range in western North America, particularly southern California. The United States federal government has formally listed the species as threatened under the Endangered Species Act of 1970, but lack of information about the current status of *R. draytonii* in Baja California has prevented any formal listing status in Mexico. To determine the current status of *R. draytonii* populations in Mexico, we surveyed for the presence of *R. draytonii* in Baja California and assessed the most likely threats to population persistence. Field work from 2013 to 2015 extended from the U.S.-Mexico border to the southern end of the species distribution in the Sierra San Pedro Mártir. *Rana draytonii* was found at six of 15 historical sites and four of 24 additional sites. All 10 occupied sites are confined to three watersheds within the Sierra San Pedro Mártir (two sites at Arroyo San Rafael, two sites at Arroyo San Telmo, and six sites at Arroyo Santo Domingo). These surveys showed that the current distribution represents approximately 15% of the historical distribution of the species in Baja California. Sites occupied by *R. draytonii* show significantly higher amounts of aquatic vegetation, shallow ponds and rocky substrate on the stream bank. Generalized linear models (GLM) that incorporated ecological variables showed that distance to urban areas, percentage of undisturbed natural area, and presence of livestock and exotic species are significant factors influencing *R. draytonii* occurrence. Non-lethal zoospore values of *Batrachochytridium dendrobatidis* (*Bd*), the pathogen causing the amphibian disease chytridiomycosis, were detected at all survey sites, and infection loads were positively correlated with altitude, season and year. Genetic information based on 11 microsatellites and single nucleotide polymorphisms (448 to 2,303 SNPs) derived from restriction site associated DNA sequences indicate that populations are genetically structured by drainage, with the arroyo Santo Domingo showing additional structure at the highest elevation site at La Grulla. Genetic diversity was low at all sites, especially at La Grulla, which may be at high risk of extirpation due to its isolation, habitat disturbance, and more extreme environment. Santo Domingo is the largest population with the highest genetic diversity, but individuals show evidence of significant inbreeding. Genetic diversity in Baja California populations is significantly lower compared to similar, extralimital populations in southern California and the northern Sierra Nevada. Creation of breeding habitat, assisted migration, monitoring exotic species and preventing their spread, and conducting studies to examine the effects of livestock grazing (particularly at La Grulla) is recommended to prevent the extinction of *R. draytonii* in Baja California.

Key words: Amphibians, genetics, exotics, chytridiomycosis.

Vo.Bo.


Dra. Patricia Galina Tessaro
Co-Director


Dr. Jonathan Richmond
Co-Director

DEDICATORIA

A Dios por darme vida y libertad

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis no pudo haberse logrado sin la ayuda y colaboración de innumerables personas e instituciones que contribuyeron a su realización.

Al CIBNOR por recibirme como estudiante y permitirme realizar mis estudios de Posgrado.

Al CONACyT por la beca otorgada (Becario 275069, CVU 221150) durante el posgrado.

A mis padres por apoyarme en cada decisión que he tomado a lo largo de mi vida, sin importar lo loca o rara que parezca. A mi esposo Jorge H. Valdez por estar siempre a mi lado y apoyarme en todo momento. A mi hijo Santiago Valdez por darme permiso de ser estudiante al mismo tiempo de ser mamá.

A mi comité tutorial: Dra. Patricia Galina Tessaro, Dr. Jonathan Richmond, Dr. Pedro Cruz Hernández, Dr. Robert Fisher, Dr. Gorgonio Ruiz Campos por guiarme y asesorarme a lo largo del proyecto, y responder mis incontables dudas. Especialmente, al Dr. Bradford Hollingsworth por su gran apoyo a lo largo del proyecto.

Al M. en C. Gonzalo de León Girón director del Parque Nacional Sierra San Pedro Mártir (SSPM) por permitirnos acceder a La Grulla y La Encantada, así como a los guarda parques Biol. Felipe León y Biol. Elías Zavala por el apoyo con la logística en los viajes a estos sitios remotos.

A cada uno de los rancheros que me permitieron acceso a sus predios y tierras para buscar ranas en los arroyos o pozas: Rolando Arce del Rancho Agua Caliente en San Vicente; al Sr. Pibi Martorell del Rancho El Potrero y Valladares en Santo Domingo; Raúl Montes para acceder a La Jolla; a los dueños del Rancho San Antonio de Murillos, y Rancho Viejo; Christian Meling de Rancho Meling (San José); Lorenzo Acosta de Rancho El Aguajito; a “el Chileno” del Rancho Santo Tomás; Rafael Llamas del Rancho San Faustino; Marco Antonio Grijalva de Rancho El Compadre; Fortino Heredia del Rancho San Miguelito. En especial a la familia Arce Martorell (Rolando, Aide, Sinahi y Misael) por su amistad e incontables historias durante las travesías en mulas en la Sierra San Pedro Mártir... ah! y por las tortillas de harina hechas a mano y a la leña.

Al M. en C. Ivan Peraza por darnos a conocer localidades potenciales para realizar muestreos de ranas en Sierra Juárez,

A todas la personas que me acompañaron a campo: Bradford Hollingsworth, Clark Marth, Melissa Stepek, Patricia Galina, Jonathan Richmond, Adam Backlin, Liz

Gallegos, Robert Fisher, Jorge H. Valdez, Brad Shaffer, Jason Vorderstrasse, Alan Harper, Bob Mailloux, Ramón Navarro, Andrea Navarro.

A las personas que me ayudaron con los distintos análisis: al Dr. Omar Ávalos Hernández por asesoría para los modelos lineales generalizados, al Dr. Gorgonio Ruiz Campos para los análisis ecológicos, a Pamela De Grau y Diego de Dios por apoyo con R. Por apoyo de datos genéticos: Dustin Wood y Dean H. Leavitt. A Andrea Adams y Cheryl Briggs por el análisis de las muestras para detección de quitridiomycosis. A Ira Fogel por apoyo editorial.

A las instituciones que proporcionaron apoyo financiero o equipo para este proyecto: a la M. en C. Daniela López Acosta y al Dr. Gustavo Danneman de Pronatura Noroeste quienes dieron el apoyo que permitió iniciar el proyecto; Anne McEnany y Alan Harper de JiJi Foundation, a International Community Foundation, a UC Mexus grant. Al museo de Historia Natural de San Diego y US Geological Survey por préstamo de equipo.

A las siguientes instituciones por permitir utilizar sus laboratorios: Western Ecological Research Center (laboratorio de Genética), San Diego State University, Universidad Autónoma de Baja California (laboratorio de vertebrados).

A mis amigos y colegas que me apoyaron para continuar la tesis: Franco Cota y Beli Cota, Sula Vanderplank, Gonzalo de León, la familia De Dios, Salvador González, David y Damaris Romero, Fam. Valdez Villavicencio, Uri García, Carlos Flores y Abigail Corrales. Al personal del CIBNOR que siempre estuvieron para ayudar: Tania Núñez, Horacio Sandoval, Ira Fogel y Diana Dorantes.

CONTENIDO

Resumen	i
Abstract	ii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 La especie: <i>Rana draytonii</i>	4
2.2 Declive de poblaciones de la rana de patas rojas en California.....	5
2.3 Estudios en Baja California	8
2.4 Amenazas de conservación en Baja California	11
2.5 Genética y conservación	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVO GENERAL.....	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1 Trabajo de campo	20
6.1.1 Muestreos	20
6.1.2 Registro de datos ambientales y antropogénicos	22
6.1.3 Obtención de frotis de piel para detección de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	26
6.1.4 Obtención de muestras genéticas.....	26
6.2 Trabajo de laboratorio.....	28
6.2.1 Detección de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	28
6.2.2 Extracción de ADN y amplificación de marcadores genéticos	28
6.3 Análisis estadísticos	32
6.3.1 Lejanía del sitio y variables antropogénicas.....	32
6.3.2 Selección de variables ambientales para <i>Rana draytonii</i>	32
6.3.3 Impacto de las variables antropogénicas en <i>Rana draytonii</i>	33
6.3.4 Quitridiomycosis en poblaciones de anuros en el área de estudio	34
6.3.5 Quitridiomycosis en <i>Rana draytonii</i>	34
6.4 Análisis de datos genéticos	35
6.4.1 Estructura genética.	35
6.4.2 Diversidad genética.....	36
6.4.3 Endogamia	36
6.4.4 Diferenciación genética.....	37
6.4.5 Comparación con poblaciones de California.....	37

7. RESULTADOS	39
7.1 Distribución actual de <i>Rana draytonii</i>	39
7.2 Variables ambientales	43
7.3 Variables antropogénicas	45
7.3.1 Ganadería, turismo y extracción de agua	45
7.3.2 Porcentaje de área natural, distancia a poblados y a cultivos.....	47
7.3.3 Especies exóticas	48
7.3.4 Relación entre lejanía de zona urbana y amenazas antropogénicas....	50
7.3.5 Impacto de variables antropogénicas en <i>Rana draytonii</i>	52
7.4 Quitridiomicosis	57
7.4.1 En especies de anuros en el area de estudio	57
7.4.2 Quitridiomicosis en poblaciones de <i>Rana draytonii</i>	60
7.5 Análisis moleculares	63
7.5.1 Estructura genética	63
7.5.2 Variabilidad genética.....	68
7.5.3 Diferenciación genética.....	72
7.5.4 Comparación con poblaciones de California.....	74
8. DISCUSIONES	78
8.1 Distribución actual de <i>Rana draytonii</i>	78
8.2 Amenazas en el área de estudio para anuros nativos	87
8.3 Genética de poblaciones	92
9. CONCLUSIONES	102
10. LITERATURA CITADA	103
Anexos	118

Lista de figuras

- Figura 1.** Distribución de la rana de patas rojas *Rana draytonii* en California y Baja California. Se indica su distribución histórica conocida (en verde), incierta (en naranja), y actual (en negro). Para Baja California se desconoce la distribución actual. Modificado de Richmond *et al.* (2014). 6
- Figura 2.** Filogenia de *Rana draytonii* (Richmond *et al.*, 2013), y localización geográfica de las muestras utilizadas por Shaffer *et al.* (2004). Semicírculos corresponden a los dos clados mayores mostrados en la filogenia. La división entre los clados del norte y sur se localiza en la región de los Ángeles, California. La población 49 se encuentra actualmente extirpada. 7
- Figura 3.** Distribución de *Rana draytonii* en Baja California (Grismer, 2002) y registros previos a este estudio en colecciones científicas (Anexo A). 10
- Figura 4.** Esquematación del modelo “Valle-Montaña” para poblaciones de *Rana luteiventris* (Funk *et al.*, 2005). Los tamaños de los círculos representa el tamaño de las poblaciones, y el grosor de las flechas la cantidad de flujo génico entre los sitios. 15
- Figura 5.** Sitios de muestreo visitados para determinar el estado de la distribución actual de *Rana draytonii* en Baja California. Los números corresponden al Anexo B. 21
- Figura 6.** Ejemplo de obtención de la variable: porcentaje de área perturbada en el arroyo. La franja blanca corresponde al arroyo, y la franja negra a la parte del arroyo que se encuentra rodada de zonas perturbadas. 25
- Figura 7.** Ubicación geográfica de los estudios genético-poblacionales previos de *Rana draytonii*, sobre los cuales se realizó la comparación de los índices genéticos de Heterocigosidad esperada y de Heterocigosidad observada. Modificado de Richmond *et al.* (2013) 38
- Figura 8.** Distribución actual de *Rana draytonii* en Baja California. Los símbolos de círculos o cuadros abiertos (blancos) indican localidades donde la especie no fue detectada. Los símbolos de círculos o cuadros cerrados (negros) indican localidades donde fue observada. Los círculos indican localidades históricas, y los cuadrados indican sitios adicionales. 40
- Figura 9.** Estructura de intervalos de clases de talla (a) y de peso (b) de *Rana draytonii* en el noroeste de Baja California. 41
- Figura 10.** Gráfica de sedimentación para el ACP de las variables ambientales. 43
- Figura 11.** Porcentaje de presencia de actividades antropogénicas en los sitios visitados. (A): ausencia, (P): presencia de *Rana draytonii*. 46
- Figura 12.** Valores de porcentajes de área natural en los sitios visitados. (A): ausencia, (P): presencia de *Rana draytonii*. 47
- Figura 13.** Número de registros por especie en la zona de estudio, indicando previos y nuevos registros. 48

- Figura 14.** Localidades con especies exóticas acuáticas en la zona de estudio. Los círculos blancos indican registros previos, y los círculos negros indican nuevos registros..... 49
- Figura 15.** Gráfica de dispersión, mostrando la línea de tendencia y el área de desviación estándar, de la variable distancia al poblado y a) Conductividad, b) Distancia a cultivos, c) Extracción de agua, d) Impacto de ganado, e) Impacto de turismo, f) Especies exóticas, y g) Porcentaje de área natural. 50
- Figura 16.** Correlograma de variables antrópogénicas. Los valores más oscuros indican correlaciones más fuertes, valores rojos son negativas, valores azules son positivas. ArNat: porcentaje de área natural, Dicul: distancia al cultivo, DiPo: distancia al poblado, ExAg: extracción de agua, Gan: ganadería, nExt: número de especies exóticas, Tur: turismo..... 52
- Figura 17.** Gráfica de sedimentación para el análisis de componente principales para las variables antropogénicas. 53
- Figura 18.** Predicción del modelo lineal generalizado, para los valores del índice 2 y la probabilidad de presencia de *Rana draytonii*. 55
- Figura 19.** Representación geográfica de los valores obtenidos del índice de amenazas para el total de sitios visitados..... 56
- Figura 20.** Sitios muestreados para la detección de *B. dendrobatidis* en la zona de estudio. Los números de localidades corresponden al Anexo L. 58
- Figura 21.** Gráfica de dispersión, mostrando la línea de tendencia y el área de desviación estándar. a) Prevalencia contra altitud, b) Prevalencia contra distancia al poblado. El área sombreada muestra la desviación estándar..... 59
- Figura 22.** Representación gráfica del efecto de las variables año, altitud y temporada en los valores de carga zoospórica de *B. dendrobatidis* para las poblaciones de *Rana draytonii*, obtenidos del análisis de regresión utilizando un modelo binomial negativo. 62
- Figura 23.** Gráfica de la probabilidad de ajuste de los datos para un valor dado de k, utilizando microsatélites. Las flechas indican el inicio de la asíntota de la curva. 64
- Figura 24.** Estructura poblacional inferida entre las localidades de *Rana draytonii* en Baja California por STRUCTURE, basado en datos de microsatélites..... 65
- Figura 25.** Estructura poblacional inferida entre las localidades de *Rana draytonii* en Baja California por STRUCTURE, basado en datos de SNPs..... 66
- Figura 26.** Reconstrucciones filogenéticas de *Rana draytonii* en Baja California. Las topologías para ambos priors (constante y exponencial) fueron las mismas. Se muestra la topología del prior constante para la base de datos 100%..... 70
- Figura 27.** Reconstrucciones filogenéticas de *Rana draytonii* en Baja California. Las topologías para ambos priors (constante y exponencial) fueron las mismas. Se muestra la topología del prior constante para la base de datos de 70%..... 71

- Figura 28.** Gráfica de cajas y bigotes para los valores de a) Heterocigosidad observada, b) Heterocigosidad esperada, para cinco zonas dentro de la distribución de *Rana draytonii*. Baja California se muestra en gris claro. SN: Sierra Nevada, SF: San Francisco, SC: Sur de California, SCa: Sur de California poblaciones aisladas, BC: Baja California. 75
- Figura 29.** Gráfica de cajas y bigotes para los valores de a) Riqueza alélica b) Heterocigosidad observada, c) Heterocigosidad esperada, utilizando datos de 11 microsatélites. SC: Sur de California, SCa: Sur de California poblaciones aisladas, BC: Baja California..... 76
- Figura 30.** Gráfica de cajas y bigotes para los valores de a) Heterosigocidad observada, b) Heterocigosidad esperada, utilizando 1,889 SNPs. SCa: Sur de California poblaciones aisladas, BC: Baja California (en color gris)..... 77

Lista de tablas

Tabla I. Variables ambientales y antropogénicas.	22
Tabla II. Muestras de tejido de <i>Rana draytonii</i> utilizadas para los análisis moleculares. Las localidades corresponden a sitios con observaciones de <i>R. draytonii</i>	27
Tabla III. Microsatélites desarrollados para <i>R. draytonii</i> . A indica el número de alelos observados durante el estudio de Richmond <i>et al.</i> (2013).	30
Tabla IV. Información de las bases de datos utilizadas para los análisis de estructura genética de las poblaciones de Baja California, y filogenéticos. % muestras indica el porcentaje de individuos que se permitió que contuvieran datos faltantes, loci indica el número de locus con sitios variables, Pis indica el número de sitios polimórficos informativos, y unI SNPs es el número de SNPs no ligados.	31
Tabla V. Relación de localidades y número de individuos observados de <i>Rana draytonii</i> . Se indican el número de individuos capturados por edad, medidas de la longitud hocico-cloaca (LHC) y peso. Hembra (H), Macho (M), Adulto (A), subadulto (Sub), metamórfico (Met).	42
Tabla VI. Valores promedio de cada grupo y variables ambientales, y valor de P de la prueba de rangos de Wilcoxon. * indica valor significativo (<0.05).	44
Tabla VII. Valores promedio de cada grupo de las variables antropogénicas. El valor de P corresponde a la prueba de rangos de Wilcoxon entre sitios de registro de la especie.	45
Tabla VIII. Valores de R ² y significancia del análisis de regresión entre la lejanía al poblado y las variable antropogénicas.	50
Tabla IX. Componentes principales de las variables antropogénicas.	54
Tabla X. Índices obtenidos mediante el ACP de las variables antropogénicas y los porcentajes de cada variable incluida para cada índice.	54
Tabla XI. Especies muestreadas para detección de <i>B. dendrobatidis</i> en la zona de estudio. Se indica el tamaño de muestra, la prevalencia (%), el valor promedio zoospórico (ZE), la desviación estándar (D.E.) y los sitios de muestreo correspondientes al Anexo L.	57
Tabla XII. Datos de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en poblaciones de <i>Rana draytonii</i> . Se indica el tamaño de muestra (n), prevalencia (%), valor zoopórico medio (ZE), desviación estándar (D.E) y valor de significancia (p) para la prueba de rangos de Kruskal-Wallis.	61
Tabla XIII. Resultados del modelo de regresión lineal generalizado para los datos de quitridiomycosis en poblaciones de <i>Rana draytonii</i> en Baja California.	61
Tabla XIV. Número de poblaciones seleccionadas en base al análisis de STRUCTURE para cada base de datos. + indica que el resto de las localidades	

se agrupan en una sola población, * indica que la población presenta mezcla de genes de otras poblaciones. Potr: El Potrero, Vall: Valladares, Canas: La Canastilla. 67

Tabla XV. Índices de diversidad genética para poblaciones de Baja California. N: número de muestra, PAr: Alelos privados por rarefacción, Ar: riqueza alélicas por rarefacción, Ho: heterocigosidad observada, He: heterocigosidad esperada, Gis: coeficiente de endogamia. 72

Tabla XVI. Valores de Fst entre cada par de localidades de *Rana draytonii* en Baja California. Sobre la diagonal se indican los valores de Fst, bajo la diagonal el nivel de significancia (en negritas se indica significancia $p \leq 0.05$). 73

1. INTRODUCCIÓN

Existen diversas evidencias a nivel mundial que indican una tendencia en el declive en las poblaciones de anfibios debido principalmente a la pérdida y degradación de hábitat, principal factor que impulsa esta tendencia (IUCN, 2016). Este declive representa una pérdida masiva de biodiversidad global y de indicadores biológicos de la calidad ambiental. Basada en la evaluación de la conservación de anfibios realizada por la Unión Internacional de la Conservación de la Naturaleza (UICN ó IUCN siglas en inglés) en el 2008, pone de manifiesto que una tercera parte (32%) de las especies de anfibios a nivel mundial se encontraban en peligro o extintas, y que además un 25% carecían de datos suficientes para determinar su estatus de conservación. Estos números sin duda revelan la necesidad de realizar evaluaciones del estado de poblaciones en diferentes escalas geográficas, así como el impulsar planes de conservación.

México ocupa el quinto lugar en biodiversidad de anfibios (IUCN, 2016) con un total de 376 especies, de las cuales 252 son endémicas (Parra-Olea *et al.*, 2014). Sin embargo, también ocupa el segundo lugar con más especies amenazadas (IUCN, 2016; Stuart *et al.*, 2008). Diversos estudios han documentado el declive y la posible extinción de 29 especies mexicanas a consecuencia de la destrucción, fragmentación y modificación de su hábitat (Baena *et al.*, 2008; Frías-Álvarez *et al.*, 2008; Parra-Olea *et al.*, 1999; Rovito *et al.*, 2009). Ochoa-Ochoa *et al.* (2009) demostraron que 36 especies endémicas de México han perdido más del 50% de su distribución original. A pesar de la gran riqueza de especies, se desconoce información base sobre ecología e historia natural de la mayoría de nuestra anfibio-fauna, existiendo contadas investigaciones dedicadas a cubrir estos temas y menos aún, si están siendo afectadas por la presencia de amenazas a su hábitat natural (Frías-Álvarez *et al.*, 2010).

La pérdida de hábitat también es la principal amenaza para la diversidad genética, ya que provoca una disminución de tamaños poblacionales y un aislamiento entre las poblaciones, lo que conlleva a una disminución en su

diversidad genética (Frankham *et al.*, 2002); y por ende a una pérdida en la capacidad de adaptación (Allentoft y O'Brien, 2010). Preservar el potencial adaptativo de las especies es crucial en las estrategias de conservación para contrarrestar las amenazas globales a la biodiversidad (Loo, 2011).

Las estrategias de conservación en la actualidad requieren mayor conocimiento sobre la estructura genética de las poblaciones, siendo importante saber dónde y cómo se distribuye la mayor diversidad genética (Loo *et al.*, 2011). Los estadísticos genéticos permiten medir niveles de flujo génico y migración (Brede y Beebee, 2004), asignar individuos a la población de origen (Dawson y Belkhir, 2001; Rannala y Mountain, 1997), determinar el tamaño efectivo de una población (Driscoll, 1999; Seppä y Laurila, 1999), y detectar evidencia de cuellos de botella mediante distorsiones de frecuencias alélicas (Jehle *et al.*, 2001; Luikart *et al.*, 1998). La determinación del número de poblaciones, su variabilidad genética y conectividad es esencial en los programas de conservación y el adecuado manejo de las especies (Beebee, 2005; Frías-Álvarez *et al.*, 2010).

El surgimiento de nuevas técnicas moleculares ha hecho más accesibles los estudios genéticos de especies amenazadas. Los microsatélites son uno de los marcadores tradicionalmente más utilizados en estudios de genética a nivel poblacional (Selkoe y Toonen, 2006). Sin embargo, la aparición de métodos de secuenciación masiva, ha provocado la aparición de nuevas técnicas, tales como las secuencias de ADN de restricción por doble digestión (ddRadSeq por sus siglas en inglés). Esta técnica permite generar múltiples marcadores nucleares, con SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) individuales detectados en lecturas cortas cercanas o entre sitios de restricciones dispersos en todo el genoma nuclear, el cual no requiere un conocimiento previo del genoma, y se obtienen a un bajo costo (Peterson *et al.*, 2012).

El presente estudio está dirigido a evaluar el estado actual de la rana de patas rojas (*Rana draytonii*) en su ámbito de distribución en Baja California. Esta especie

ha sufrido serios problemas de conservación a través de su distribución en California, lo que ha llevado a un declive de sus poblaciones y a su extirpación, principalmente en el sur de California. La pérdida de hábitat y consecuente extirpación de poblaciones ha afectado mayormente a las poblaciones periféricas, las cuales pierden conectividad con la distribución central de la especie, promoviendo la deriva génica y la pérdida de diversidad genética (USFWS 2002; Richmond *et al.*, 2013, 2014). Para las poblaciones de Baja California, el trabajo de campo determinó la distribución actual de la especie e identificó amenazas en la zona de estudio, especialmente en las poblaciones remanentes de *Rana draytonii* en Baja California. Las amenazas presentes fueron de tipo antropogénicas (presencia de ganado, extracción de agua y turismo), interacción con especies exóticas (crustáceos, peces, anfibios o reptiles) y la presencia de quitridiomycosis. El trabajo de laboratorio implicó la utilización de microsatélites y SNPs obtenidos mediante la técnica de ddRadSeq, para determinar la diversidad genética y, diferenciación genética. La información obtenida permitirá elaborar apropiados planes de manejo y conservación para la especie en México.

2. ANTECEDENTES

En la Península de Baja California se distribuyen 15 especies de anfibios nativos, existiendo únicamente estudios ecológicos para *Hyla hypochondriaca* (*Pseudacris hypochondriaca*) en Baja California Sur (González-Bernal, 2008; Luján-Molina, 2011) y filogeográficos en *Hyla hypochondriaca* (Recuero *et al.*, 2006), *Batrachoseps major* (Peralta-García, 2006) y *Anaxyrus californicus* (Lovich, 2009). Los estudios de genética de poblaciones son escasos en México, y se han enfocado en las zonas de diversidad y endemismos del centro del país, por lo que existe la necesidad de estudios sobre ecología, genética, y conservación de anfibios nativos en la península de Baja California.

2.1 La especie: *Rana draytonii*

Las ranas de esta especie son de coloración café a rojizas con pliegues dorsolaterales prominentes. Los adultos alcanzan tallas de 85 a 138 mm de longitud desde el hocico al urostilo (Jennings y Hayes, 1994). El dorso presenta manchas negras, en ocasiones con puntos blancos (Storer, 1925). La cantidad de coloración rojiza característica de la especie es variable, algunos individuos carecen de ella, y otros la presentan en el dorso y la parte ventral; pero en general sólo en la parte ventral de las extremidades traseras, de ahí su nombre común. Se alimentan principalmente de invertebrados, aunque en individuos adultos se ha reportado el consumo de vertebrados tales como la ranita del Pacífico (*Hyla hypochondriaca*) y roedores (*Peromyscus californicus* y *Microtus californicus*) (Hayes y Jennings, 2006; Hayes y Tennant, 1985).

En California *R. draytonii* utiliza una variedad de hábitats que incluyen pozas temporales, arroyos intermitentes, humedales temporales, pozas permanentes naturales y artificiales, pozas en zonas de dunas, lagunas, entre otros (USFW, 2002). Se le observa asociada principalmente con la vegetación de Sauce de arroyo (*Salix lasiolepis*), tules (*Typha* spp) y juncos (*Scirpus* spp) (Jennings y Hayes, 1994), pero también concurre en áreas carentes de vegetación (Feller y

Kleeman, 2007). Prefiere zonas profundas o aguas tranquilas a lentas (Jennings y Hayes, 1994).

Estudios de California indican que estas ranas se desplazan durante las noches de días nublados y húmedos (Bulger *et al.*, 2003; Fellers y Kleeman, 2007). Se ha observado que pueden desplazarse a una distancia de hasta 2.9 km del arroyo hasta la zona de apareamiento (Fellers y Kleeman, 2007). En temporadas secas, las ranas se mantienen cerca del agua entre la vegetación o madrigueras; aunque algunos individuos pueden incursionar a más de 100 m fuera del agua en vegetación riparia densa, aunque por lo general se mantienen dentro de una distancia de 60 m del agua (Bulger *et al.*, 2003; Fellers y Kleeman, 2007). Los juveniles son activos durante el día y la noche, mientras que los adultos son principalmente nocturnos (Hayes y Tennant, 1985), aunque el clima local puede influenciar el período de actividad (Storer, 1925).

En California la rana de patas rojas se reproducen desde finales de noviembre a finales de abril (Jennings y Hayes, 1994). Los machos se dirigen a los sitios de apareamiento de dos a cuatro semanas antes que las hembras (Storer, 1925). Posterior al amplexo, las hembras depositan entre 2,000 y 6,000 huevos entre la vegetación emergente, en zonas con corrientes lentas dentro del arroyo (Jennings y Hayes, 1994). La eclosión ocurre entre seis y 14 días dependiendo de la temperatura del agua (Jennings, 1988), y se requieren de 11 a 20 semanas para sufrir metamorfosis (Storer, 1925).

2.2 Declive de poblaciones de la rana de patas rojas en California

Históricamente, esta especie fue común a lo largo de los macizos montañosos de la costa y el centro del sur de California desde el condado de Mendocino hasta Baja California, México; con poblaciones adicionales en la Sierra Nevada (Fig. 1). Antiguamente se pensaba que la especie se distribuía en la parte norte del Gran Valle Central de California, pero estudios recientes han identificado que los especímenes recolectados en esta zona eran individuos de otra especie

(Richmond *et al.*, 2014). Lamentablemente, en las últimas décadas, se ha estimado que la especie ha desaparecido del 70% del área de su distribución histórica, y 99% de las poblaciones de la Sierra Nevada han sido extirpadas (Fig. 1). Estos declives han sido atribuidos a la introducción de especies no-nativas, pérdida de hábitat, y uso de pesticidas. Se desconoce el efecto de la introducción del hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) a poblaciones de *R. draytonii*, ya que al parecer la especie puede soportar la infección (Padgett-Flohr y Hopkings, 2009). Sin embargo, la enfermedad causada por el hongo *Bd*, se cree es responsable de declives de anfibios a nivel mundial (Daszak *et al.*, 2003).

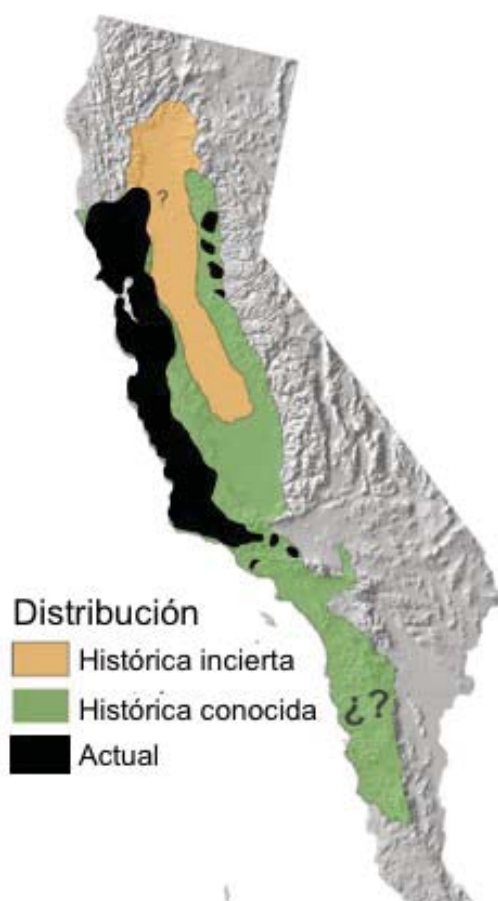


Figura 1. Distribución de la rana de patas rojas *Rana draytonii* en California y Baja California. Se indica su distribución histórica conocida (en verde), incierta (en naranja), y actual (en negro). Para Baja California se desconoce la distribución actual. Modificado de Richmond *et al.* (2014).

Estudios moleculares realizados por Shaffer *et al.* (2004) revelaron la presencia de dos linajes evolutivos dentro de *R. draytonii* (Fig. 2). El linaje sureño localizado al sur de las montañas de Santa Mónica en el condado de Los Ángeles ahora se encuentra extirpado de California, por lo que los únicos remanentes de este linaje evolutivo serían las poblaciones de Baja California, lo anterior conlleva implicaciones importantes en aspectos de conservación de linajes evolutivos y de reintroducción de especies en el Sur de California (Richmond *et al.*, 2014).

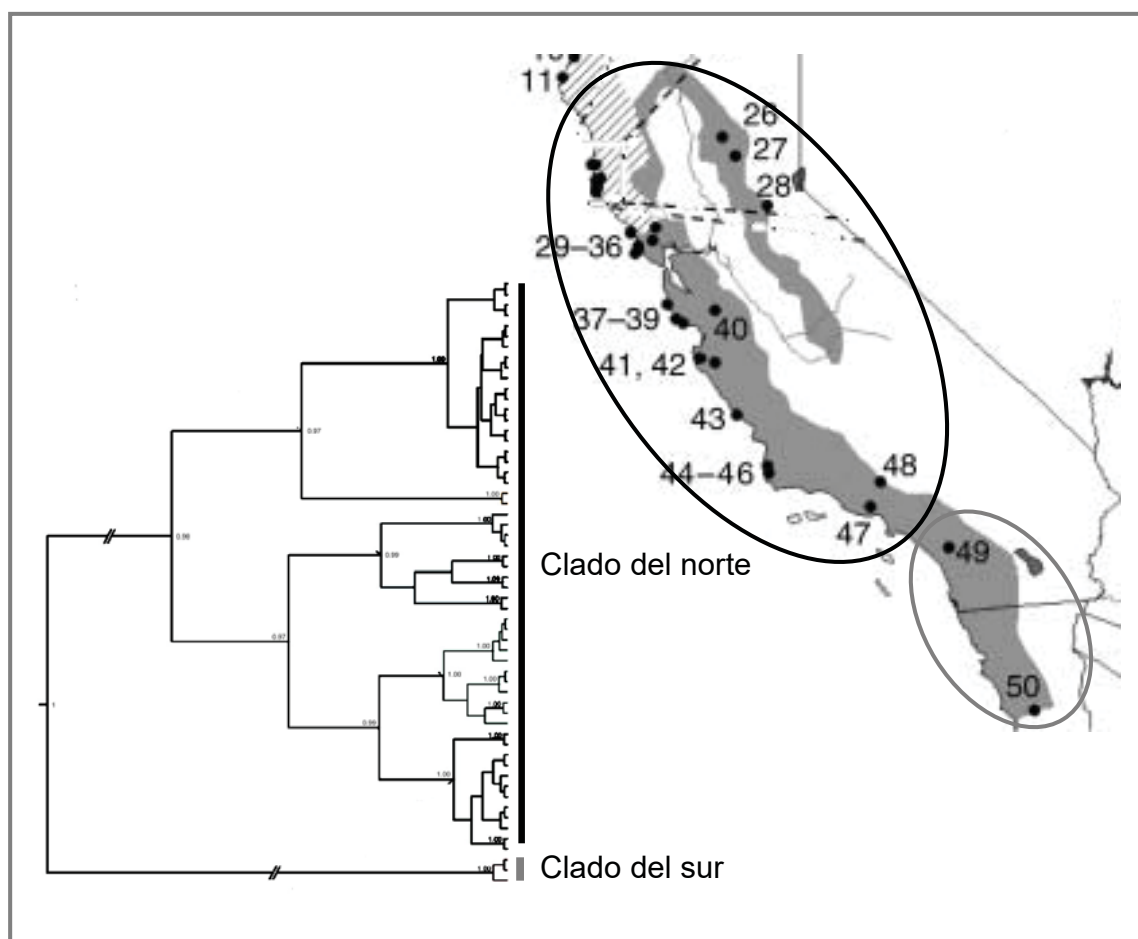


Figura 2. Filogenia de *Rana draytonii* (Richmond *et al.*, 2013), y localización geográfica de las muestras utilizadas por Shaffer *et al.* (2004). Semicírculos corresponden a los dos clados mayores mostrados en la filogenia. La división entre los clados del norte y sur se localiza en la región de los Ángeles, California. La población 49 se encuentra actualmente extirpada.

Adicionalmente, la pérdida de hábitat ha generado la existencia de poblaciones aisladas de la distribución central de la especie, tal es el caso de poblaciones en la Sierra Nevada y en la distribución sureña de la especie en California. Estudios genéticos, utilizando microsátélites en estas poblaciones indicaron una baja diversidad genética, altos valores de diferenciación genética, tamaños poblacionales bajos en comparación con poblaciones en el centro de la distribución, especialmente en las poblaciones de Sierra Nevada debido a su lejanía, sugiriendo tomar acciones de conservación para mantener la especie (Richmond *et al.*, 2013, 2014).

2.3 Estudios en Baja California

En México existen 249 registros de *R. draytonii* de localidades de Baja California, los cuales pertenecen a seis colecciones científicas de los Estados Unidos de América y que datan entre 1893 y 1978; y diez registros en una colección nacional con recolectas del 2003 al 2006 (ver Anexo A). Los registros pertenecen a 22 localidades de recolecta, de las cuales 15 se localizan en las zonas aledañas al Parque Nacional Sierra San Pedro Mártir (Fig. 3). El registro más antiguo se localiza en la colección de la Academia de Ciencias de California y data del año 1893 de la localidad "Sierra San Pedro Martir Mts, L.C.". La recolecta más reciente se encuentra en la colección Herpetológica del Laboratorio de Vertebrados de la Universidad Autónoma de Baja California y data del año 2006 de la localidad de La Grulla, Sierra San Pedro Mártir. Existen cinco artículos científicos, donde reportan la presencia de *R. draytonii* en Baja California. Welsh (1988) en un estudio eco-geográfico de Sierra San Pedro Mártir reporta a *R. draytonii* en seis localidades, mencionando que es una especie abundante en zonas riparias tanto con aguas estancadas, lentas y rápidas. Domínguez-Torres y Mellink (2003) reportan once localidades para *R. draytonii*, sin embargo debido a que no existen evidencias (i.e. fotografías o especímenes) de estos registros, se consideran dudosos. Kofta (2003) reporta ranas en el Arroyo San Telmo y Santo Domingo, sin embargo, no da detalles sobre la ubicación de las poblaciones.

Shaffer *et al.* (2004) incluye muestras del arroyo San Telmo cerca del Rancho Meling en un estudio filogenético de la especie. El estudio más reciente fue realizado por Fidenci (2004) quien fotografió ejemplares en dos de tres localidades visitadas en la cuenca de Santo Domingo a elevaciones diferentes. En relación a guías de campo, Grismer (2002) proporciona un mapa distribución de la especie que abarca desde la frontera de Estados Unidos hasta la cuenca del Santo Domingo, sin mencionar problemas de conservación. Stebbins (2003) por el contrario, trata a la especie como extirpada en Baja California con base en la carencia de registros recientes y pérdida de hábitat. Los datos existentes a la fecha sobre la distribución de *R. draytonii* en Baja California son inconsistentes debido a diferencia en las principales guías de campo de la región, ambas elaboradas por reconocidos herpetólogos, aunado a la dudosa veracidad de las observaciones de Domínguez-Torres y Mellink (2003) que carecen de evidencia sobre una correcta identificación de la especie.

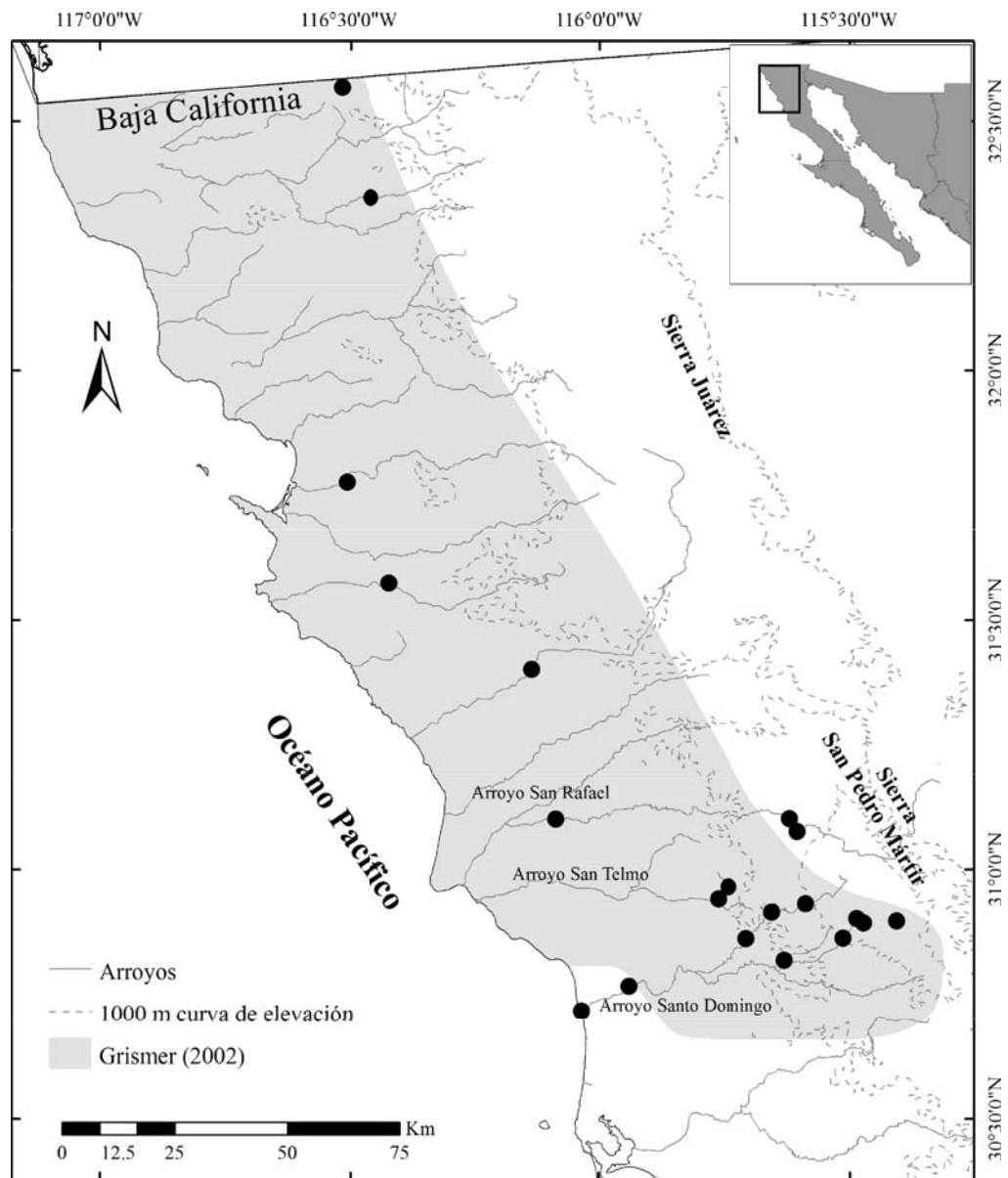


Figura 3. Distribución de *Rana draytonii* en Baja California (Grismer, 2002) y registros previos a este estudio en colecciones científicas (Anexo A).

2.4 Amenazas de conservación en Baja California

Los hábitats ribereños del noroeste de Baja California, hogar de esta especie han sido afectados por diversas actividades antropogénicas, entre ellas la introducción de especies exóticas, extracción de arena, contaminación por fertilizantes e insecticidas en zonas agrícolas, desvío del cauce de los arroyos, ganadería, y perturbación por actividades turísticas (Lovich, 2009; Ruiz-Campos *et al.*, 2012). Es conocido que la sinergia entre las amenazas aumenta su efecto negativo en las poblaciones nativas de anfibios (IUCN, 2016).

En la región mediterránea de Baja California (área de distribución de la especie), Lovich (2009) indicó que los hábitats riparios presentan serias presiones por el uso de tierra, introducción de especies exóticas, extracción de arena y otras actividades humanas. En especial, el abasto de agua para comunidades humanas ha disminuido considerablemente el hábitat disponible para anfibios nativos. La extracción de arena está afectando las poblaciones al cambiar las características físicas e hidrológicas de los arroyos, causando pérdida masiva de hábitat y una baja en la diversidad de la fauna asociada (Weeks *et al.*, 2003). En Baja California el volumen de producción minera para el rubro de arena aumentó en un 420% entre el 2006 y 2010 (SGM, 2011), cifra que muestra el grado en que esta actividad se realiza en la región.

Las especies no nativas e introducidas en un hábitat se convierten en competidoras y/o depredadoras, o bien pueden ser transmisoras de enfermedades o parásitos. En Baja California se han registrado nueve especies exóticas en la Región Mmediterránea (área de distribución de *Rana draytonii*): pez mosquito (*Gambusia affinis*), pez sol (*Lepomis cyanellus*), mojarra oreja azul (*Lepomis macrochirus*), bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), sardina maya (*Dorosoma petenense*), lobina negra (*Micropterus salmoides*), tilapia panza roja (*Tilapia zillii*), rana toro (*Lithobates catesbeianus*), y langostino rojo (*Procambarus clarkii*) (Grismer, 2002; Hernández *et al.*, 2008; Ruiz-Campos *et al.*, 2012). Tanto *G. affinis* como *L. catesbeianus* se encuentran en la lista de las 100 especies exóticas

más invasivas en el mundo debido al serio impacto que han ocasionado en la diversidad biológica (Lowe *et al.*, 2000). Como ejemplos, tenemos la disminución en la sobrevivencia de sólo el 5% en poblaciones de *R. draytonii* ante la presencia de rana toro en California (Lawler *et al.*, 1998); la posible extirpación de la rana *Lithobates yavapaiensis* en el Delta del Río Colorado ante la presencia de la rana toro (Mellink y Ferreira-Bartrina, 2000); la afectación negativa de poblaciones de la rana *Hyla hypochondriaca* ante la presencia del pez mosquito, debido al alto índice de depredación (Goodsell y Kats, 1999); la disminución del éxito reproductivo de especies nativas ante la presencia del langostino rojo *P. clarkii* (Cruz *et al.*, 2006), depredando hasta el 100% de huevos presentes de especies de anfibios nativos (Brehme *et al.*, 2006; Gamradt y Kats, 1996); la disminución de abundancia de *H. hypochondriaca*, y menor diversidad biológica ante la presencia *P. clarkii* (Riley *et al.*, 2005); y en general, alta depredación de huevos, renacuajos y juveniles por peces exóticos (Canonico *et al.*, 2005).

Las especies exóticas además han traído consigo la transmisión de enfermedades infecciosas (Frías-Álvarez *et al.*, 2010), como lo es la introducción del trematodo *Haematoloechus floedae* por rana toro en poblaciones nativas de anfibios de Yucatán (Brooks *et al.*, 2006; León-Regagnon *et al.*, 2005). Un ejemplo más relevante es el hongo quítrido *Batrachochytrium dendrobatidis* que es causante de la quitridiomycosis, enfermedad responsable en muchos casos del declive de anfibios a nivel mundial (Lips *et al.*, 2005; Mendelson III *et al.*, 2006; Skerratt *et al.*, 2007). En México ha causado declives de anfibios en el sur de país y es el posible causante de la extirpación de dos especies de ranas en el norte de Sonora (Berger *et al.*, 1998; Lips *et al.*, 2004). Este hongo ha sido detectado en poblaciones de ranas nativas de *H. hypochondriaca* en oasis de Baja California Sur en donde se registró también la presencia de la rana exótica *L. catesbeianus* (Luja-Molina, 2011).

2.5 Genética y conservación

La interacción entre la genética y la conservación se inició por la necesidad de conocer la dinámica de perturbación y pérdida de hábitats naturales con los efectos en la estructura genética de las especies, especialmente en poblaciones amenazadas (Awise, 1989; Godoy, 2009; Hedrick, 2001; Hedrick y Miller, 1992; Spielman *et al.*, 2004). Con el paso del tiempo, la genética de la conservación identificó a la endogamia y la deriva génica como los mayores riesgos para la persistencia de las especies (Frankham, 2005). Por tales razones, una de las prioridades de la Unión Internacional de la Conservación de la Naturaleza es la conservación de la diversidad genética en poblaciones pequeñas y fragmentadas (McNeely *et al.*, 1990).

La endogamia o reproducción de individuos con descendencia común, provoca un aumento en las frecuencias de homocigotos en una población, al aumentar la probabilidad de cruza entre individuos cercanamente relacionados. Los niveles de endogamia pueden aumentar debido a restricciones al flujo genético, fragmentación de poblaciones y la disminución del tamaño efectivo de una población (Frankham, 2005). Por su parte, la deriva génica o la fluctuación azarosa de frecuencias alélicas a lo largo del tiempo, conllevará a la pérdida y fijación de alelos al azar, por lo que genes adaptativos pueden perderse, y los deletéreos (aquellos que reducen la viabilidad de un individuo) se pueden fijar en una población.

Existe evidencia de que la endogamia, y la pérdida de diversidad genética aumenta el riesgo de extinción, al reducir el potencial evolutivo a largo plazo (Frankham *et al.*, 1999; Frankham, 2005). La disminución de la adecuación biológica (fitness) individual, puede reducir la tasa de sobrevivencia, reproducción o resistencia a cambios ambientales (Allentoft y O'Brien, 2010; Armbruster y Reed, 2005; Crnokrak y Roff, 1999; Keller y Waller, 2002). La diversidad genética es vital para persistencia de la especie y debe ser considerada en planes de

conservación o recuperación de especies amenazadas (Frankham *et al.*, 2002; Jamieson y Allendorf, 2012).

La implementación de planes de recuperación buscan limitar la amenaza de depresión endogámica y el potencial de la pérdida de genes adaptativos (Tallmon *et al.*, 2004). Para mantener el potencial adaptativo y minimizar el riesgo de extinción, se debe de mantener o incrementar la diversidad genética y aumentar tamaños poblaciones. La migración asistida provee una alternativa para mitigar los efectos de una baja diversidad genética mediante la transferencia de individuos de poblaciones fuente adecuados. La contribución de un sólo migrante efectivo por generación es presuntamente suficiente para aliviar los efectos de la deriva génica, reducir la depresión endogámica, y mantener la adaptación local (Wang, 2004). Sin embargo, es importante mantener las características únicas de las poblaciones naturales para evitar la depresión exogámica al mezclar linajes evolutivos independientes, o la introducción de alelos maladaptativos (Edmands, 2007). Para la efectiva implementación de acciones de recuperación por reintroducción, la conectividad de poblaciones debe de asegurarse para que la conectividad genética natural de las poblaciones se mantenga y la diversidad genética pueda ser mantenida para poblaciones futuras (Friar *et al.*, 2000).

Entre los factores antropogénicos que provocan la pérdida de la variabilidad genética y de biodiversidad, el más importante es la destrucción del hábitat (Cushman, 2006). Esta es la principal amenaza para la diversidad genética, ya que provoca una disminución de tamaños poblacionales, un aislamiento entre las poblaciones (Frankham, 2005); y por ende, como ya se mencionó a una pérdida en la capacidad de adaptación (Allentoft y O'Brien, 2010). Preservar el potencial adaptativo de las especies es crucial en las estrategias de conservación para contrarrestar las amenazas globales a la biodiversidad.

Para los anfibios, la pérdida de hábitat y la consecuente fragmentación puede tener un efecto aún más severo, debido a que los anfibios generalmente tienen

pobres capacidades de dispersión y una alta filopatría (Blaustein *et al.*, 1994; Daugherty y Sheldon, 1982; Driscoll, 1997). En el caso particular de las especies de la familia Ranidae, se ha sugerido que siguen un modelo de población denominado “valle-montaña” (Funk *et al.*, 2005). Esta estructura se caracteriza por tener poblaciones a bajas elevaciones con tamaños poblacionales históricos grandes y altos niveles de flujo génico; las poblaciones de altas elevaciones por su parte presentan tamaños efectivos de población pequeños y flujo génico menor entre sus poblaciones; el flujo génico es restringido, pero no ausente entre poblaciones de baja y alta elevación. Este modelo implica que las poblaciones de alta elevación son particularmente susceptibles a extinción, y que las poblaciones de baja elevación históricamente conectadas por dispersión y flujo génico, pero que ahora están sufriendo aislamiento por pérdida de hábitat y fragmentación podrían aumentar la tasa de extinción al disminuir el potencial de rescate que antes inferían en el resto de las poblaciones (Brown y Kodric-Brown, 1977; Funk *et al.*, 2005, Fig. 4).

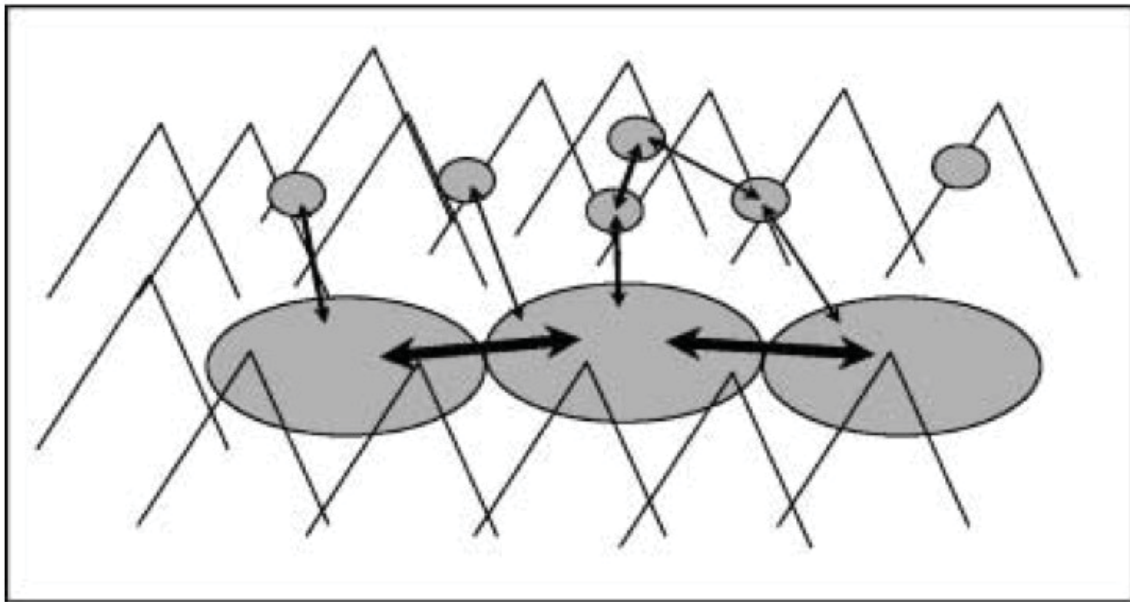


Figura 4. Esquematización del modelo “Valle-Montaña” para poblaciones de *Rana luteiventris* (Funk *et al.*, 2005). Los tamaños de los círculos representa el tamaño de las poblaciones, y el grosor de las flechas la cantidad de flujo génico entre los sitios.

La utilización de marcadores moleculares para la conservación

El surgimiento de nuevas técnicas moleculares ha hecho más accesibles los estudios genéticos de especies amenazadas. Uno de los marcadores moleculares más utilizados en los estudios de genética a nivel poblacional son los microsatélites (Selkoe y Toonen, 2006). Éstos son secuencias del ADN formadas por repeticiones en tandem (alineadas y seguidas) de un mismo motivo compuesto por un determinado número de bases, siendo los más comunes aquellos formados de dos, tres o cuatro bases (Jarne y Lagoda, 1996). Los microsatélites nucleares presentan herencia biparental, altas tasas de mutación, codominancia, altos niveles de polimorfismo y se encuentran distribuidos en todo el genoma, propiedades que los hacen ventajosos para estudios poblacionales (Hancock, 1999; Sunnucks, 2000). Sin embargo, la aparición de métodos de secuenciación masiva, ha provocado la aparición de nuevas técnicas, una de ellas es la obtención de las secuencias de ADN de restricción por doble digestión (ddRadSeq por sus siglas en inglés). La técnica ddRad ha predominado en los estudios filogeográficos y de genética de poblaciones (Chu *et al.*, 2014; Emerson *et al.*, 2010; Reitzel *et al.*, 2013). Esta metodología es considerada como una manera reproducible de generar múltiples marcadores nucleares, con SNPs individuales detectados en lecturas de SNG cortas cercanas o entre sitios de restricciones dispersos en todo el genoma nuclear, el cual no requiere un conocimiento previo del genoma, a bajo costo comparado con metodologías similares, y utilizando un menor número de muestras (Peterson *et al.*, 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

Con base en la historia de declive de poblaciones de *R. draytonii* en California, y a la presencia en Baja California de las mismas amenazas que causaron su declive en California, se considera prioritario determinar el estado actual de la especie en su ámbito de distribución mexicana. Este trabajo tiene como objetivo determinar la distribución actual, identificar las amenazas presentes en su ámbito de distribución, identificar poblaciones y grados de diferenciación entre las mismas. Para esto se utilizarán métodos ecológicos y moleculares. Los datos ecológicos proporcionarán no solo datos de línea base importantes y necesarios para cualquier investigación, también permitirá evaluar si la presencia de amenazas (i.e. especies exóticas, presencia de quitridiomycosis, actividades antropogénicas) afecta las poblaciones. Por su parte, los avances de técnicas moleculares permitirán estimar número, diferenciación, y diversidad genética de las poblaciones remanentes. Este tipo de información es base para futuras tomas de decisiones en caso de necesitar aplicar medidas de conservación y restauración en la especie (Piñero *et al.*, 2008).

4. HIPÓTESIS

1) Considerando el efecto de la pérdida de hábitat a consecuencia de actividades antropogénicas en las poblaciones de *R. draytonii* en su ámbito de distribución en California, se espera que su presencia en Baja California esté asociada a sitios menos perturbados alejados de los centros urbanos que promueven un mayor grado de amenazas (turismo, agricultura, ganadería, especies exóticas).

2) Dada la posible extirpación y fragmentación de poblaciones de *R. draytonii* en Baja California, se espera una baja diversidad genética y una alta diferenciación entre las poblaciones, comparada con la presente en el centro de su distribución en California.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el estatus actual de las poblaciones de *R. draytonii* en Baja California.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la distribución actual de *R. draytonii* en Baja California.
2. Evaluar la relación entre la distancia a zonas urbanas y la presencia de amenazas (presencia de actividades turísticas, ganadería, extracción de agua, número de especies exótica).
3. Identificar las variables ambientales que influyen en la presencia de la especie en el área de estudio.
4. Evaluar si las amenazas antropogénicas asociadas a turismo, ganadería, extracción de agua, especies exóticas, y pérdida de hábitat, tienen una influencia negativa en la probabilidad de que *R. draytonii* esté presente en una localidad, considerando las características ambientales importantes para la especie.

5. Confirmar la presencia/ausencia del hongo patógeno *B. dendrobatidis* en el área de estudio, y en las poblaciones de *R. draytonii*.
6. Determinar si las poblaciones remanentes de *R. draytonii* en Baja California, presentan características genéticas propias de poblaciones fragmentadas que resultan por la pérdida y/o modificación de hábitat: bajos niveles de diversidad genética, alta diferenciación genética, y endogamia, utilizando bases de datos de microsatélites y SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido).
7. Con base en la información generada, proponer recomendaciones para la conservación de *R. draytonii* en el noroeste de Baja California.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Trabajo de campo

6.1.1 Muestreos

Para determinar la distribución actual de la especie, se realizaron muestreos en 44 sitios del área de estudio (Fig. 5), de los cuales 20 corresponden a registros históricos basados en bases de datos de colecciones herpetológicas nacionales y del extranjero, así como de publicaciones científicas (Fidenci, 2003; Grismer, 2002; Welsh, 1988). Así mismo, se incluyeron localidades cuyo hábitat pareciera propicio para la especie, y se encontrara cerca de la distribución propuesta por Grismer (2002). Una lista detallada de las localidades con registro previo se indica en el Anexo A. No se incluyen las observaciones de Domínguez-Torres y Mellink (2003) por considerarse dudosas al no existir evidencia (fotográfica o espécimen) de los registros.

Los muestreos constaron de 1 a 3 días consecutivos en búsqueda de la especie, la duración del muestreo dependió de las características del hábitat, su accesibilidad y el permiso de acceso a la localidad. Durante el día y la noche se realizaron búsquedas a las orillas de los cuerpos de agua y entre la vegetación riparia utilizando lámparas de cabeza y reflectores de mano, escudriñando cualquier microhábitat que pudiera ser utilizado por los anfibios (superficie del agua, entre vegetación, a orillas del arroyo, suelo, hojarasca, entre otros). Los individuos capturados fueron colocados de manera individual en bolsas de plástico con cierre hermético. Para cada individuo capturado se registró datos de hora de captura, peso, sexo, longitud hocico-cloaca, geo-posicionamiento, y después de tomar muestras de tejido (falanges) y frotis de piel. Una vez realizadas las mediciones del espécimen y tomada las muestras correspondientes éste fue liberado en el lugar de captura.

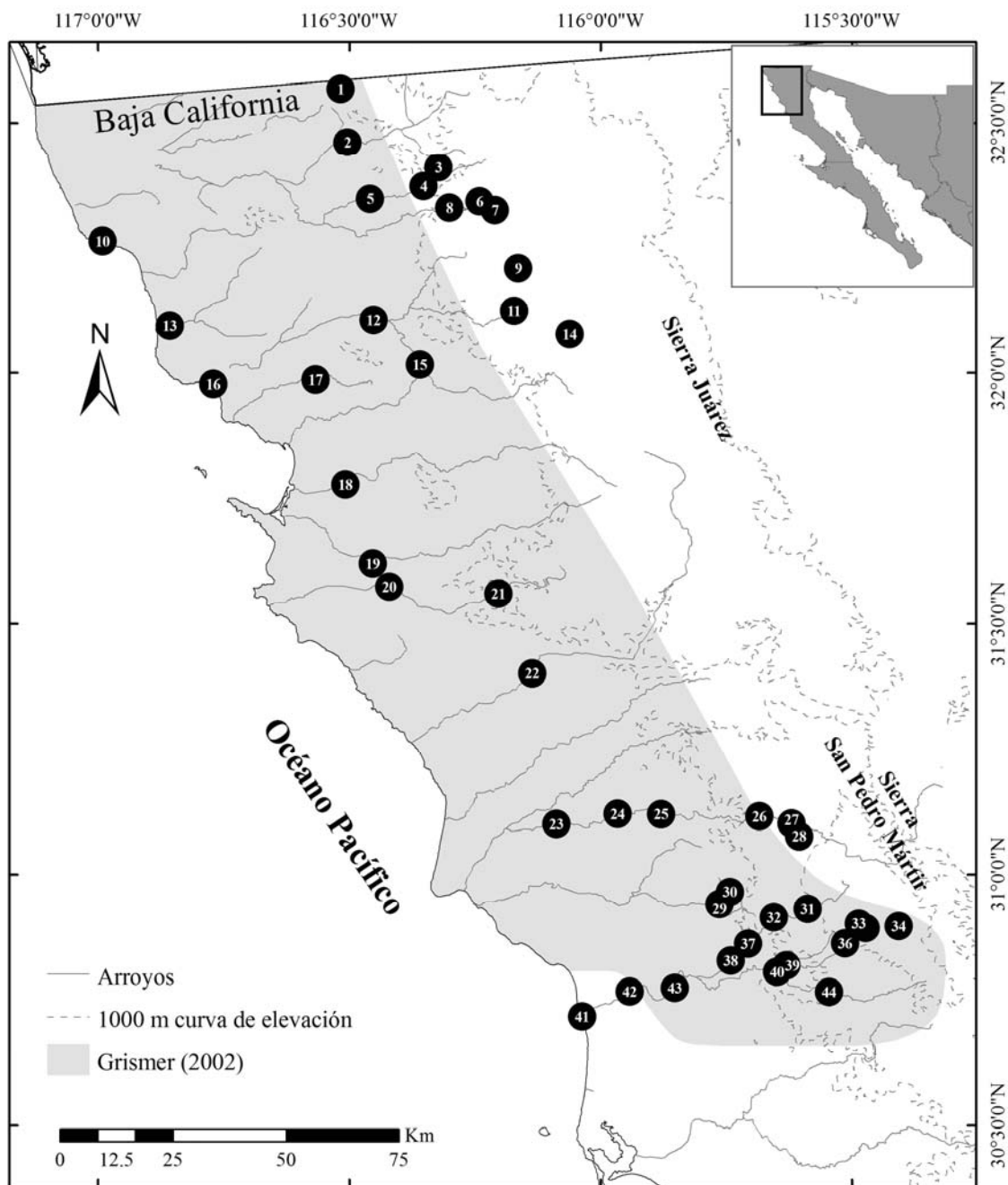


Figura 5. Sitios de muestreo visitados para determinar el estado de la distribución actual de *Rana draytonii* en Baja California. Los números corresponden al Anexo B.

6.1.2 Registro de datos ambientales y antropogénicos

Para establecer las variables más importantes que determinan la distribución actual de *R. draytonii*, se tomaron datos ambientales y antropogénicos a través de transectos diurnos de 250 m de longitud, en las localidades donde existía registro previo de la especie, tratando de cubrir un mínimo de cuatro transectos por sitio. La relación de las variables ambientales se presenta en la Tabla I.

Tabla I. Variables ambientales y antropogénicas.

Ambientales	Antropogénicas
Temperatura	Presencia de especies exóticas
Potencial de iones de hidrógeno (pH)	Porcentaje de área perturbada
Conductividad	Distancia a asentamientos humanos
Salinidad	Distancia a caminos
Ancho del arroyo	Distancia a carreteras
Profundidad	Distancia a campos de cultivo
Velocidad de la corriente	Presencia de ganadería
Número de pozas	Presencia de uso de agua
Número de caídas de agua	Presencia de turismo
Porcentaje de cobertura vegetal	
Porcentaje de vegetación acuática sobre el arroyo	
Porcentaje de pozas (bajas, medias, profundas)	
Substrato del banco	
Substrato del arroyo	

VARIABLES AMBIENTALES

VARIABLES FÍSICOQUÍMICAS: Se midió la temperatura, pH, conductividad, salinidad y sólidos disueltos totales en la parte media del arroyo al inicio de cada transecto utilizando un equipo multiparámetro de agua modelo 35 (Eutech/Oakton Instruments, Vernon Hills, IL).

VELOCIDAD DE LA CORRIENTE. Al inicio de cada transecto se midió el tiempo transcurrido de un objeto (pelota de plástico de 5 cm de diámetro) en recorrer 5 metros de distancia en el arroyo. La medición se realizó tres veces, y se tomó la media de las mediciones, para la base de datos final se transformaron los datos a metros por segundo.

ANCHO DEL ARROYO. Al inicio de cada transecto se midió el ancho del arroyo que contaba con agua.

ANCHO TOTAL DE ARROYO. Al inicio de cada transecto se midió el ancho del canal del arroyo entre los bordes superiores de los bancos.

PROFUNDIDAD. Al inicio de cada transecto se midió la profundidad máxima del arroyo.

COBERTURA. Corresponde al promedio de cobertura vegetal que cubre el arroyo a lo largo del transecto, debido a la subjetividad de esta medida, se utilizaron seis escalas: cero, 1-10%, 11-25%, 26-50%, 51-75%, y 76 a 100%.

NÚMERO DE CAÍDAS DE AGUA. Corresponde al número de caídas de agua (runs) a lo largo del transecto.

NÚMERO DE POZAS ADYACENTES AL ARROYO. Corresponde al número de pozas ubicadas en el banco del arroyo, y que no tenían conexión directa con este. Se utilizaron cuatro categorías para esta variable: 1-2, 3-4, 4-6 y 7-10 pozas.

Porcentaje de vegetación acuática. Corresponde al porcentaje promedio de vegetación acuática que cubría la superficie del arroyo a lo largo del transecto. Se utilizaron seis escalas: cero, 1-10%, 11-25%, 26-50%, 51-75%, y 76 a 100%.

Porcentaje de pozas bajas, medias y profundas. Corresponde al porcentaje de la porcentaje de pozas bajas (menores a 30 cm), medianas (>30, < 100 cm), y profundas (>100 cm), a lo largo del transecto.

Sustrato del banco del arroyo. Corresponde al porcentaje promedio de los tres sustratos más abundantes en el banco de arena a lo largo del transecto. Los tipos de sustrato considerados fueron: tierra, arena, grava, canto rodado, adoquín, y rocas de gran tamaño. Se utilizaron seis escalas: cero, 1-10%, 11-25%, 26-50%, 51-75%, y 76 a 100%.

Sustrato del arroyo. Corresponde al porcentaje promedio de los tres sustratos más abundantes del arroyo a lo largo del transecto. Los tipos de sustrato considerados fueron: arena, grava, canto rodado, adoquín y rocas de gran tamaño. Se utilizaron seis escalas: cero, 1-10%, 11-25%, 26-50%, 51-75%, y 76 a 100%.

Variables antropogénicas

Presencia de especies exóticas acuáticas. La detección de especies exóticas se realizó mediante encuentros visuales y mediante la colocación de trampas sardineras (minnow traps) a lo largo de los transectos. En el caso de especies donde se desconocía su identificación, se recolectó un espécimen y se llevó al Laboratorio de Vertebrados de la Universidad Autónoma de Baja California para su identificación, en el caso de realizar nuevos registros procuró de tomar evidencia fotográfica o recolecta de espécimen para depositarlo en la colección antes referida.

Porcentaje de área perturbada. Esta corresponde al porcentaje del arroyo que cruza por una zona no natural (campos de cultivo, asentamientos humanos,

industrias, etc.). Se utilizaron imágenes de Google Earth con un radio de 3 km, mismas que permitieron elaborar polígonos de estos campos (Fig. 6). Se consideró un tamaño de 3 km con base en el desplazamiento máximo de la especie que es de aproximadamente 2.9 km (Fellers y Kleeman, 2007).

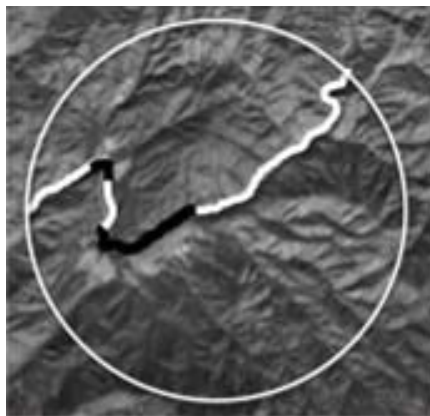


Figura 6. Ejemplo de obtención de la variable: porcentaje de área perturbada en el arroyo. La franja blanca corresponde al arroyo, y la franja negra a la parte del arroyo que se encuentra rodada de zonas perturbadas.

Distancia a asentamientos humanos, caminos, carreteras y campos de cultivo. Estas medidas se obtuvieron mediante el uso de imágenes de Google Earth, determinando la distancia desde el punto de muestreo a la zona urbana más cercana, caminos de tercería, carreteras pavimentadas, y campos de cultivo.

Las actividades de ganadería, turismo y uso de agua se registraron ponderando valores de 0 al 3, donde cero equivale a ausencia y 3 un alto impacto.

Ganadería. Para esta variable se consideró un valor de 1 cuando en el transecto se observaron excretas o huellas, pero sin la observación de individuos, 2 cuando se observaron individuos pero no en la totalidad de los transectos, y 3 cuando se observaron individuos en la totalidad de los transectos.

Turismo. Para esta variable se consideró 1 cuando el área es visitada por lugareños, 2 cuando es visitada en períodos vacacionales, y 3 cuando es constantemente visitada.

Uso de agua. Para la utilización de agua se consideró 1 cuando se observó la presencia de pozos para uso personal del propietario del predio, 2 cuando se observó una o dos bombas para uso personal y 3 cuando se observó bombas subterráneas en gran número indicando un uso con fines comerciales.

6.1.3 Obtención de frotis de piel para detección de *Batrachochytrium dendrobatidis*

Para determinar la presencia de quitridiomycosis, se realizaron frotis de piel en la parte ventral de cada animal capturado con hisopos estériles siguiendo el protocolo de Hyatt *et al.* (2007). Se tomaron muestras a todos los individuos de *R. draytonii*, con excepción de la localidad de La Grulla, debido al gran número de individuos recolectados. En el caso de observar especies nativas de manera incidental, también se realizó el frotis de piel para la detección de quitridiomycosis. Cada muestra del frotis fue colocado en un tubo estéril y etiquetado para su preservación e identificación. Para evitar la posible contaminación entre individuos y las muestras, se utilizaron guantes individuales desechables para la manipulación de cada animal. Todo el equipo de trabajo (botas, redes y cualquier otro material) fue limpiado y descontaminado con una solución de cloro al 5% después de usarse en cada localidad (Livo, 2004).

6.1.4 Obtención de muestras genéticas

Para los análisis moleculares se tomaron muestras de tejido por medio de ectomización del falange derecho de la pata delantera, tomando un máximo de 4 mm de tejido. El material biológico se fijó en alcohol etílico (sin desnaturalizar) al 95% hasta su análisis posterior en el laboratorio. Se recolectaron 200 muestras de tejido correspondientes a nueve localidades durante el trabajo de campo. A estas se anexaron 18 muestras de tejido preservadas en la colección del museo de Historia Natural de San Diego y en la Universidad Autónoma de Baja California, provenientes de las localidades de El Molino, San Antonio de Murillos, El Potrero y La Grulla. En la Tabla II se indica el número de muestras utilizadas para cada análisis genético.

Tabla II. Muestras de tejido de *Rana draytonii* utilizadas para los análisis moleculares. Las localidades corresponden a sitios con observaciones de *R. draytonii*.

Localidad	No. muestras	Museo	Total	Cyt b	Micros	RadSeq
La Palmita	19	0	19	4	19	4
San Rafael medio	0	0	0	0	0	0
Rancho Meling	17	0	17	3	17	5
El Molino	1	1	2	0	2	1
El Potrero	8	11	19	2	18	4
Valladares	5	0	5	2	5	1
Sur de Valladares	4	0	4	0	4	4
San Antonio	15	1	16	2	16	5
La Canastilla	4	0	4	3	4	1
La Grulla	125	5	130	2	25	5
TOTAL	198	18	216	18	110	30

6.2 Trabajo de laboratorio

6.2.1 Detección de *Batrachochytrium dendrobatidis*

Los frotis de piel obtenidos en campo fueron analizados por la M.C. Andrea Adams de la Universidad de California en Santa Bárbara, por medio de PCR en tiempo real para la determinación de la presencia y concentración del hongo *B. dendrobatidis*. El ADN de los frotis fue extraído mediante la adición de 40 microlitros de PrepMan® Ultra (Applied Biosystems), el cual se incubó a 100°C por 10 minutos. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 13,000xg por 3 minutos, y el sobrenadante fue aspirado y colocado en un tubo nuevo y estéril de 1.5 mL. Las muestras fueron diluidas 1:10 con solución estéril de DNase-free 0.25X TE (Tris-EDTA). El análisis de qPCR fue realizado en un sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems StepOnePlus™, siguiendo las reacciones de PCR y amplificación de parámetros de Boyle *et al.* (2004). Los controles positivos en cantidades de 100, 10, 1 y 0.1 zoosporas fueron corridos en cada plato por triplicados, junto con tres controles negativos. El DNA de *Bd* utiliza un DNA estándar desarrollado por Mary Toothman, de la Universidad de California, Santa Bárbara USA. Para considerar la dilución del extracto de *Bd* y calcular la cantidad de DNA de *Bd* por frotis, los resultados del qPCR fueron multiplicados por 80 para obtener el total de zoosporas equivalente (ZE) por muestra de frotis. El valor de ZE puede ser utilizado como un índice de intensidad de infección o “carga de *Bd*” para individuos muestreados.

6.2.2 Extracción de ADN y amplificación de marcadores genéticos

Las muestras para ADN fueron analizadas en los laboratorios de genética del Ecological Research Center en San Diego, California y de la Universidad Estatal de San Diego. La extracción de ADN geonómico se realizó mediante kits de extracción comerciales (UltraClean Tissue DNA – QuiaGen.). La calidad de ADN se valoró mediante geles de agarosa al 1% y la concentración mediante un fluorómetro Qubit.

Extracción de ADNm. Se amplificaron 1023 pares de bases del gen mitocondrial Citocromo b (Cyt b), para 18 muestras (Tabla II). La reacción de polimerasa en cadena (PCR) se realizó utilizando los *primers* MVZ15-L, y CytbAR-H los cuales han sido utilizados para la especie en estudios anteriores (Richmond *et al.*, 2013; Shaffer *et al.*, 2004). Los productos de PCR fueron limpiados por medio de kits de limpieza (Quia Gen), y secuenciados en una empresa local.

Amplificación de Microsatélites. Se utilizó el protocolo de amplificación de microsatélites utilizado por Richmond *et al.* (2013) para *R. draytonii* en California. Se amplificaron 110 muestras, para 15 microsatélites previamente diseñados que se indican en la tabla III. Los *loci* variables se dividieron en grupos para realizar reacciones de PCR múltiples utilizando kits comerciales (Multiplex Kit Quiagen). Un *primer* en cada locus fue etiquetado con marcador fluorescente para su genotipificación, la cual se envió a laboratorios particulares para su secuenciación. Con el objetivo de poder utilizar la base de datos ya publicada de Richmond *et al.* (2013) y comparar las poblaciones de Baja California con poblaciones en el sur de California, se incluyeron seis muestras de dicha publicación para poder corregir los tamaños de los alelos por efectos de lectura en diferentes equipos.

Obtención de SNPs. Para la amplificación de SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido), se utilizó el método de doble digestión (ddRad) desarrollado por Peterson *et al.* (2012) el cual permite obtener cientos de SNPs del genoma, pero a un costo menor. Para esto se utilizaron 30 muestras (Tabla III). Para la localidad de Valladares y La Canastilla sólo se pudo incluir una muestra debido a que el resto de las muestras pertenecían a metamórficos y la concentración de ADN no era suficiente para ser incorporado en el método (> 100 ng). Las muestras se mandaron a los laboratorios de UC Berkeley para su secuenciación.

Tabla III. Microsatélites desarrollados para *R. draytonii*. A indica el número de alelos observados durante el estudio de Richmond *et al.* (2013).

Locus	Motif	Tamaño	A
RADR3-01	(ATC) ⁷	209-223	4
RADR3-02	(GAG) ⁹	112-115	2
RADR4-01	(ATCT) ¹²	174-190	5
RADR4-02	(ATCT) ⁷	243-279	10
RADR4-03	(ATCT) ¹⁰	186-206	6
RADR4-04	(ATCT) ⁸	202-234	7
RADR4-05	(ATCC) ⁵	162-186	9
RADR4-06	(AGAT) ⁸	138-150	4
RADR4-07	(AGAT) ¹³	129-165	7
RADR4-08	(AGAT) ⁷	128-146	3
RADR4-09	(AGAT) ¹⁰	132-172	9
RADR4-10	(AGAT) ¹³	172-220	13
RADR4-11	(AGAT) ¹⁰	146-174	8
RADR4-12	(AGAT) ⁸	188-220	9
RADR4-13	(AGAT) ¹⁹	108-152	12

Filtrado, y selección de bases de datos. Los datos provenientes de las lecturas de Illumina fueron procesados con el programa pyRADv2.17 (Eaton, 2014). Las muestras fueron demultiplexadas utilizando las secuencias únicas del adaptador y del barcode. Los datos fueron alineados con los programas USEARCH v6.0.307 (Edgar 2010), y MUSCLE (Edgar, 2004). Se utilizó un límite de alineación del 90%. Se obtuvieron cinco bases de datos, las cuales difieren en el número mínimo de individuos con datos completos (opción min.cov en Pyrad); tres bases de datos para las muestras de Baja California, con el 100%, 90%, y 80% (30 muestras en total); y dos bases de datos que incluyen tanto muestras de Baja California y California, con el 100% y 80% (46 muestras totales), esto para determinar si la presencia de datos faltantes tiene un impacto en la identificación de la estructura genética o el soporte de ramas en los análisis de estructura genética y reconstrucción filogenética.

Se obtuvieron entre 4,587 y 778 *loci*, dependiendo del número de muestras utilizadas para la base de datos final. La tabla IV muestra información sobre el número de SNPs no ligados y sitios polimórficos para cada base de datos.

Tabla IV. Información de las bases de datos utilizadas para los análisis de estructura genética de las poblaciones de Baja California, y filogenéticos. % muestras indica el porcentaje de individuos que se permitió que contuvieran datos faltantes, *loci* indica el número de locus con sitios variables, *Pis* indica el número de sitios polimórficos informativos, y *unl* SNPs es el número de SNPs no ligados.

Baja California			
% de muestras sin datos faltantes	<i>Loci</i>	<i>spi</i>	<i>unl</i>SPNs
100	778	504	448
90	1,682	1,138	814
80	2,545	1,760	1,163
Baja California + California			
% de muestras sin datos faltantes	<i>Loci</i>	<i>spi</i>	<i>unl</i>SPNs
100	1,128	940	775
70	4,587	3,538	2,303

6.3 Análisis estadísticos

6.3.1 Lejanía del sitio y variables antropogénicas

Utilizando la base de datos referente a variables antropogénicas para el total de sitios visitados (41 sitios), se realizó un análisis de regresión lineal para conocer la relación existente entre el grado de amenazas y el grado de aislamiento del sitio (distancia al poblado). Todos los análisis fueron realizados en R (R Development Core Team, 2008), con la aplicación de Rcommander (Fox, 2005), y graficados con el paquete cowplot de la librería ggplot2 (Wickham, 2009).

6.3.2 Selección de variables ambientales para *Rana draytonii*

Para determinar las variables ambientales importantes para explicar la presencia de la especie en el área de estudio, se realizaron dos tipos de análisis, 1) prueba no paramétrica de rangos de Wilcoxon para comparar los valores de las variables ambientales en sitios con ranas y sitios sin ranas. 2) Análisis de regresión mediante el uso de modelos lineales generalizados, los cuales son modelos de regresión en los que una variable de respuesta se relaciona con un conjunto de variables explicativas (McCullagh y Nelder, 1989). Esta relación tradicionalmente lineal, puede ser más compleja en los modelos lineales generalizados (o GLM por sus siglas en inglés), y se ajustan mejor a las variables de presencia/ausencia. Para determinar la normalidad de los datos se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk (Royston, 1995). Dada la cantidad de variables ambientales (27), y el número reducido de observaciones (60), fue necesario disminuir el número de variables, para lo cual se realizó un análisis de componentes principales (ACP). Para elaborar el ACP se revisó la correlación entre las variables por medio de una matriz de correlación de Spearman para datos no paramétricos, utilizando el valor de significancia de Holm, el cual corrige el error asociados a realizar múltiples comparaciones. Para la selección de componentes principales se aplicó el criterio de Kaiser, manteniendo únicamente aquellos componentes que incluyeran una varianza igual o mayor a 1. Para el

análisis de GLM se utilizó la familia binomial con la función logística de enlace (familia y función utilizada para datos binarios), y se aplicó la prueba de Hosmer-Lemeshow para evaluar el ajuste de los datos al modelo. Todos los análisis fueron realizados en el sistema estadístico R (R Development Core Team, 2008), con la aplicación de Rcommander (Fox, 2005), y la librería MASS (Venables y Ripley, 2002) para estandarizar los datos utilizados en el análisis de componentes principales, y ResourceSelection para la prueba de Hosmer-Lemeshow.

6.3.3 Impacto de las variables antropogénicas en *Rana draytonii*

Para determinar que variables antropogénicas tienen un impacto en la presencia de la rana, se realizaron dos análisis: 1) prueba no paramétrica de rangos de Wilcoxon en sitios con presencia de ranas, y en sitios sin presencia de ranas. 2) Análisis de regresión mediante el uso de modelos lineales generalizados, incorporando las variables ambientales importantes para la especie. Para el GLM se realizó un segundo ACP con las variables ambientales, eliminando aquellas variables que resultaron correlacionadas con variables antropogénicas. Dada la alta correlación entre las variables antropogénicas, se obtuvieron nuevas variables antropogénicas (denominadas índices) mediante un nuevo ACP de las variables antropogénicas, una vez determinada el número de ejes que agrupaban la mayor variación (utilizando el criterio de Keisser), se obtuvo el porcentaje que cada variable inicial aportó a cada índice con base en el peso observado de la variable (loadings), dicho valor se elevó al cuadrado para que el total de los porcentajes sumaran un 100%. Únicamente las cargas que eran mayores a 1% se mantuvieron en el índice. Estos nuevos índices fueron utilizados para el análisis de regresión. Para el análisis de GLM se utilizó la familia binomial con la función logística de enlace (familia y función utilizada para datos binarios), y se aplicó la prueba de Hosmer-Lemeshow para evaluar el ajuste de los datos al modelo. Todos los análisis fueron realizados en R, y las librerías mencionadas en las secciones 6.3.1 y 6.3.2.

6.3.4 Quitridiomicosis en poblaciones de anuros en el área de estudio

Para determinar diferencias entre los valores de prevalencia y carga zoospórica entre las especies, se realizaron pruebas no paramétricas de Wilcoxon. Para evaluar una posible relación entre prevalencia/carga zoospórica se realizó una prueba de correlación no paramétrica de Spearman con las variables de altitud y distancia al poblado, esto debido a la evidencia existente de estas relaciones en estudios previos. Para estos análisis se incluyeron únicamente las muestras de *R. dratyonii* recolectadas durante el primer año de muestreo, dado que fue el año donde se tomaron los datos para el resto de las muestras. Los análisis se realizaron en R (R Development Core Team, 2008), con la librería Car (Fox y Weisberg, 2011).

6.3.5 Quitridiomicosis en *Rana dratyonii*

Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para saber si existen diferencias en los valores en las categorías de localidad (8 localidades), sexo (hembra y macho), edad (metamórfico, juvenil, adulto), año de colecta (2013, 2014 y 2015) y temporada (verano, otoño y primavera), no se incluyó invierno, debido a que no se muestreó en dicha temporada. Se realizó un análisis de regresión para determinar qué variables explican mejor los valores de cargas zoosporicas, para esto se utilizaron las variables de longitud hocico-cloaca, peso, altitud, sexo, y temporada. Para el análisis de regresión se utilizaron modelos lineales generalizados, con un modelo binomial negativo el cuál es apropiado en casos donde la variable dependiente está conformada por datos numéricos que presentan sobre dispersión de los datos. Los análisis se realizaron en R (R Development Core Team, 2008), con la librería Car (Fox y Weisberg, 2011).

6.4 Análisis de datos genéticos

Se aplicaron diversos estadísticos en busca de características propias de poblaciones fragmentadas, tal es el caso de alta estructura genética, alta diferenciación genética, baja diversidad genética y altos niveles de endogamia.

6.4.1 Estructura genética.

Se determinó el número de poblaciones utilizando el programa STRUCTURE v2.3.4 (Falush *et al.*, 2003), para la base de datos de microsatélites, y SNPs (100%, 90% y 80%). En este análisis los individuos son asignados probabilísticamente a uno de K grupos genéticos. Al final del análisis se determina el valor de K que tiene mayor probabilidad dados los datos (Falush *et al.*, 2003). Se probaron valores desde K= 1 hasta K= 7 (número máximo de localidades incluidas, 6 para los SNPs y 7 para microsatélites) y se realizaron 10 corridas para cada valor de K. Se utilizó el modelo que permite mezcla entre los grupos genéticos y frecuencias alélicas correlacionadas entre poblaciones. Cada corrida tuvo un “burn-in” de 450,000 pasos, seguidos de 450,000 iteraciones para la base de datos de microsatélites, y un “burn in” de 300,000 pasos, seguidos de 300,000 iteraciones para SNPs. Se utilizó el programa Structure Harvest (Earl y vonHoldt, 2012) para agrupar los resultados. El valor óptimo de K se seleccionó a partir de la asíntota de la curva del logaritmo de la probabilidad posterior de los datos [$\ln \Pr(D/K)$] para un valor de K determinado. Se sintetizaron los datos de las 10 corridas del valor de K seleccionado a través de la alineación de las matrices de coeficientes de asignaciones de las diversas corridas utilizando el algoritmo GREEDY en el programa Clumpp v1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg, 2007). Posteriormente se visualizaron las alineaciones en el programa Distruct v1.1. (Rosenberg, 2004).

Con la base de datos de SNPS (0% y 70%) se realizaron análisis bayesianos para estimar la estructura filogenética de las poblaciones de Baja California, y determinar si los grupos obtenidos en STRUCTURE representan grupos monofiléticos. Se utilizó el programa BEAST v1.8.2, utilizando un modelo de reloj

relajado, un prior de tamaño constante poblacional, y un modelo evolutivo de GTR + I + Gamma. Se corrió por 60 millones de generaciones, muestreando cada 1,000 iteraciones. El Programa TRACER fue usado para revisar la convergencia dentro del análisis. El programa TreeAnnotator v1.8.2 se utilizó para generar la topología final, removiendo el 10% de los árboles iniciales. Las probabilidades posteriores de clados de 0.95 en adelante son consideradas como alto soporte (Alfaro *et al.*, 2003; Huelsenbeck y Rannala, 2004).

6.4.2 Diversidad genética

Para cada base de datos (microsatélites, y SNPs) se obtuvieron los niveles de variabilidad genética expresada en términos de Heterocigosidad esperada (H_e), y Heterocigosidad observada (H_o) utilizando el programa GenoDive (Meirmans y Tienderen, 2004). Se estimó la riqueza alélica (AR), y la riqueza de alelos privados (PAR) para cada población, mediante el método de rarefacción, el cual considera el tamaño mínimo de muestra, utilizando el programa HPrare (Kalinowski, 2005).

Se determinó el desequilibrio de ligamiento entre los *loci* utilizando el programa ARLEQUIN ver. 3.1 (Excoffier y Lischer, 2010) comparando *loci* en cada localidad. La hipótesis nula de dicha prueba establece que los genotipos de un locus son independientes de los genotipos de otro locus. Para cada locus en cada localidad se determinó si existía ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), en base a la comparación de la H_o y H_e , en el programa GenoDive (Meirmans y Van-Tienderen, 2004).

6.4.3 Endogamia

Para ambas bases de datos (microsatélites y SNPs) se estimó el coeficiente de endogamia (G_{is}) mediante el programa Genodive (Meirmans y Van-Tienderen, 2004). El coeficiente relaciona la Heterocigosidad observada dentro de las subpoblaciones (H_o) a la Heterocigosidad esperada (H_e), es analoga a el F_{is} utilizada para detectar desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg. Puede tomar

valores de -1 a 1. Los valores negativos indican un exceso de heterocigotos, mientras valores positivos indican exceso de homocigotos

6.4.4 Diferenciación genética

Para cada base de datos (microsatélites, y SNPs) se calculó el nivel de diferenciación entre localidades a partir de las estimaciones del índice de fijación F_{st} de manera pareada entre poblaciones mediante el programa GenDive v2.0 (Meirmans y Van-Tienderen, 2004). El cálculo permite determinar las diferencias genéticas entre las poblaciones en donde los valores de $F_{st} = 0$ indican que no hay diferenciación genética entre ambas localidades, mientras que los valores estadísticamente diferentes a 0 son un indicativo de diferenciación, es decir presencia de estructura genética.

6.4.5 Comparación con poblaciones de California

Se realizaron comparaciones de índices genéticos con poblaciones de California utilizando tres bases de datos distintas: a) Se compararon los índices genéticos de H_o , y H_e publicados previamente por Richmond *et al.* (2013, 2014, Fig. 7) para determinar si existían diferencias entre las regiones geográficas de Sierra Nevada, San Francisco, Sur de California y poblaciones aisladas del sur de California utilizando una prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis utilizando R (R Development Core Team, 2008). B) Se realizó una segunda base de datos con las muestras de Baja California, sur de California y poblaciones aisladas del sur de California utilizando únicamente los 11 microsatélites que amplificaron en Baja California, con esta nueva base de datos se obtuvieron nuevos valores de riqueza alélica mediante rarefacción, Heterocigosidad observada y Heterosigosidad esperada. Para los valores de riqueza alélicas entre regiones se utilizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en R (R Development Core Team, 2008). Para los valores de H_o y H_e se realizó un millón de permutaciones en el programa GenDive v2.0 (Meirmans y Van-Tienderen, 2004), este programa compara los valores de cada grupo usando pruebas de

permutaciones entre los grupos utilizando el estadístico de Goudet (1995): la suma de las diferencias cuadradas sobre todas las combinaciones posibles entre los grupos. Las permutaciones se llevan a cabo al intercambiar al azar las poblaciones entre los grupos. c) Utilizando la base de datos de SNPs 100% para Baja California y California (poblaciones aisladas del sur de California), se obtuvieron los valores de Heterocigosidad observada y Heterocigosidad esperada para cada población, y posteriormente se compararon los valores utilizando un millón de permutaciones en el programa Genodive.



Figura 7. Ubicación geográfica de los estudios genético-poblacionales previos de *Rana draytonii*, sobre los cuales se realizó la comparación de los índices genéticos de Heterocigosidad esperada y de Heterocigosidad observada. Modificado de Richmond *et al.* (2013)

7. RESULTADOS

7.1 Distribución actual de *Rana draytonii*

La rana de patas rojas *R. draytonii* fue detectada en diez de las 44 localidades visitadas. Seis de las 10 localidades son localidades previas de recolecta y cuatro son nuevas, éstas últimas dentro de las mismas cuencas hidrológicas donde se había registrado previamente (San Rafael, San Telmo y Santo Domingo) en altitudes de 145 a 2,070 msnm (Fig. 8). Respecto a sitios históricos, la especie no se detectó en 14 sitios históricos, cinco en la parte norte de la distribución, seis ubicados en la región de la Sierra San Pedro Mártir, y tres representan sitios en bocananas de arroyos donde el hábitat ha sido alterado o destruido por actividades antropogénicas. Previamente los registros de la especie eran desde el nivel del mar hasta los 2,200, pero al parecer se encuentra extirpada tanto de las partes bajas, como de la localidad a mayor elevación.

Información disponible sobre sexo, longitud hocico-cloaca y peso, para 298 ranas (235 adultas y 63 juveniles) se presenta en la tabla V. Se encontró que las hembras son más grandes y pesadas que los machos (LHC, Hembras: 93.2, Machos: 83.7. Peso, Hembras: 79.2, Machos: 61.7. Prueba t-student, $p < 0.001$ tanto para LHC y peso), corroborando la información existente para las poblaciones en California (Jennings y Hayes, 1994). Debido a los tamaños de muestra pequeños no se realizaron comparaciones entre poblaciones. La figura 9 muestra la estructura de intervalos de tamaño y peso para *R. draytonii* en Baja California. Se identificaron a los juveniles como individuos menores a 65 mm (Jennings y Hayes, 1994).

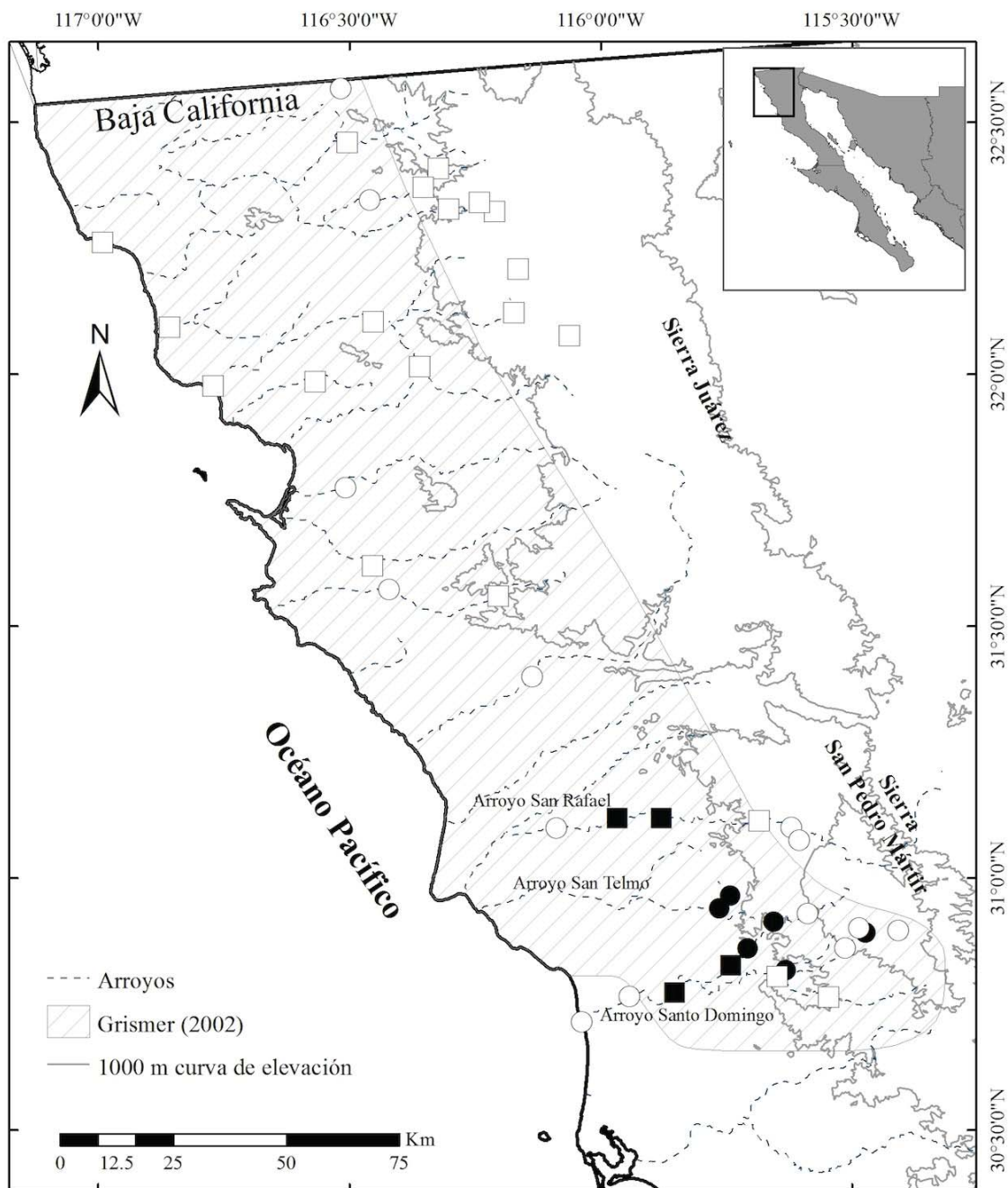


Figura 8. Distribución actual de *Rana draytonii* en Baja California. Los símbolos de círculos o cuadros abiertos (blancos) indican localidades donde la especie no fue detectada. Los símbolos de círculos o cuadros cerrados (negros) indican localidades donde fue observada. Los círculos indican localidades históricas, y los cuadrados indican sitios adicionales.

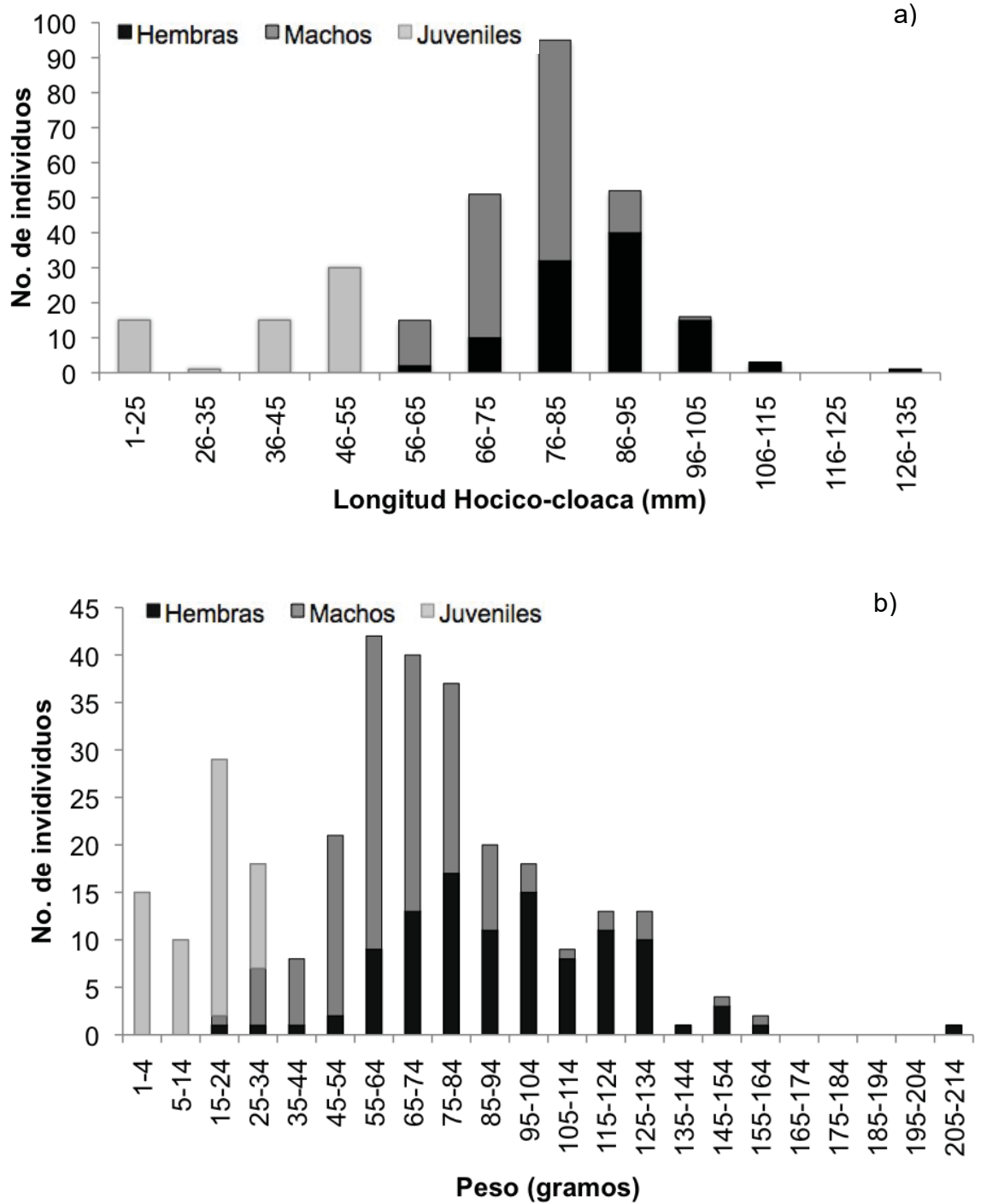


Figura 9. Estructura de intervalos de clases de talla (a) y de peso (b) de *Rana draytonii* en el noroeste de Baja California.

Tabla V. Relación de localidades y número de individuos observados de *Rana draytonii*. Se indican el número de individuos capturados por edad, medidas de la longitud hocico-cloaca (LHC) y peso. Hembra (H), Macho (M), Adulto (A), subadulto (Sub), metamórfico (Met).

Localidad	Edad				LHC (mm)				Peso (g)			
	AH	A M	Sub	Met	H	M	Sub	Met	H	M	Sub	Met
El Molino	-	1	-	-	-	84	-	-	-	76	-	-
Rancho Meling	5	9	3	-	94	79.3	60.33	-	86.4	51.6	23.5	-
El Potrero	4	18	4	-	96.2	87	-	-	85.8	63.4	-	-
Valladares	1	1	3	-	98	73	51.67	-	65	34	12.7	-
Valladares sur	1	2	-	-	88	91	-	-	61	75.7	-	-
San Antonio Murillos	2	6	6	-	82	80.5	48.8	-	52	45.6	-	11.8
La Grulla	69	71	30	-	95.4	83.9	56.7	-	92.4	64.7	22.1	-
Santo Domingo	-	-	-	4	-	-	-	28.3	-	-	-	2.3
La Palmita	23	22	2	11	99.4	90.9	54.5	28	112	83.3	16.3	2.6
Promedio					93.2	83.7	54.4	28.1	79.2	61.7	18.6	5.5
Desviación estándar					6.1	6.1	4.4	0.2	20.8	16.9	5.0	5.4

7.2 Variables ambientales

La prueba de rangos de Wilcoxon indicó que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los sitios con ranas y sin ranas para las variables: pH, porcentaje de vegetación acuática, porcentaje de pozas bajas, porcentaje de tierra en el banco del arroyo y porcentaje de canto rodado en el banco del arroyo (Tabla VI).

El resultado del Análisis de Componentes Principales (PCA) mostró que los primeros ocho componentes explicaron el 74% de la variabilidad acumulada (Fig. 10). La variabilidad explicada por cada nuevo eje de variación, así como la contribución de las variables ambientales a cada uno de los mismos se presentan en el Anexo C.

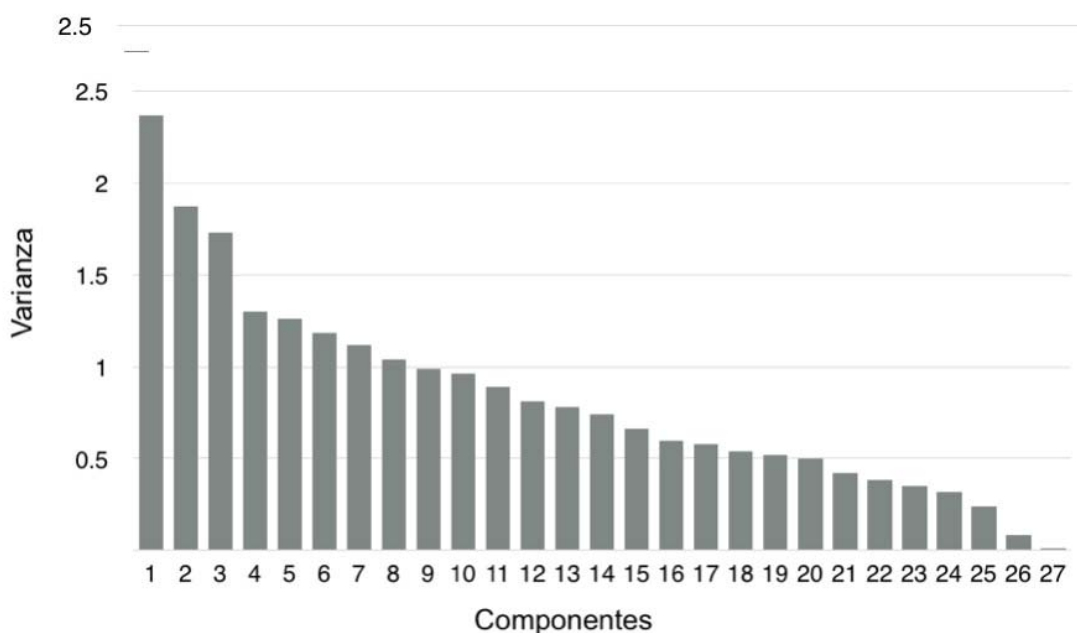


Figura 10. Gráfica de sedimentación para el ACP de las variables ambientales.

De los ocho componentes principales obtenidos de APC sobre las 27 variables ambientales, el modelo lineal generalizado indicó que únicamente el componente seis era significativo para indicar la presencia/ausencia de *Rana draytonii* ($p = 0.002$, ver Anexo D). Las variables con mayor varianza en el

componente seis son: porcentaje de vegetación acuática, presencia de pozas bajas, y porcentaje de canto rodado en el banco (Anexo C).

Tabla VI. Valores promedio de cada grupo y variables ambientales, y valor de P de la prueba de rangos de Wilcoxon. * indica valor significativo (<0.05).

Variable	sin <i>R. draytonii</i>	con <i>R. draytonii</i>	valor de P
Temperatura	18.98 °C	19.83 °C	0.693
pH	7.14	7.07	0.010*
Conductividad	639.75	586.68	0.932
Salinidad	324.42	300.44	0.984
Sólidos disueltos totales	454.30	415.05	0.958
Velocidad	0.418 m/s	0.4818 m/s	0.134
Ancho del arroyo	3.13 m	3.24 m	0.655
Ancho total	7.18 m	8.21 m	0.411
Profundidad	18.28 cn	17.89 cm	0.640
Cobertura	33.93%	39.84%	0.196
Número de caídas	2.24	1.96	0.811
Número de pozas	1.15	1.718	0.069
Vegetación acuática	19.84%	45.46%	< 0.005*
Pozas bajas	16.81%	28.12%	0.007*
Pozas medias	13.78%	20.93%	0.192
Pozas profundas	8.03%	14.21%	0.402
Tierra del banco	26.06%	9.68%	0.027
Arena del banco	59.39%	65.31%	0.339
Grava del banco	3.78%	6.09%	0.114
Canto rodado del banco	3.78%	8.43%	0.029*
Adoquín del banco	10.45%	16.56%	0.185
Rocas grandes del banco	14.69%	14.37%	0.994
Arena del arroyo	76.81%	67.96%	0.060
Grava del arroyo	6.36%	8.75%	0.486
Rocas grandes del arroyo	16.36%	13.28%	0.543

7.3 Variables antropogénicas

La prueba de rangos de Wilcoxon indicó que existen diferencias significativas entre los sitios con ranas y sin ranas únicamente para la variable de número de especies exóticas (Tabla VII). El Anexo E muestra los valores obtenidos para todas las localidades.

Tabla VII. Valores promedio de cada grupo de las variables antropogénicas. El valor de P corresponde a la prueba de rangos de Wilcoxon entre sitios de registro de la especie.

Variable	Sitios			valor de P
	Adicional	Sin rana	Con rana	
Distancia al poblado	15.74 km	26.35 km	32 km	0.75
Distancia a cultivos	12.16 km	25.17 km	21.34 km	0.86
Porcentaje de cobertura natural	78.14%	74%	91.4%	0.22
Ganadería	1.28	1.22	1.55	0.4
Turismo	1.38	0.88	0.44	0.24
Extracción de agua	1.14	0.55	1.11	0.18
Especies exóticas	1.09	1.22	0.22	0.006*

7.3.1 Ganadería, turismo y extracción de agua

Se documentó en el 95% de los sitios visitados al menos una de las actividades antropogénicas estuvo relacionadas con la presencia de ganado, turismo o extracción de agua. La presencia de ganado fue la más constante estando presente en un 85% de los sitios, seguido por actividades de turismo (72%) y finalmente extracción de agua (56%). La figura 11 muestra los porcentajes que cada nivel de amenaza obtuvo para cada categoría de sitio de muestreo (sitios adicionales, sitios con registro de *R. draytonii* donde estuvo ausente (Registro A), y sitios con registro de *R. draytonii* donde estuvo presente (Registro P). El anexo F muestra la distribución geográfica de las amenazas y el grado presente en cada localidad.

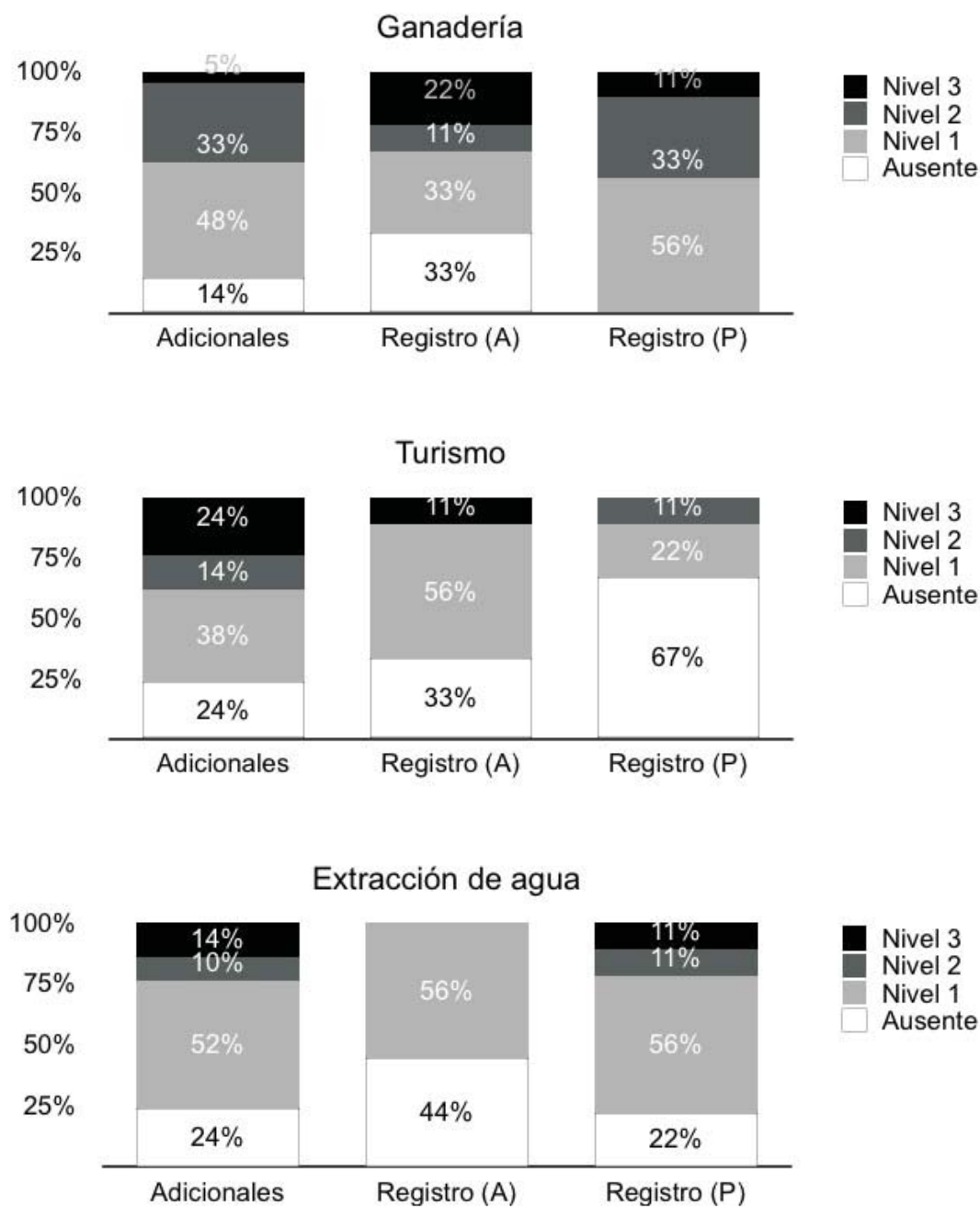


Figura 11. Porcentaje de presencia de actividades antropogénicas en los sitios visitados. (A): ausencia, (P): presencia de *Rana draytonii*.

7.3.2 Porcentaje de área natural, distancia a poblados y a cultivos.

Se detectó un porcentaje de perturbación mayor a 1% (intervalo de 2 a 68%) en el 52% de los sitios históricos visitados. La figura 12 muestra los porcentajes de área natural por categoría de 100% de área natural, de 99 a 93% y menores a 92%, estas se escogieron debido a que estudios previos indican que a una perturbación de 8% el ecosistema empieza a sufrir problemas de conservación. Se registró un media de 94.5% de cobertura de área natural, con una desviación estándar de 12.9%. En relación a los valores de distancia a poblados y a cultivos, se presentó una media de 30.35 km y 23.25 respectivamente.

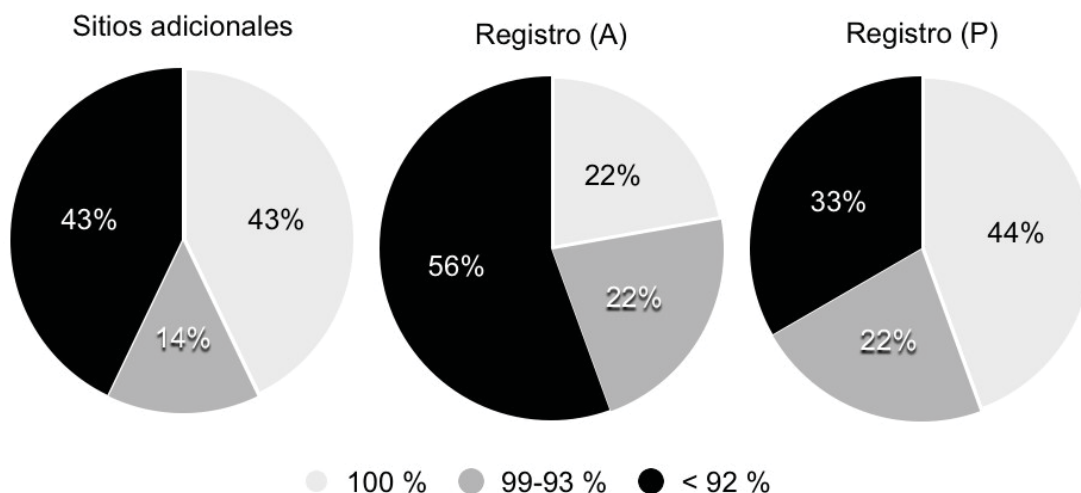


Figura 12. Valores de porcentajes de área natural en los sitios visitados. (A): ausencia, (P): presencia de *Rana draytonii*.

7.3.3 Especies exóticas

Se realizaron 41 nuevas observaciones para 11 especies exóticas en 20 sitios a lo largo de la zona de estudio (Figs. 13 y 14, Anexos G y H). Las localidades incluyen seis sitios en donde se había registrado previamente al menos una especie exótica, y 14 sitios con el primer registro de especies exóticas. Combinando los resultados con información existente en la literatura, la Región Mediterránea ahora cuenta con un total de 108 observaciones, en 53 localidades, representando 14 especies acuáticas exóticas (Anexo G, H). Las especies con mayor presencia en la región son *Gambusia affinis* (31 registros), seguida por *Procambarus clarkii* (25 registros) y *Lepomis cyanellus* (21 registros, ver Fig. 13, Anexo G). Las nuevas observaciones representan un aumento del 57% en la distribución de especies exóticas en la Región Mediterránea.

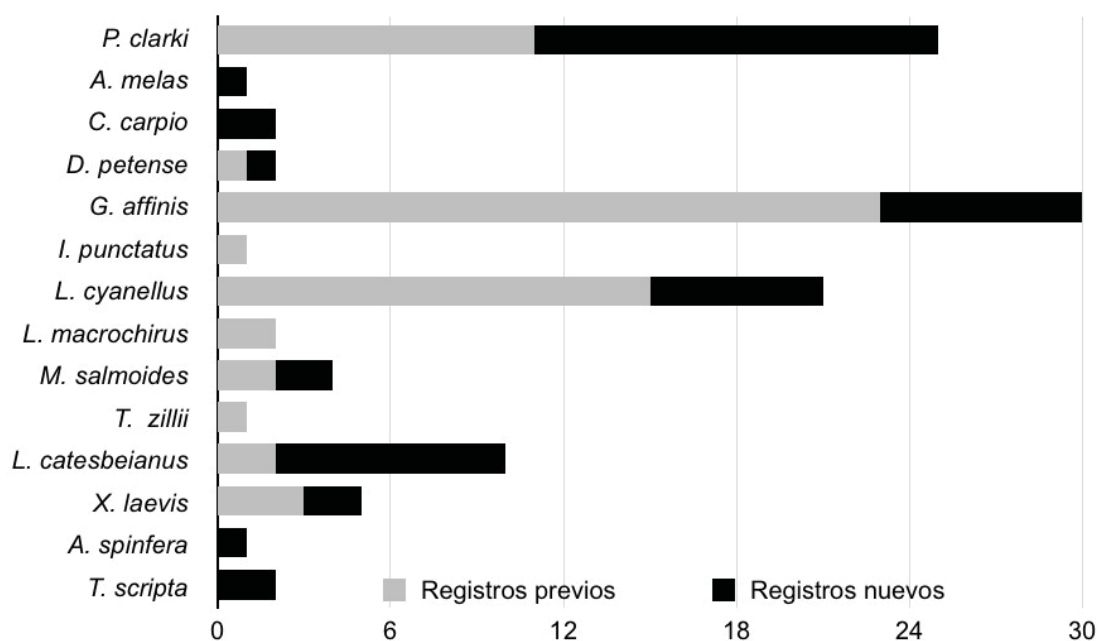


Figura 13. Número de registros por especie en la zona de estudio, indicando previos y nuevos registros.

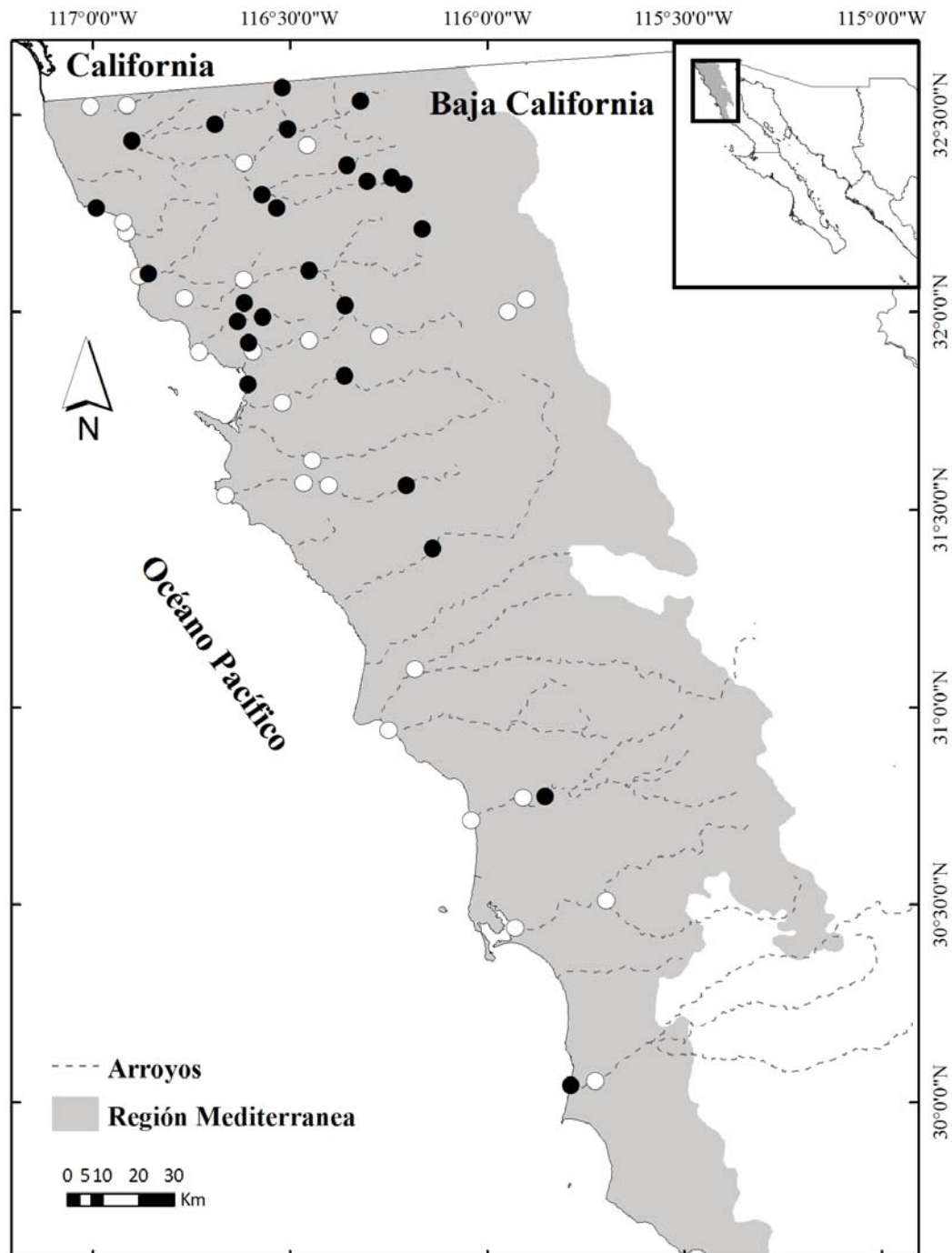


Figura 14. Localidades con especies exóticas acuáticas en la zona de estudio. Los círculos blancos indican registros previos, y los círculos negros indican nuevos registros.

7.3.4 Relación entre lejanía de zona urbana y amenazas antropogénicas.

Para este análisis se incluyó la variable Conductividad, dado que esta variable se ha utilizado como grado de urbanización (Wilson y Dorcas, 2003). Los análisis de regresión lineal indicaron valores significantes para todas las variables, excepto el impacto de ganadería (Tabla VIII). El valor más alto de correlación fue para conductividad ($R^2 = 0.82$), seguida por distancia al cultivo ($R^2 = 0.76$). Las regresiones fueron positivas, excepto en la variables conductividad (Tabla VIII, Fig. 15).

Tabla VIII. Valores de R^2 y significancia del análisis de regresión entre la lejanía al poblado y las variable antropogénicas.

Variable	R^2	valor de P
Conductividad	0.81	< 0.001
Distancia a cultivos	0.75	< 0.001
Extracción de agua	0.15	0.008
Impacto de ganado	0.05	0.091
Impacto de turismo	0.28	< 0.001
Especies exóticas	0.16	0.006
Porcentaje de área natural	0.16	0.007

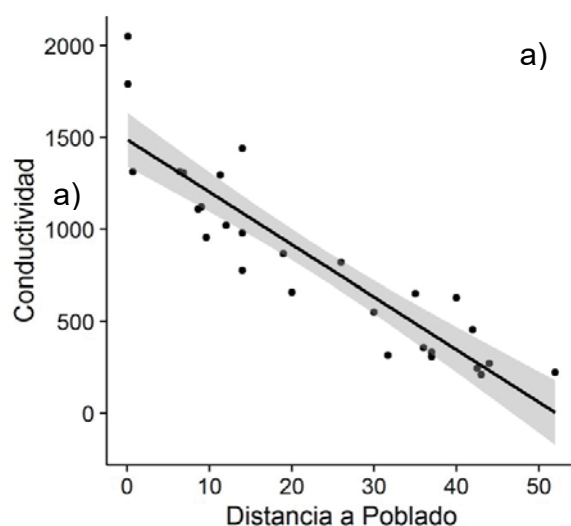
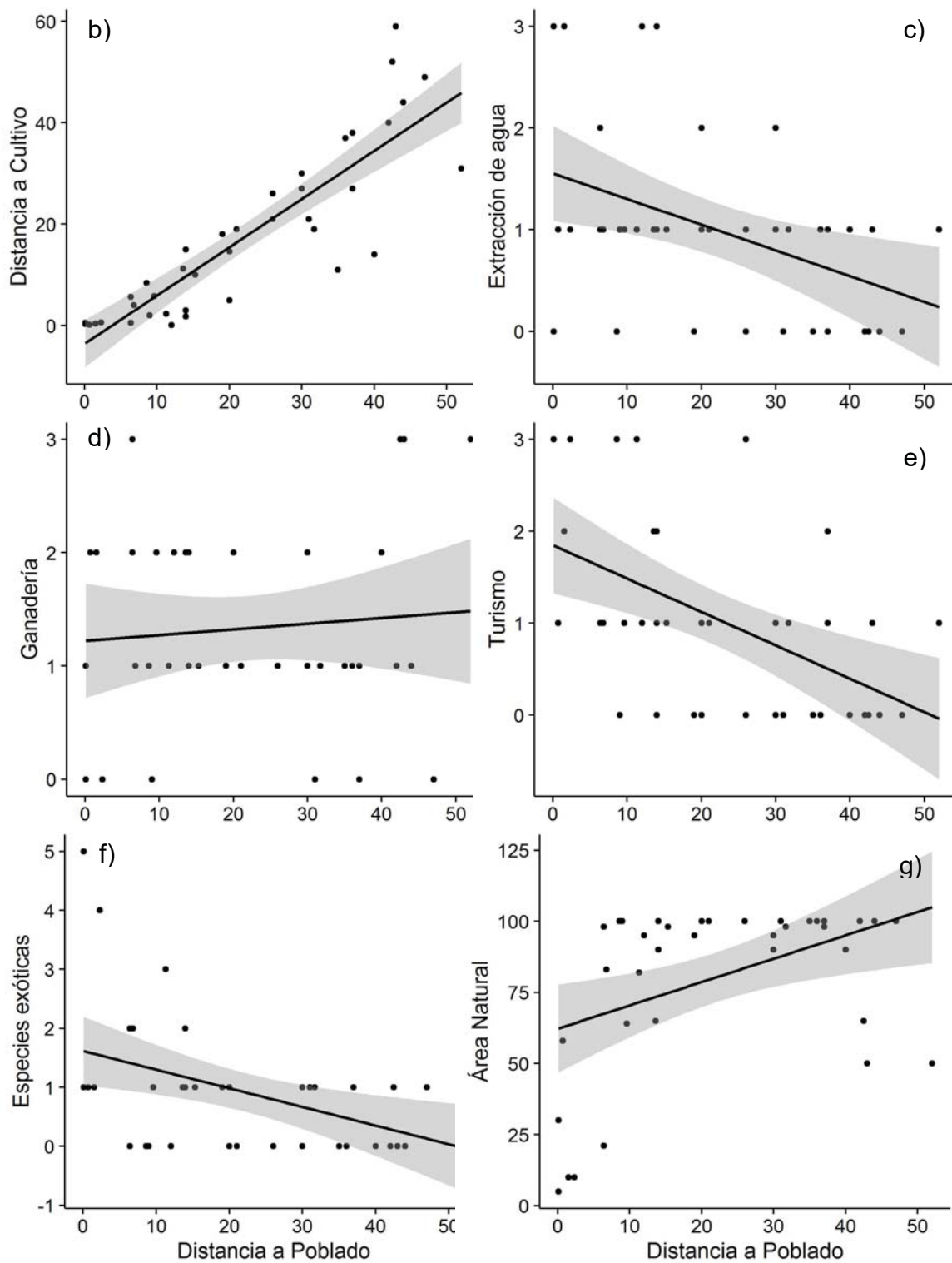


Figura 15. Gráfica de dispersión, mostrando la línea de tendencia y el área de desviación estándar, de la variable distancia al poblado y a) Conductividad, b) Distancia a cultivos, c) Extracción de agua, d) Impacto de ganado, e) Impacto de turismo, f) Especies exóticas, y g) Porcentaje de área natural.



Continuación de la Figura 15.

7.3.5 Impacto de variables antropogénicas en *Rana draytonii*

La matriz de correlación no paramétrica de Spearson entre las variables antropogénicas mostró alta correlación entre ellas (Fig. 16). Las correlaciones significativas basadas en los valores de significancia de Holms son: distancia al poblado vs distancia a cultivos, porcentaje de área natural vs impacto de ganadería, y distancia al cultivo con impacto de extracción de agua. La figura 16 representa un correlograma con los valores de rho de Spearson para cada par de variables antropogénicas

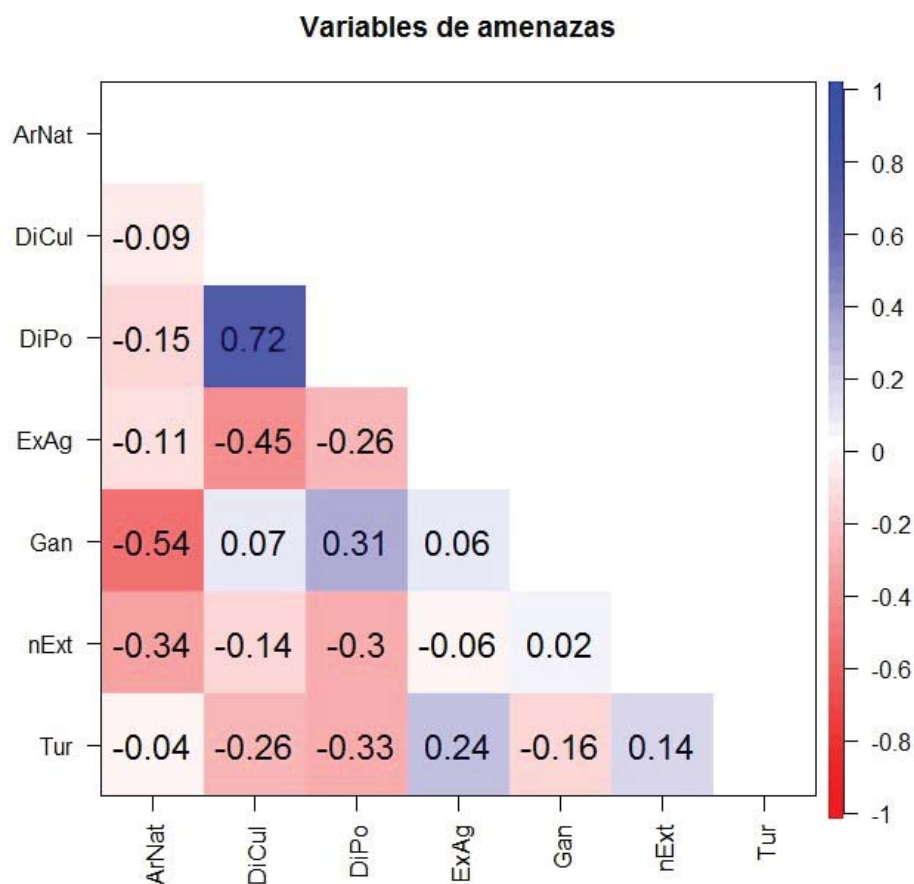


Figura 16. Correlograma de variables antropogénicas. Los valores más oscuros indican correlaciones más fuertes, valores rojos son negativos, valores azules son positivos. ArNat: porcentaje de área natural, DiCul: distancia al cultivo, DiPo: distancia al poblado, ExAg: extracción de agua, Gan: ganadería, nExt: número de especies exóticas, Tur: turismo.

Dada la alta correlación entre las variables antropogénicas, se realizó un análisis de componentes principales, este mostró que los primeros tres componentes explicaron el 74% de la variabilidad acumulada (Fig. 17). La variabilidad explicada por cada nuevo eje de variación, así como la contribución de las variables ambientales a cada uno de los mismos se presentan en la tabla IX.

Con los tres primeros componentes principales se procedió a realizar un índice referente a las variable que presentaban mayor peso basado en los *loadings* de cada componentes principal, el porcentaje se obtuvo elevando al cuadrado los valores de *loading* de cada variable, y eliminado aquellas variables con porcentajes menores a uno. Los tres índices, y el porcentaje de cada variable incluida se muestran en la Tabla X.

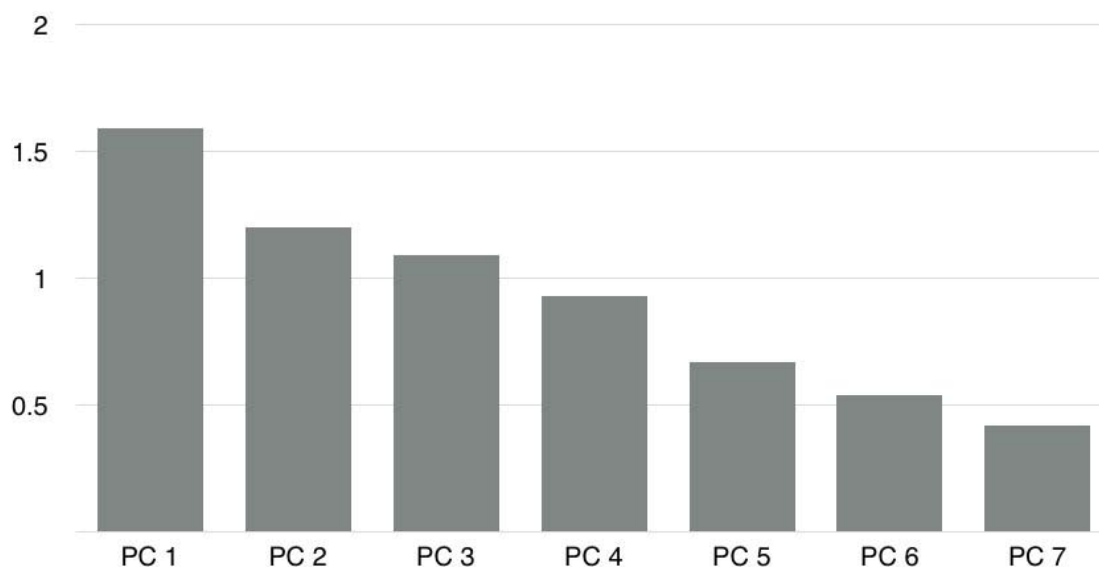


Figura 17. Gráfica de sedimentación para el análisis de componente principales para las variables antropogénicas.

Tabla IX. Componentes principales de las variables antropogénicas.

Ejes	1	2	3	4	5	6	7
Desviación estándar	1.59	1.2	1.09	0.93	0.67	0.54	0.42
Varianza	0.36	0.2	0.18	0.12	0.07	0.04	0.02
Varianza acumulada	0.36	0.56	0.74	0.86	0.93	0.97	1
Contribución de cada variable							
Área natural	0.38	-0.54	-0.02	0.29	0.22	-0.5	0.42
Distancia al poblado	-0.51	-0.32	-0.17	0.01	0.35	-0.37	-0.59
Distancia al cultivo	-0.5	-0.23	0.26	-0.2	0.45	0.36	0.51
Turismo	0.33	0.03	0.14	-0.87	0.2	-0.27	-0.07
Ganadería	-0.4	0.43	-0.4	-0.12	-0.15	-0.5	0.46
Extracción de agua	0.27	0.14	-0.72	0	0.53	0.33	0
Especies exóticas	0.09	0.59	0.44	0.32	0.54	-0.22	-0.06

Tabla X. Índices obtenidos mediante el ACP de las variables antropogénicas y los porcentajes de cada variable incluida para cada índice.

	Índice 1	Índice 2	Índice 3
Área natural	10%	32.5%	-
Distancia al poblado	30%	12.5%	-
Distancia al cultivo	30%	-	-
Turismo	10%	-	-
Ganadería	20%	22.5%	23%
Extracción de agua	-	-	54%
Especies exóticas	-	32.5%	23%
Total	100%	100%	100%

Para el GLM se realizó nuevamente un ACP para las variables ambientales dada la correlación existente entre las variables antropogénicas y las variables de salinidad, conductividad, sólidos disueltos totales, cobertura, número de caídas de agua, porcentaje de pozas bajas, dichas variables fueron excluidas del nuevo ACP. El Anexo I muestra los componentes principales seleccionados en el ACP con la base de datos reducida, y el Anexo J muestra los resultados del modelo lineal generalizado, el cual indicó que el PC5 era significativo para explicar la presencia de la especie.

El modelo lineal generalizado indicó que únicamente el índice 2 presenta valores significantes en el modelo que determina la presencia de la rana ($p=0.002$), dado las variables ambientales contenidas en el PC5. El índice 2 contiene las variables antropogénicas de porcentaje de área natural, distancia al poblado, ganadería y especies exóticas (Tabla IX).

$$\text{Rana} = - 0.09 - 0.87 (\text{PC 5 ambientales}) - 1.84 (\text{índice 2})$$

El modelo indica una relación negativa tanto para el intercepto, las variables ambientales y los valores del índice 2. Una predicción de valores del índice 2, indica que conforme el índice es más negativo existe mayor probabilidad de que *R. draytonii* sea presente, y entre más positivo, tal probabilidad disminuye (Fig. 18).

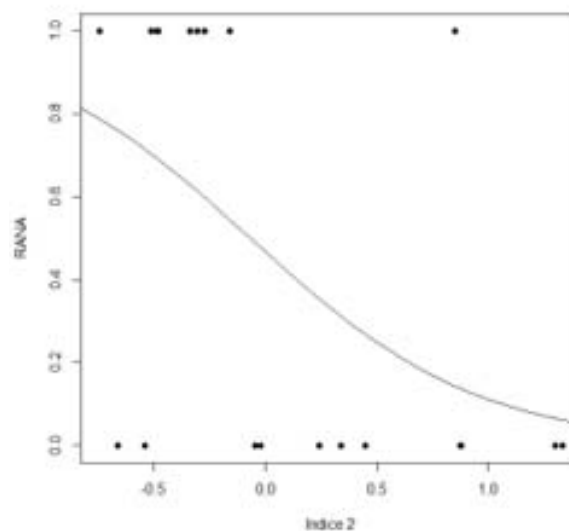


Figura 18. Predicción del modelo lineal generalizado, para los valores del índice 2 y la probabilidad de presencia de *Rana draytonii*.

El índice 2 de amenazas se aplicó al total de localidades muestreadas (adicionales y con registro previo) para conocer el valor del índice de amenazas correspondiente (Anexo K). Para la obtención del índice se ajustaron las escalas de cada variable. La figura 19 muestra que las zonas donde el índice indica que el hábitat más favorable para la rana se encuentran en las zonas de Sierra San Pedro Mártir y en la zona de Sierra Juárez (valores > 80%).

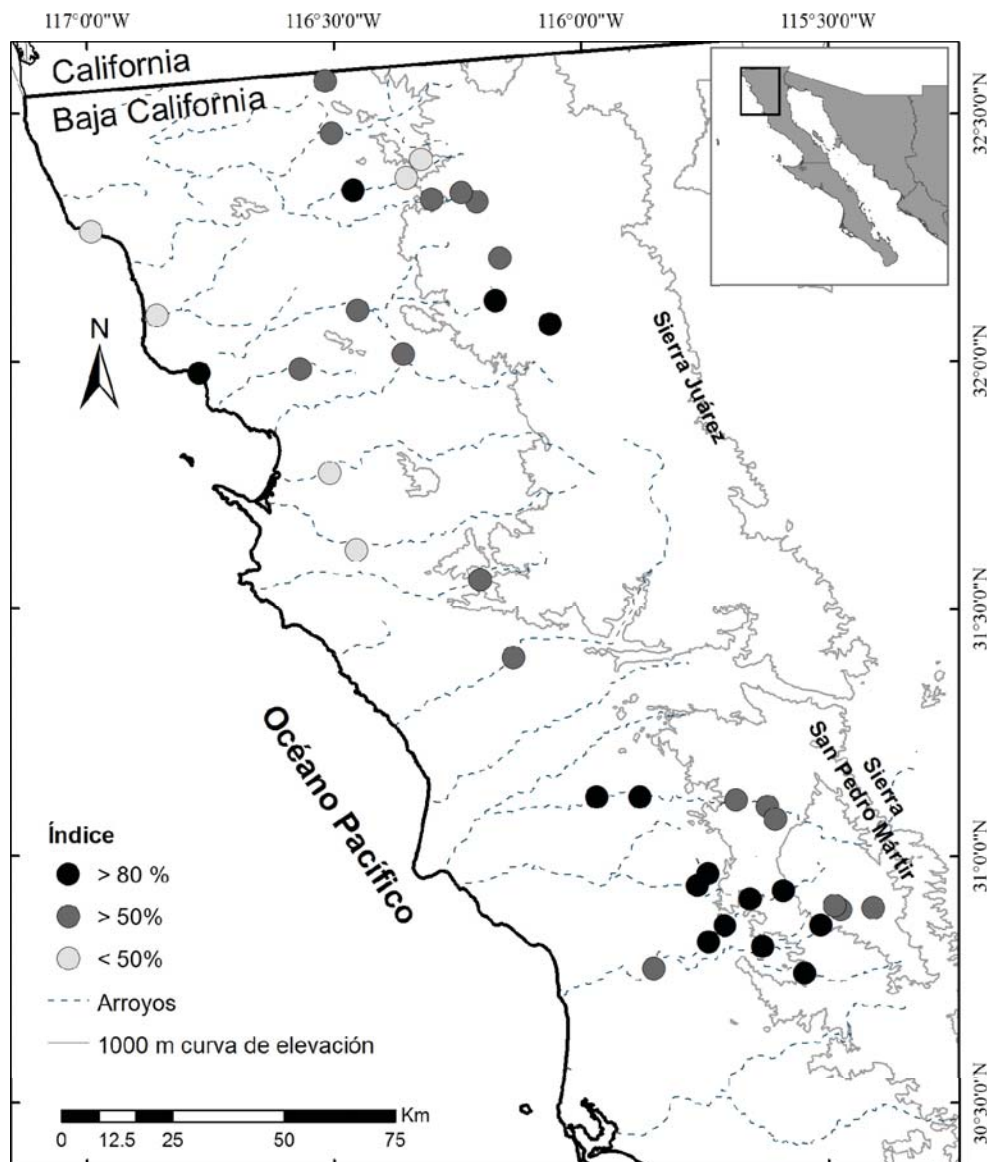


Figura 19. Representación geográfica de los valores obtenidos del índice de amenazas para el total de sitios visitados.

7.4 Quitridiomicosis

7.4.1 En especies de anuros en el área de estudio

Se detectó la presencia del hongo quítrido *B. dendrobatidis* (*Bd*) en 99 individuos de anfibios (49.5% de las muestras) en 25 de 33 localidades muestreadas (Fig. 20, Anexo L). De las localidades históricas se analizaron muestras para 15 sitios, de los cuales 12 de dichos sitios resultaron ser positivos. El hongo estuvo presente en los anfibios *Anaxyrus californicus*, *A. boreas*, *Hyllola cadaverina*, *H. hypochondriaca*, *R. draytonii*, y la rana exótica *Lithobates catesbeianus*. Únicamente la especie no nativa *Xenopus laevis*, resultó negativa para la presencia de *Bd* en nueve individuos examinados de una localidad. Las cargas medias de *Bd* variaron de cero ZE (i.e. sin evidencia de infección) a 12,067 ZE en un individuo adulto de *H. hypochondriaca* de La Misión (sitio 10), siendo *H. cadaverina* la especie con carga zoopórica media más alta (633, Tabla XI). La especie *L. catesbeianus* exhibió la prevalencia más alta de *Bd* (71%), seguido por *R. draytonii* (66%) e *H. hypochondriaca* (40%) (Tabla XI). Los sitios positivos para *Bd* se presentaron desde el nivel del mar (i.e. Salsipuedes, y La Misión), hasta 2,070 m (i.e. La Grulla, Anexo L).

Tabla XI. Especies muestreadas para detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* en la zona de estudio. Se indica el tamaño de muestra, la prevalencia (%), el valor promedio zoospórico (ZE), la desviación estándar (D.E.) y los sitios de muestreo correspondientes al Anexo L.

Especies	N	%	ZE	D.E.	Localidades
<i>Anaxyrus boreas</i>	5	40	14.36	31.95	1,8,33
<i>A. californicus</i>	14	35.7	52.69	192.90	16,19,20,21,25,27
<i>Hyllola cadaverina</i>	49	38.8	633.78	1920.80	5,7,11,14-16,19-22,25,26,29-32
<i>H. hypochondriaca</i>	42	40.5	418.48	1863.18	2-6,8,10,11,13,14,17-20,22,24,25,30,33
<i>Rana draytonii</i>	68	66.2	192.16	1031.20	20,23,25-28,30,33
<i>L. catesbeianus</i>	7	71.4	221.80	338.70	4,10,12,13,17

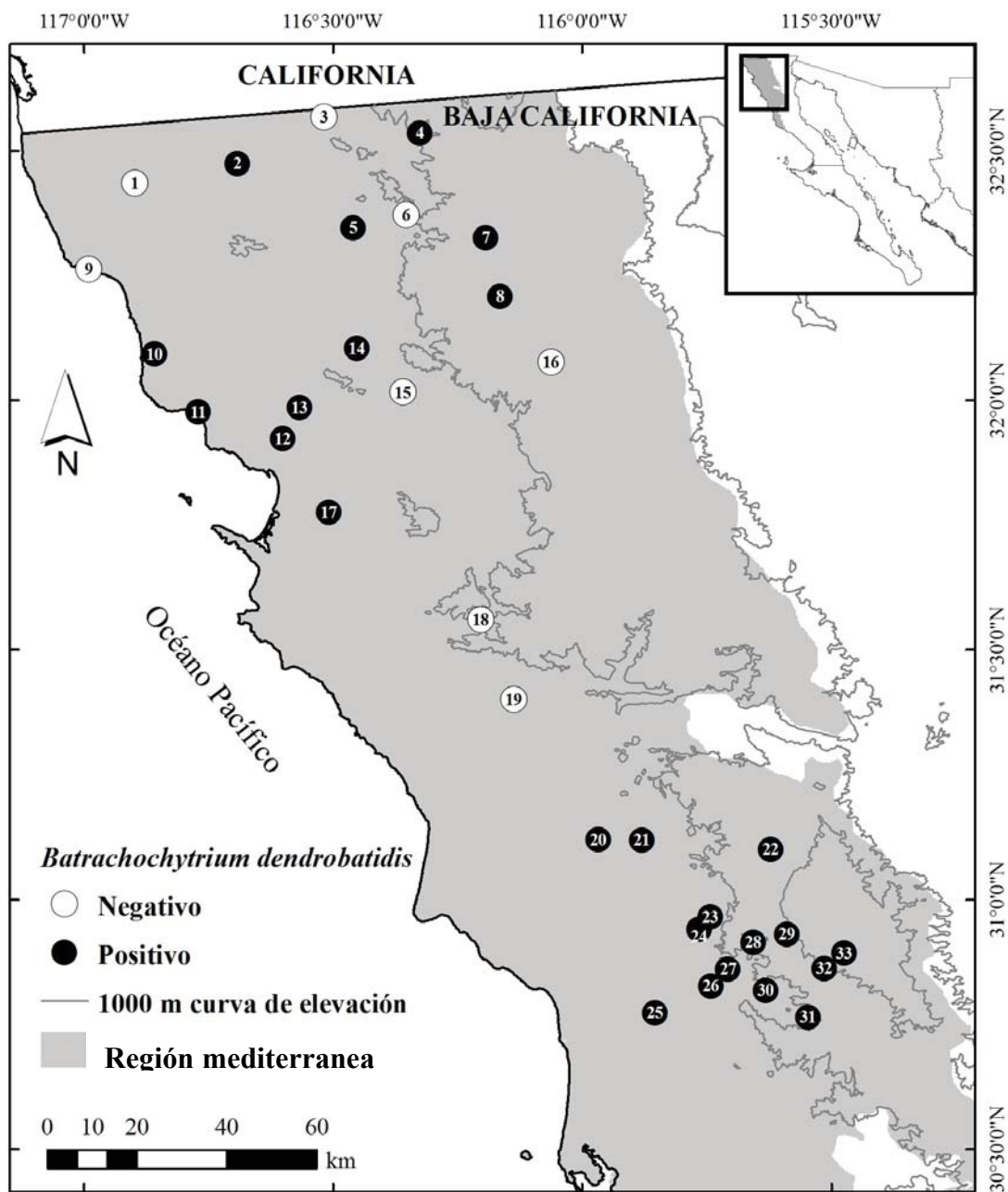


Figura 20. Sitios muestreados para la detección de *B. dendrobatidis* en la zona de estudio. Los números de localidades corresponden al Anexo L.

La prueba de correlación de Spearman para datos no paramétricos indicaron una correlación significativa para Prevalencia y Altitud ($\rho = 0.48$, $p=0.03$, Figura 21), así como entre la y Prevalencia y Distancia al Poblado ($\rho = 0.61$, $p=0.006$, Figura 21). No se observaron correlaciones significantes para la carga media zoospórica entre altitud o distancia al poblado.

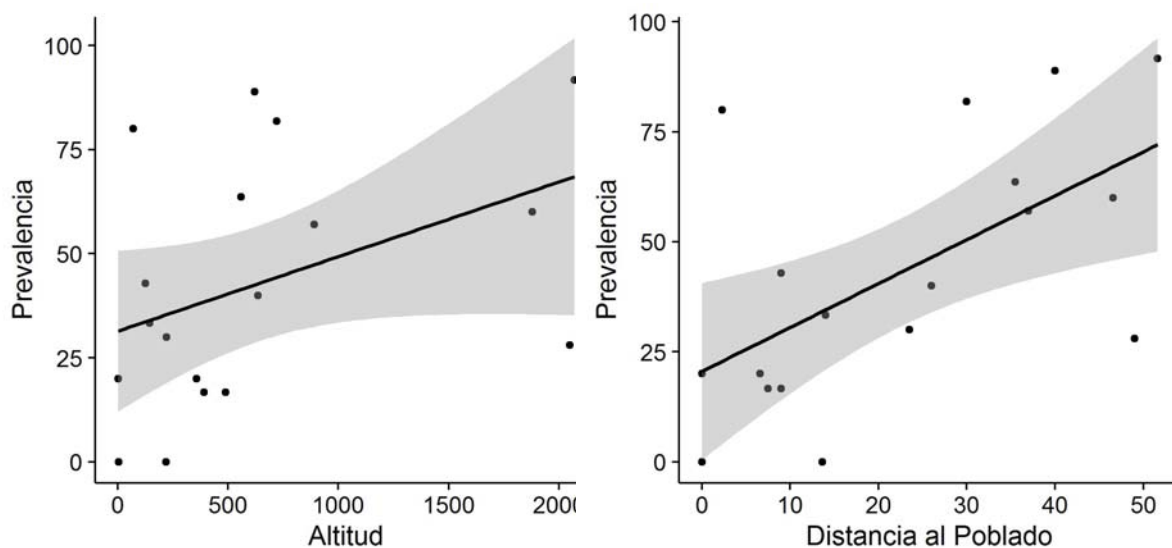


Figura 21. Gráfica de dispersión, mostrando la línea de tendencia y el área de desviación estándar. a) Prevalencia contra altitud, b) Prevalencia contra distancia al poblado. El área sombreada muestra la desviación estándar.

7.4.2 Quitridiomicosis en poblaciones de *Rana draytonii*

Se detectó la presencia de quitridiomicosis en el total de las localidades presencia de adultos de *R. draytonii*. La localidad de La Canastilla fue el único lugar con ausencia de registro de quitridiomicosis, sin embargo este análisis fue limitado a tres muestras de individuos metamórficos. Para el resto de las localidades, El Rancho Meling, El Potrero y La Grulla presentaron prevalencias similares (88-89%), y la localidad de La Palmita presentó el valor más bajo (15%). En lo que respecta al valor zoospórico medio, San Antonio presentó el valor más alto (410.30), y la Palmita presentó el nivel más bajo (32.10, Tabla XII). Ninguno de los nueve individuos metamórficos analizados resultaron positivos, los juveniles presentaron los valores más altos de prevalencia y de valor zoospórico (Tabla XII). La prueba de rangos de Kruskal-Wallis indicó diferencias significativas entre los valores zoospóricos promedios para todas las categorías analizadas: localidades, edad, sexo, y año y temporada de muestreo (Tabla XII).

El análisis de regresión indicó que las variables significantes para explicar la carga zoospórica fueron año, altitud y temporada.

Carga zoospórica = $-2928 + 1.45 (\text{año}) + 0.002 (\text{altitud}) + 2.193 (\text{temporada de primavera}) - 2.71 (\text{temporada de verano})$.

El modelo indicó una relación positiva con el año, altitud y temporada de primavera, y negativa para la temporada de verano. La tabla XIII muestra los valores arrojados por el modelo para el intercepto el error estándar, el valor de Z y P de cada variable. La figura 22 muestra la gráfica que representa la aportación de cada variable al modelo final.

Tabla XII. Datos de *Batrachochytrium dendrobatidis* en poblaciones de *Rana draytonii*. Se indica el tamaño de muestra (n), prevalencia (%), valor zoopórico medio (ZE), desviación estándar (D.E) y valor de significancia (p) para la prueba de rangos de Kruskal-Wallis.

Variable	n	%	ZE	D.E.	p
<i>Localidad</i>					0.0001
La Canastilla	3	0	0	0	
El Potrero	24	88	63.52	178.98	
La Grulla	89	88	266.50	630.83	
La Palmita	35	15	32.10	90.69	
Rancho Meling	9	89	236.98	554.52	
San Antonio	14	79	410.30	1010.09	
Sur de Valladares	4	50	110.46	135.42	
Valladares	6	83	125	228.82	
<i>Edad</i>					0.004
metamórfico	8	0	0	0	
juvenil	31	70	319	827.95	
adulto	145	77	174	457	
<i>Sexo (sólo adultos)</i>					0.004
hembra	76	79	226.6	441	
macho	69	61	116	471	
<i>Año de muestreo</i>					< 0.0001
2013	46	70	45.42	121.65	
2014	58	69	131.59	518.46	
2015	80	83	321.43	676.77	
<i>Temporada de muestreo</i>					0.003
primavera	25		169	539.90	
verano	63		247	611.13	
otoño	96		41.7	106	

Tabla XIII. Resultados del modelo de regresión lineal generalizado para los datos de quitridiomycosis en poblaciones de *Rana draytonii* en Baja California.

Variable dependiente: carga zoospórica (ZE)	Estimado	Error Estándar	Valor de Z	valor de P
(intercepto)	-2,928	478	-6.12	< 0.001
año	1.45	0.234	6.12	< 0.001
altitud	0.002	0.0005	4.5	< 0.001
temporada (primavera)	2.19	0.66	3.28	0.001
temporada (verano)	-2.37	1.15	-2.04	0.04
edad (juvenil)	0.693	0.784	0.884	0.377
edad (metamórfico)	-51.88	23730000	0.0	1
longitud Hocico-cloaca	0.008	0.018	0.468	0.640

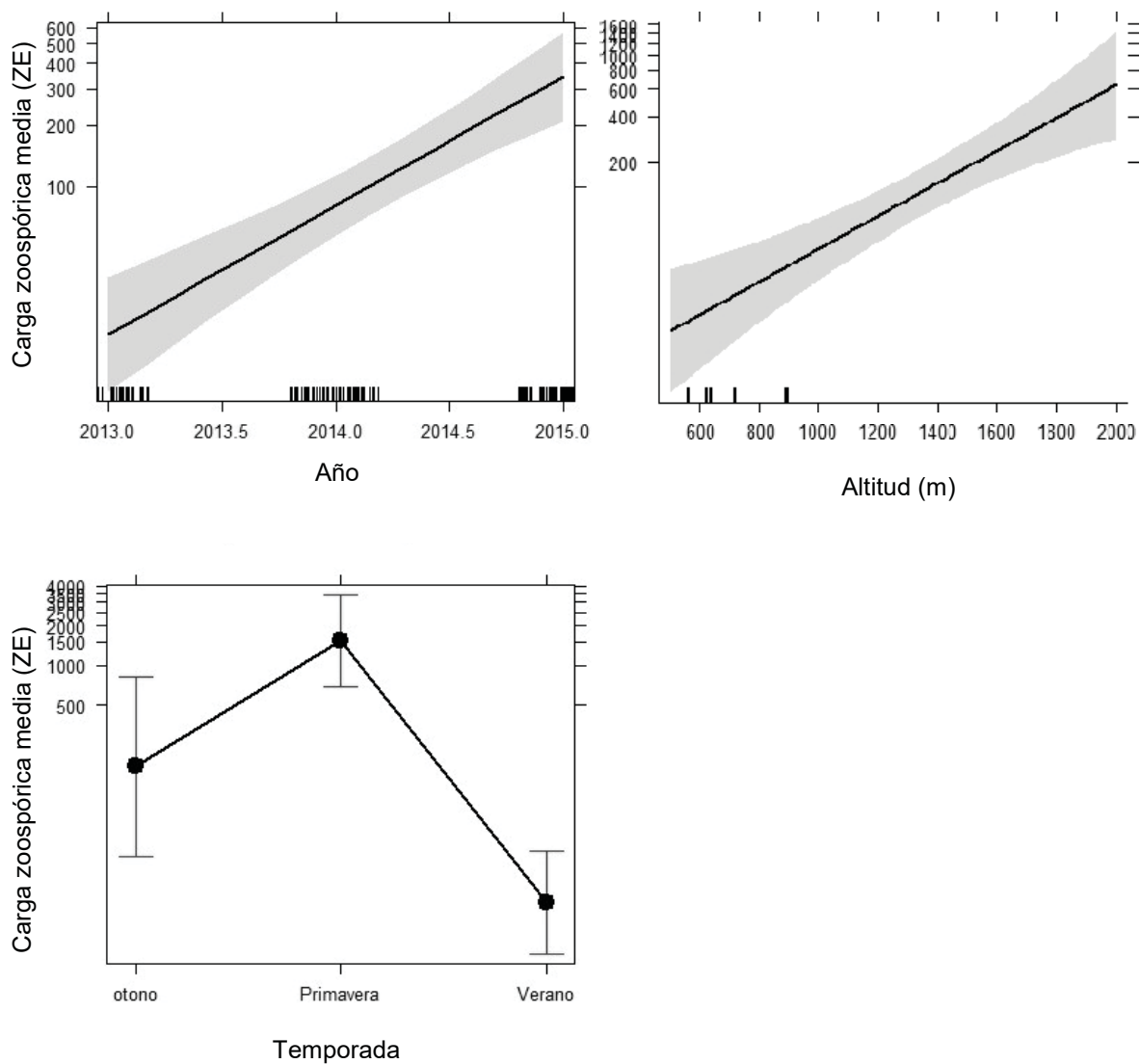


Figura 22. Representación gráfica del efecto de las variables año, altitud y temporada en los valores de carga zoospórica de *B. dendrobatidis* para las poblaciones de *Rana draytonii*, obtenidos del análisis de regresión utilizando un modelo binomial negativo.

7.5 Análisis moleculares

7.5.1 Estructura genética

Microsatélites. En el análisis de agrupamiento "cluster", la gráfica de probabilidad de K (ie. Número de poblaciones) mostró que la meseta de la curva inicia a partir de un $K=4$, alcanzando una mayor probabilidad para un $K=5$ al encontrar el valor más alto de la curva en dicha agrupación (Fig. 23). Bajo este escenario, La Palmita, Meling/Molino, San Antonio y La Grulla, forman cada uno una población independiente, mientras que La Canastilla, El Potrero, Valladares conforman otra población (CaPoVa), y San Antonio presenta mezcla de sus individuos con CaPoVa (Fig. 24). Las poblaciones resultantes están en concordancia geográfica, ya que la población de La Palmita pertenece a la cuenca del San Rafael, la población de Meling/Molino a la cuenca del San Telmo, mientras que la cuenca del Santo Domingo presenta tres subdivisiones: CaPoVa, San Antonio de Murillos y La Grulla. CaPoVa que abarca poblaciones del arroyo tributario del Potrero hasta la parte baja de la cuenca; la población de San Antonio de Murillos está ubicada en la cuenca principal; y la población de la Grulla ubicada en la parte alta de la cuenca del Santo Domingo.

SNPs. Las tres bases de datos utilizadas (100%, 90% y 80%, Tabla IX) mostraron resultados similares, indican que la curva de la grafica inicia la meseta entre $n K=3$ o 4 dependiendo la base de datos, con mayor probabilidad para un $K=5$ (Fig. 23). Bajo este ultimo escenario La Palmita, Meling/Molino, Valladares, San Antonio y La Grulla forman cada uno una población independiente. El Potrero es una población mixta de individuos con genes de Valladares y San Antonio (Fig. 25). La única muestra incluida de la localidad de La Canastilla (primer individuo ubicado en el de San Antonio de Murillos) muestra afinidad por la población de Valladares, tal como se había observado en los datos de microsatélites. En lo que refiere a diferencias entre las bases de datos, la estructura observada fue idéntica para $K=2$. En el $K=3$, la base de datos de 90% y 80% fueron iguales, pero distinta a la base de datos del 100% en que la localidad de Meling/Molino forman

una población junto con las localidades del arroyo Santo Domingo (excepto La Grulla), mientras que para la base de datos de 90-80% Meling/Molino presenta también genes de las poblaciones de La Palmita. De igual manera, para un $K=4$, la base de datos 90-80% fue similar, donde la localidad de Meling/Molino presentaba genes de la población de La Palmita, mientras que la base de datos de 100% no mostraba esta mezcla de genes. Para el $K=6$, cada base de datos fue distinta, la de 100% mostró a cada localidad como una población independiente, con un poco de mezcla de genes de la población del Potrero en individuos de Valladares y La Canastilla; mientras que en las otras bases de datos las poblaciones del Arroyo Santo Domingo (excepto La Grulla) presentan mezcla de genes de dos o tres poblaciones, indicando una subdivisión forzada de las poblaciones.

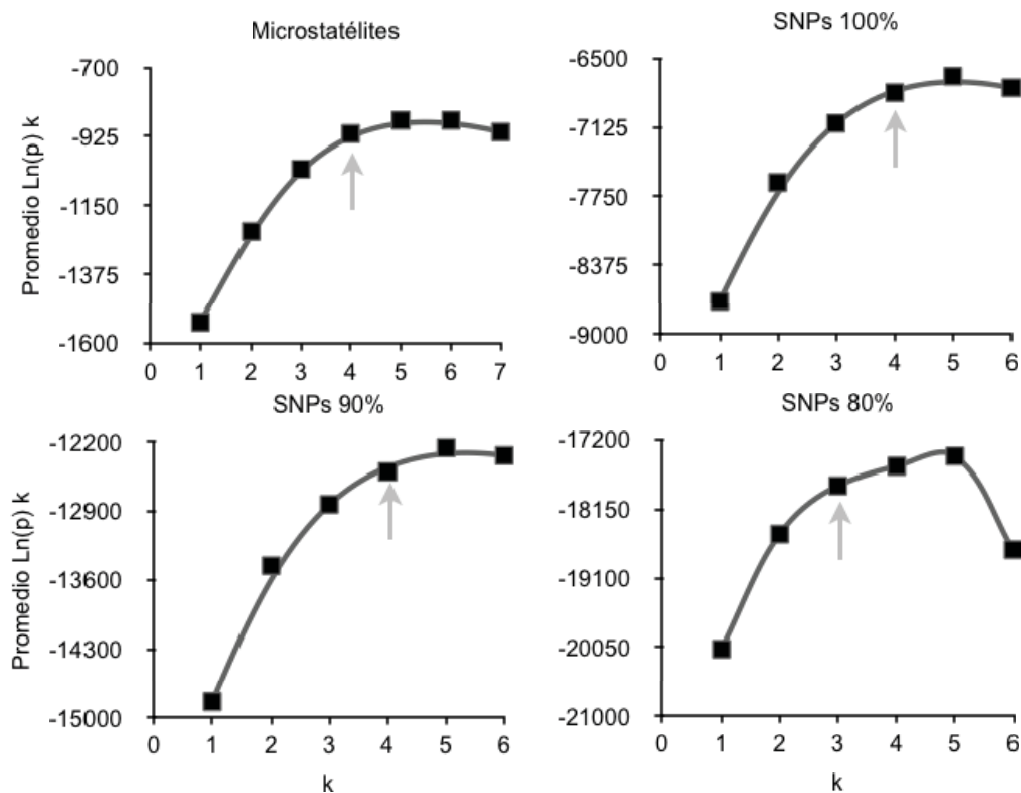


Figura 23. Gráfica de la probabilidad de ajuste de los datos para un valor dado de k , utilizando microsatélites. Las flechas indican el inicio de la asintota de la curva.

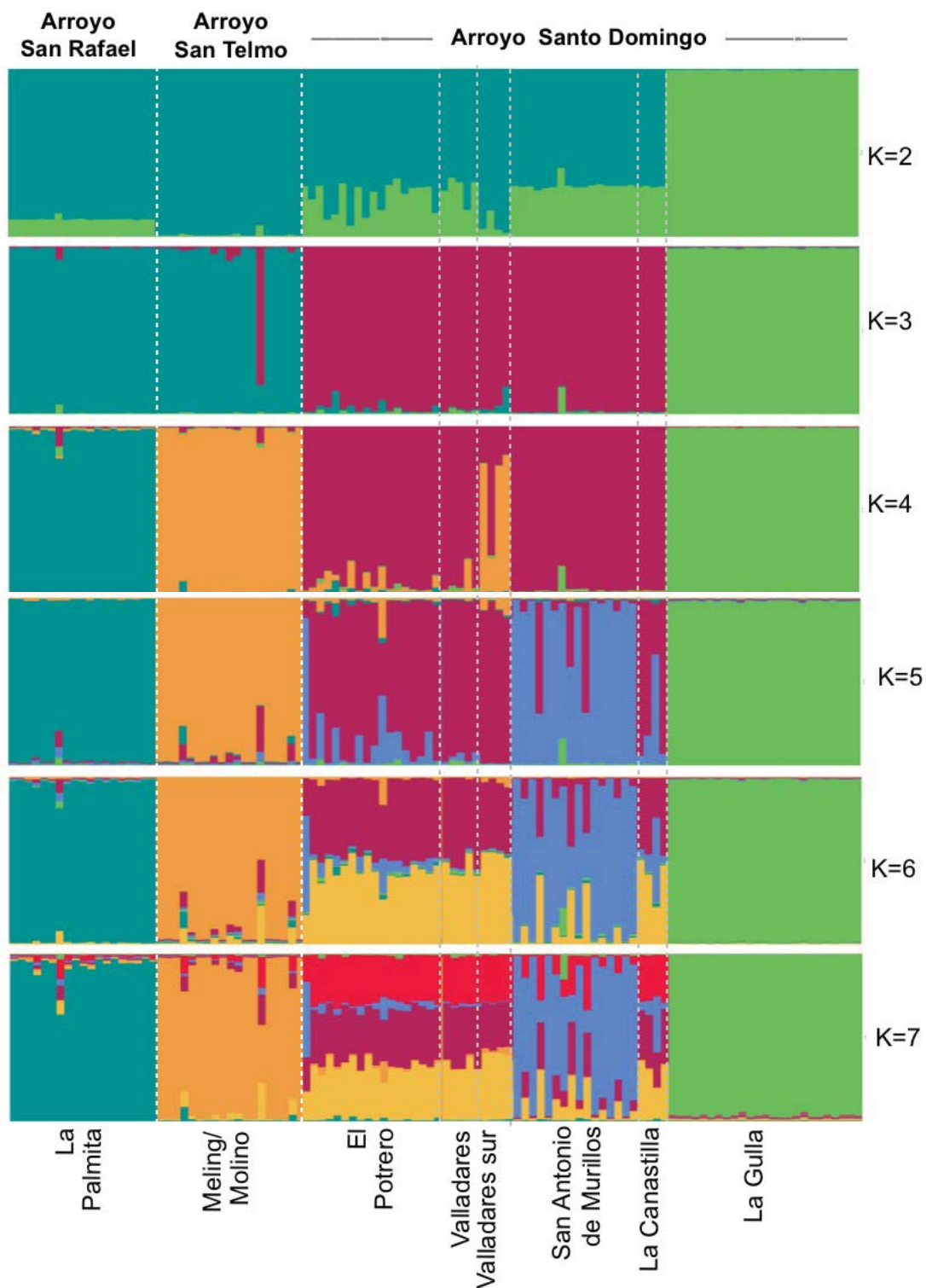


Figura 24. Estructura poblacional inferida entre las localidades de *Rana draytonii* en Baja California por STRUCTURE, basado en datos de microsatélites.

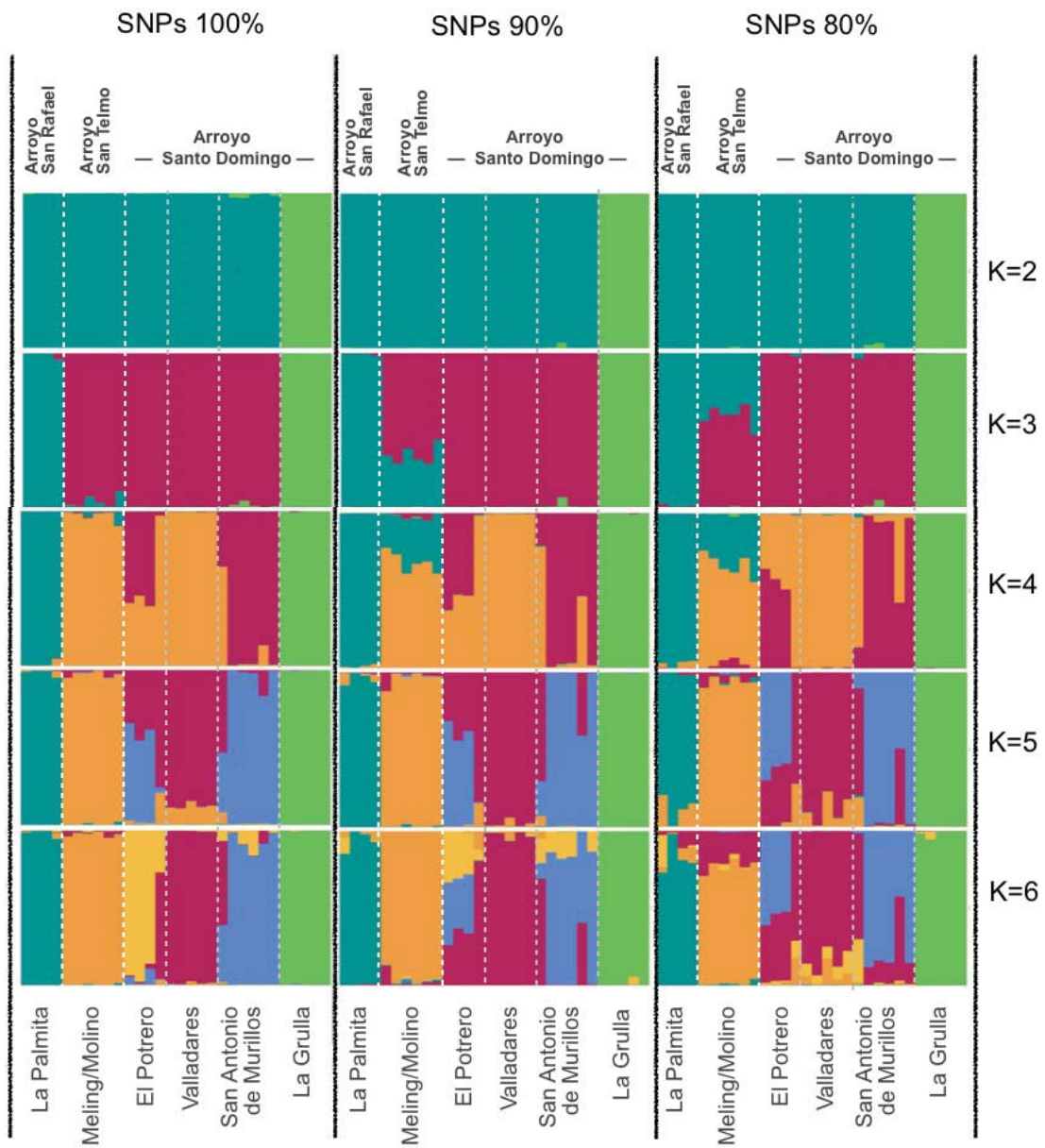


Figura 25. Estructura poblacional inferida entre las localidades de *Rana draytonii* en Baja California por STRUCTURE, basado en datos de SNPs.

Microsatélites vs SNPs. Ambas bases de datos mostraron patrones de similares en la segregación de poblaciones para cada K. Para un K=2, los datos fueron iguales, difiriendo en el grado de mezcla de genes con otras poblaciones. Para un K=3, los microsatélites indicaron que la localidad del arroyo San Telmo (Rancho Meling) forman una población junto con La Palmita, mientras que los SNPs indican que Rancho Meling pertenece a la población del Santo Domingo. En K=4, los microsatélites indicaron una población conformada por La Palmita y Valladares Sur, pero no se observó en los SNPs. En K=5, la diferencia entre microsatélites y SNPs radicó en la agrupación de las localidades del arroyo Santo Domingo (excepto La Grulla), y para un K =6 cada base de datos mostró una conformación diferente (Tabla XIV).

Tabla XIV. Número de poblaciones seleccionadas en base al análisis de STRUCTURE para cada base de datos. + indica que el resto de las localidades se agrupan en una sola población, * indica que la población presenta mezcla de genes de otras poblaciones. Potr: El Potrero, Vall: Valladares, Canas: La Canastilla.

	Microsatelites	SNPs 100%	SNPs 90%	SNPs 80%
K=2	La Grulla +*	La Grulla +	La Grulla +	La Grulla +
K=3	La Grulla (Palmita - Meling) +	La Grulla Palmita +	La Grulla Palmita* +	La Grulla Palmita* +
K=4	La Grulla (Palmita -Vall. sur) Meling +	La Grulla Palmita San Antonio* +*	La Grulla Palmita San Antonio* +*	La Grulla Palmita San Antonio* +*
K=5	La Grulla Palmita Meling (Potr. - Vall. - Canas)* San Antonio*	La Grulla Palmita Meling Valladares* (San Antonio - Potr)*	La Grulla Palmita Meling Valladares* (San Antonio - Potr)*	La Grulla Palmita Meling Valladares* (San Antonio - Potr)*
K=6	La Grulla Palmita Meling (Potr. - Vall. - Canas)* (Potr. - Vall. - Canas)* San Antonio*	La Grulla Palmita Meling Potrero Valladares San Antonio*	La Grulla Palmita Meling Valladares San Antonio-Potr.* San Antonio-Potr.*	La Grulla Palmita* Meling* Valladares* (San Antonio - Potr)*

Reconstrucción filogenética con SNPs. Los análisis apoyaron los siguientes grupos monofiléticos: La Grulla, La Palmita, Meling/Molino y el clado de Santo Domingo (San Antonio + El Potrero + Valladares + La Canastilla; Figs. 26-27). Las topologías utilizando distintos priors son iguales (constante vs exponencial), pero difieren basado en la base de datos (100% y 70%). En la base de datos del 100% San Antonio Murillos es hermano al grupo con muestras de El Potrero, Valladares y la Canastilla (Fig. 26), mientras que la base de datos de 70%, San Antonio y la mayoría de las muestras del Potrero forman un clado hermano a Valladares + La Canastilla + El Potrero. Esta última topología presenta valores de soporte de rama más altos (Fig. 27).

7.5.2 Variabilidad genética

Microsatélites. De los 15 microsatélites desarrollados para las poblaciones de *Rana draytonii* en el sur de California, cuatro de ellos no amplificaron, dos fueron monomórficos y nueve polimórficos. Se obtuvieron un un total de 33 alelos. La Palmita presentó ocho alelos polimórficos, mientras que La Grulla únicamente dos. Los alelos entre los loci variaron de 1 a 6 para cada *locus*. Se observaron alelos privados en las poblaciones de Arroyo San Rafael (tres alelos), Arroyo San Telmo (un alelo), y Arroyo Santo Domingo (cinco alelos). Tanto la riqueza de alelos privados como la riqueza alélica fue mayor para Santo Domingo, y menor para La Grulla (Tabla XV). Se observó una heterocigosidad observada (H_o) entre 0.07 y 0.34, y una heterocigosidad esperada (H_e) entre 0.08 y 0.30. La Grulla mostró los valores más bajos para riqueza alélica, H_e y H_o . Mientras que los valores más altos de riqueza de alelos privados y riqueza alélica fue para el Arroyo San Rafael, mientras que los valores más altos de H_o y H_e fueron para el arroyo Santo Domingo (ver Tabla XV). El coeficiente de endogamia fue significativo para las poblaciones del Santo Domingo y La Grulla. Se observó desviación significativa en el equilibrio de Hardy-Weinberg en tres poblaciones: un *locus* en San Rafael (5371), dos *loci* en El Potrero (5371 y 612), y un *locus* en La Grulla (1140).

SNPs. Se obtuvieron 903 alelos para la base de datos de 100%, 1,659 para la de 90% y 2,351 para la de 80%. Los valores de riqueza de alelos privados fueron muy similares entre las bases de datos, manteniéndose siempre La Grulla con el valor más alto, y Santo Tomas con el más bajo. Tanto la riqueza alélicas, la heterocigosidad observada y la heterocigosidad esperada aumentaron un poco al aumentar el número de loci de cada base de datos (Tabla XV). Para las tres bases de datos, los valores más altos de riqueza alélicas se mostraron en La Palmita, la heterocigosidad más alta fue para Santo Tomas y la Heterocigosidad esperada para Santo Domingo. La Grulla presentó los valores más bajos de riqueza alélicas, heterocigosidad observada y heterocigosidad esperada en las tres bases de datos (Tabla XV). El coeficiente de endogamia fue significativo para la población de Santo Domingo para la base de datos del 100%, pero no para las demás, los cuales mostraron valores negativos.

Microsatélites vs SNPs. Ambas bases de datos mostraron a la Grulla con los valores más bajos de riqueza alélicas, H_o , y H_e , y a Santo Tomas con la menor riqueza de alelos privados. Sin embargo difieren en las poblaciones con los valores altos para el totalidad de los índices. Los microsatélites indican a Santo Domingo con los valores mas altos de riqueza de alelos privados y riqueza alélicas, y a San Rafael con los valores más altos de H_o y H_e ; mientras que los SNPs indican a la Grulla con el valor más alto de riqueza de alelos privados, a San Rafael con la mayor riqueza alélicas, a San Telmo con la mayor H_o , y a Santo Domingo con el valor mas alto de H_e (Tabla XV). Respecto al indice de endogamia, ambas bases de datos indicaron que la población de Santo Domingo presenta valores significantes, mostrando valores de H_o menores a los esperados.

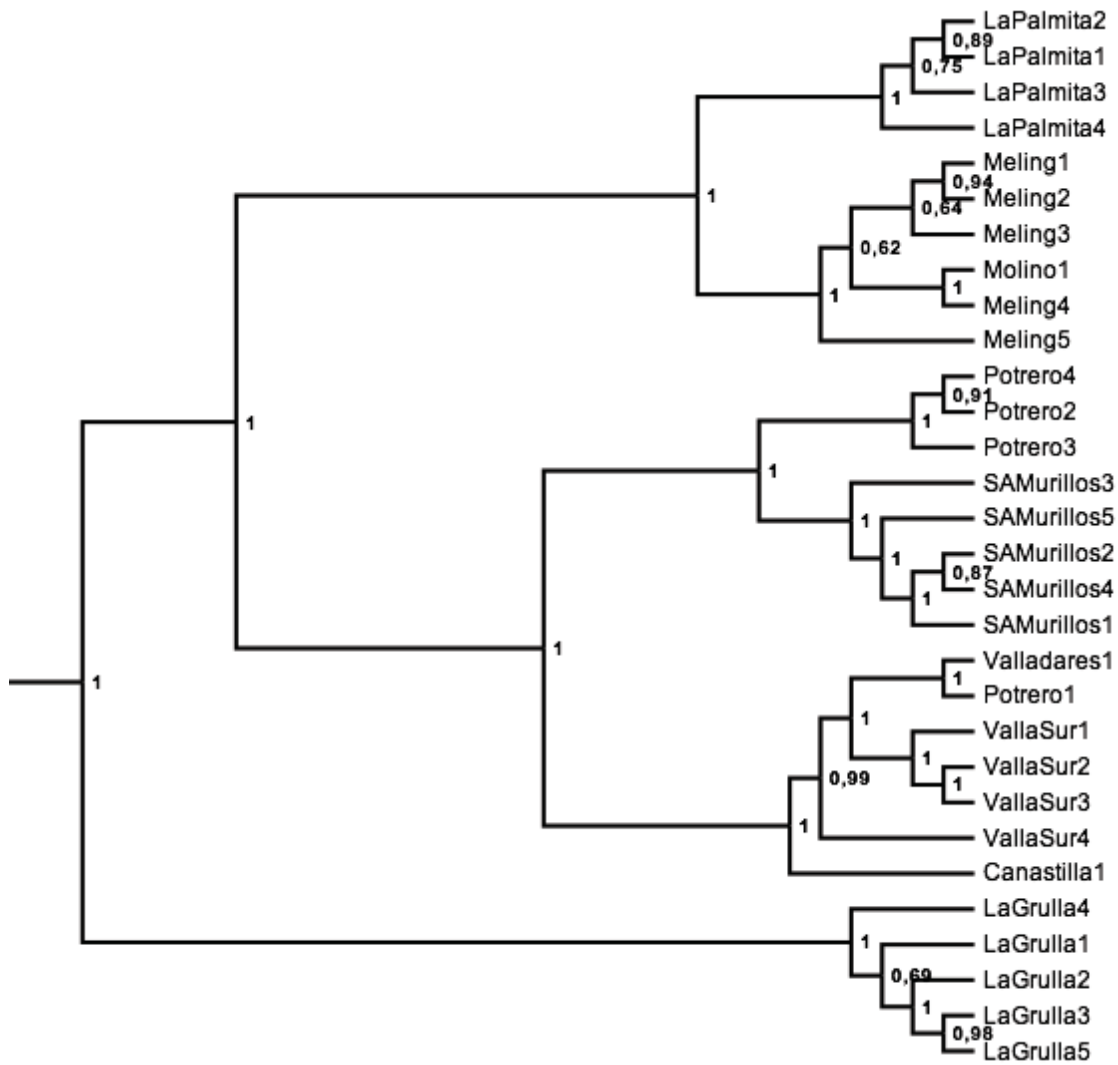


Figura 26. Reconstrucciones filogenéticas de *Rana draytonii* en Baja California. Las topologías para ambos priors (constante y exponencial) fueron las mismas. Se muestra la topología del prior constante para la base de datos 100%.

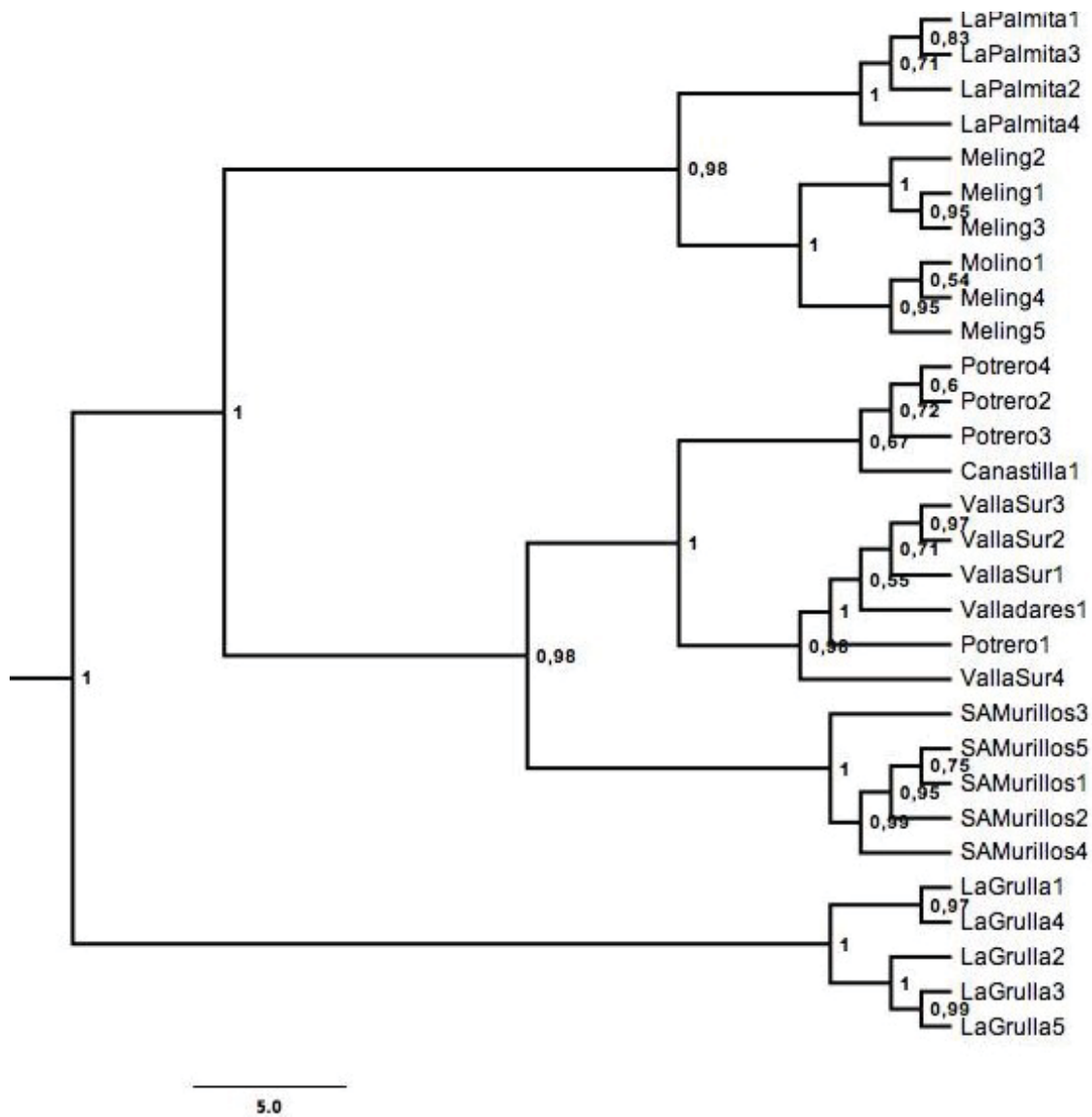


Figura 27. Reconstrucciones filogenéticas de *Rana draytonii* en Baja California. Las topologías para ambos priors (constante y exponencial) fueron las mismas. Se muestra la topología del prior constante para la base de datos de 70%.

Tabla XV. Índices de diversidad genética para poblaciones de Baja California. N: número de muestra, PAr: Alelos privados por rarefacción, Ar: riqueza alélicas por rarefacción, Ho: heterocigosidad observada, He: heterocigosidad esperada, Gis: coeficiente de endogamia.

Localidades	N	PAr	Ar	Ho	He	Gis
Microsatelites						
Arroyo San Rafael	19	0.35	2.09	0.34	0.306	-0.109
Arroyo San Telmo	19	0.09	1.55	0.144	0.154	0.067
Arroyo Santo Domingo	47	0.39	2.38	0.263	0.286	0.082*
La Grulla	25	0.11	1.18	0.071	0.084	0.156*
SNPs 100%						
Arroyo San Rafael	4	0.1	1.2	0.16	0.155	-0.036
Arroyo San Telmo	6	0.06	1.16	0.167	0.153	-0.093
Arroyo Santo Domingo	15	0.08	1.17	0.165	0.173	0.047*
La Grulla	5	0.11	1.12	0.132	0.11	-0.092
SNPs 90%						
Arroyo San Rafael	4	0.09	1.2	0.173	0.164	-0.054
Arroyo San Telmo	6	0.06	1.18	0.191	0.169	-0.131
Arroyo Santo Domingo	15	0.08	1.18	0.187	0.183	-0.024
La Grulla	5	0.1	1.15	0.173	0.144	-0.202
SNPs 80%						
Arroyo San Rafael	4	0.09	1.22	0.183	0.174	-0.053
Arroyo San Telmo	6	0.06	1.2	0.215	0.187	-0.149
Arroyo Santo Domingo	15	0.07	1.2	0.205	0.195	-0.049
La Grulla	5	0.1	1.19	0.197	0.162	-0.213

7.5.3 Diferenciación genética

Microsatelites. Los valores de F_{st} entre las poblaciones variaron entre 0.61 para La Grulla y El arroyo San Rafael, y 0.28 para el Arroyo San Telmo y el Arroyo Santo Domingo (Tabla XVI). Los valores de F_{st} fueron significativos para el total de las comparaciones entre localidades ($p < 0.001$)

SNPs. Los valores de F_{st} entre las poblaciones variaron entre 0.14 y 0.51 para la base de datos de 100%, de 0.10 a 0.40 para la de 90%, y de 0.08 a 0.36 para la de 80%. Las poblaciones con los valores mas altos fueron para La Grulla y San

Rafael, y los mas bajos para San Telmo y Santo Domingo en las tres bases de datos. Aunque los valores de F_{st} fueron disminuyendo conforme aumentaba el número de loci, los vales se mantuvieron significativos para el total de las comparaciones entre localidades ($p < 0.01$).

Microsatélites vs SNPs. Ambas bases de datos mostraron valores de F_{st} significantes entre las poblaciones. Ambas mostraron a las poblaciones de San Telmo y San Rafael como las poblacones menos diferenciadas, difiriendo en la selección de las poblaciones mas distantes, siendo para microsatélites La Grulla y San Telmo, mientras que para los SNPs La Grulla y San Rafael.

Tabla XVI. Valores de F_{st} entre cada par de localidades de *Rana draytonii* en Baja California. Sobre la diagonal se indican los valores de F_{st} , bajo la diagonal el nivel de significancia (en negritas se indica significancia $p \leq 0.05$).

Microsatelites	1	2	3	4
1) San Rafael	--	0.39	0.33	0.61
2) San Telmo	<0.001	--	0.28	0.67
3) Santo Domingo	<0.001	<0.001	--	0.44
4) La Grulla	<0.001	<0.001	<0.001	--
SNPs 100%				
1) San Rafael	--	0.281	0.288	0.517
2) San Telmo	0.005	--	0.142	0.468
3) Santo Domingo	<0.001	<0.001	--	0.384
4) La Grulla	0.008	0.002	<0.001	--
SNPs 90%				
1) San Rafael	--	0.195	0.205	0.401
2) San Telmo	0.005	--	0.109	0.350
3) Santo Domingo	<0.001	<0.001	--	0.296
4) La Grulla	0.008	0.002	<0.001	--
SNPs 80%				
1) San Rafael	--	0.156	0.180	0.369
2) San Telmo	0.005	--	0.086	0.299
3) Santo Domingo	<0.001	<0.001	--	0.255
4) La Grulla	0.008	0.002	<0.001	--

7.5.4 Comparación con poblaciones de California

Para la comparación entre las cinco zonas, las pruebas de Kruskal-Wallis, mostraron diferencias significativas entre las zonas comparadas (Sierra Nevada, San Francisco, Sur de California, Sur de California aisladas, y Baja California) para los valores de heterocigosidad esperada ($p=0.0043$) y heterocigosidad observada ($p=0.0088$). Las gráficas de cajas y bigotes se puede observar como los valores de dichos índices para Baja California son más bajos que en el resto de las poblaciones (Fig. 28). El anexo M muestra los valores de diversidad genética utilizados para las poblaciones de California. (Richmond *et al.*, 2013, 2014).

Respecto a la comparación entre Baja California y las dos subpoblaciones del sur de California utilizando sólo 11 microsatélites, las pruebas de Kruskal-Wallis mostraron diferencias significativas entre las zonas comparadas, tanto para los valores de riqueza alélicas ($p=0.004$) heterocigosidad esperada ($p=0.007$) y heterocigosidad observada ($p=0.009$). Así mismo la prueba de diferenciación de grupos en Genodive también fue significativa para H_o y H_e ($p < 0.01$). En las gráficas de cajas y bigotes se puede observar como los valores de dichos índices para Baja California son más bajos que en el resto de las poblaciones (Fig. 29).

Finalmente la comparación utilizando la base de datos de 1,889 SNPs que incluye las poblaciones aisladas del sur de California y Baja California también mostró diferencias significativas en los valores de H_o y H_e ($p < 0.01$). En las gráficas de cajas y bigotes se puede observar como los valores de dichos índices para Baja California son más bajos que en las poblaciones aisladas del sur de California (Fig. 30).

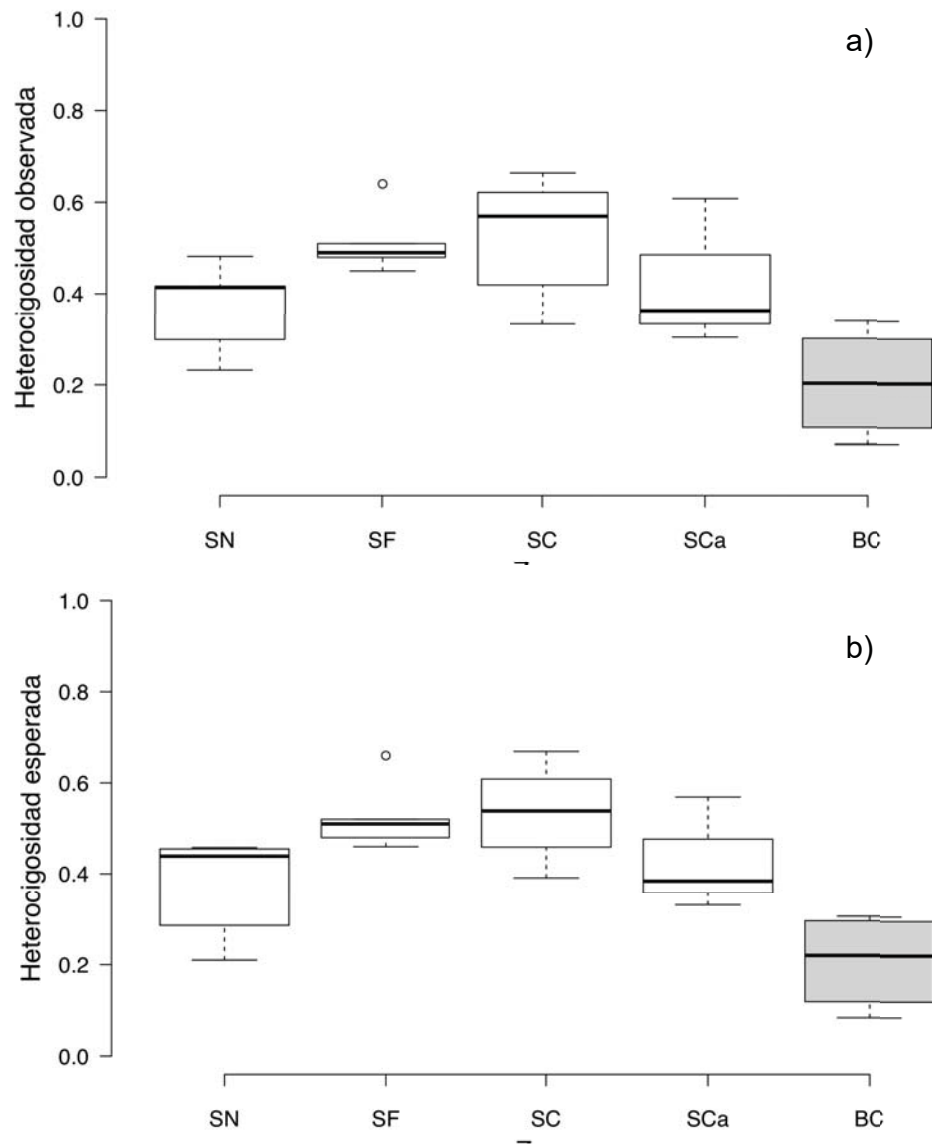


Figura 28. Gráfica de cajas y bigotes para los valores de a) Heterocigosidad observada, b) Heterocigosidad esperada, para cinco zonas dentro de la distribución de *Rana draytonii*. Baja California se muestra en gris claro. SN: Sierra Nevada, SF: San Francisco, SC: Sur de California, SCa: Sur de California poblaciones aisladas, BC: Baja California.

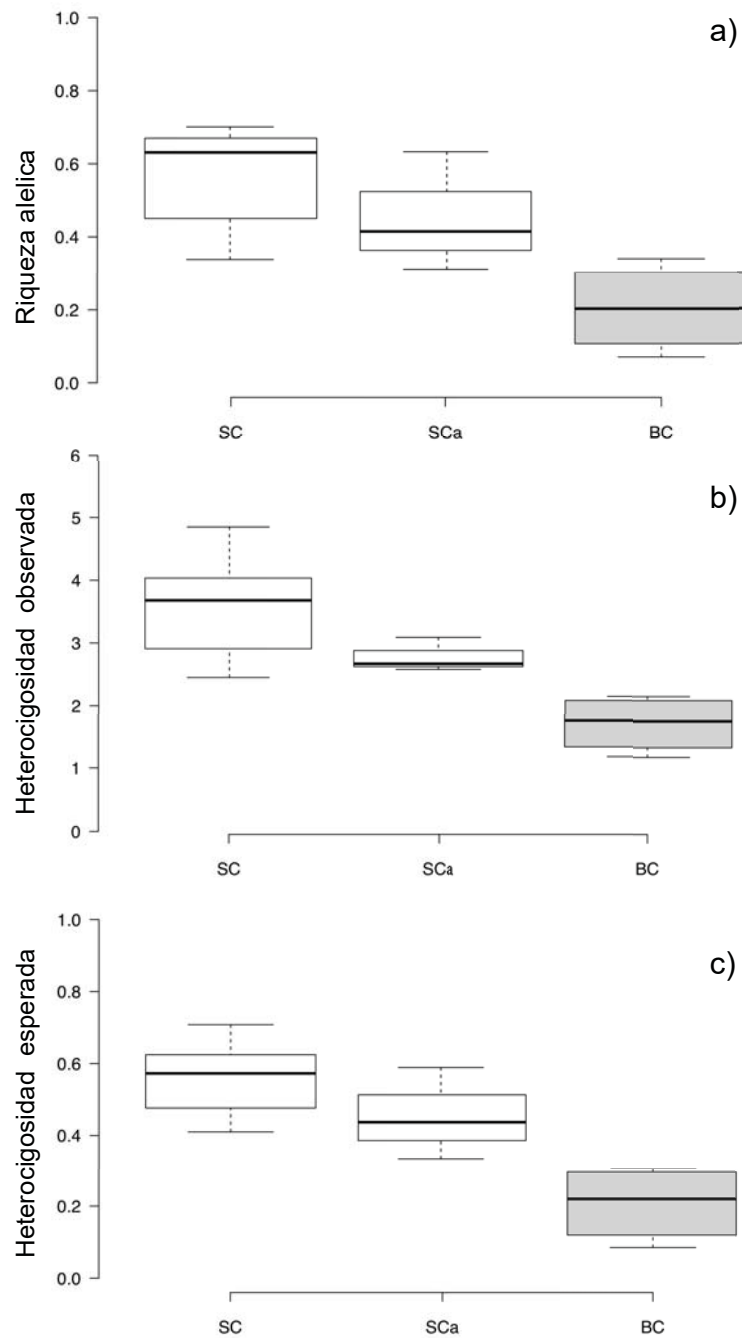


Figura 29. Gráfica de cajas y bigotes para los valores de a) Riqueza alélica b) Heterocigosidad observada, c) Heterocigosidad esperada, utilizando datos de 11 microsatélites. SC: Sur de California, SCa: Sur de California poblaciones aisladas, BC: Baja California.

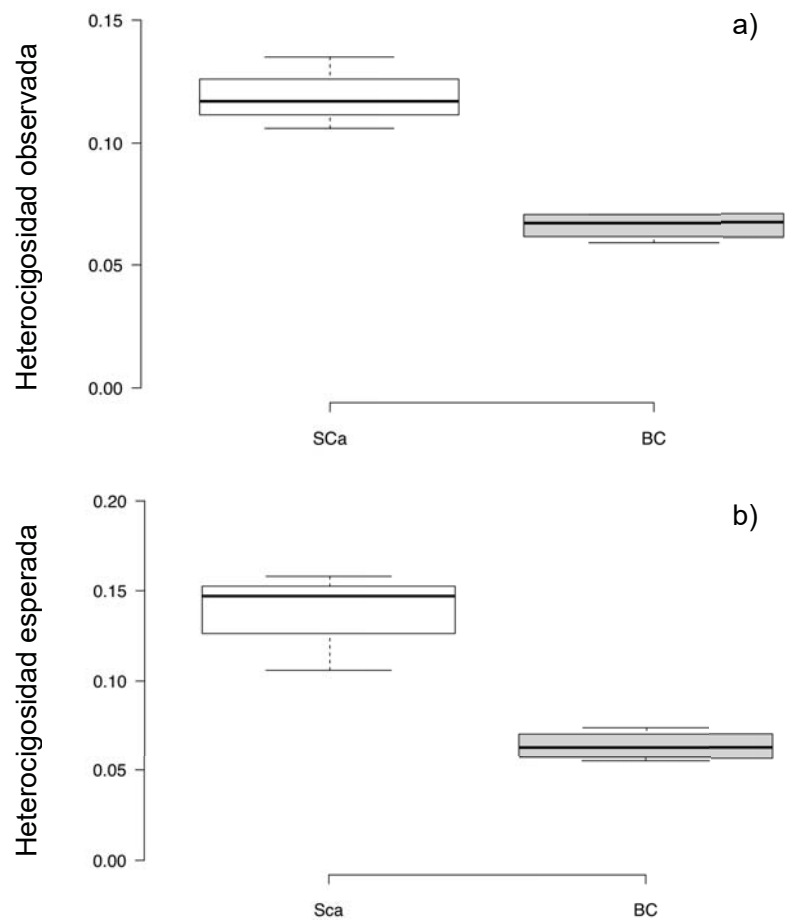


Figura 30. Gráfica de cajas y bigotes para los valores de a) Heterosigocidad observada, b) Heterocigosidad esperada, utilizando 1,889 SNPs. SCa: Sur de California poblaciones aisladas, BC: Baja California (en color gris).

8. DISCUSIONES

8.1 Distribución actual de *Rana draytonii*

En el presente estudio se detectó a *R. draytonii* en 10 de los 44 sitios de muestreo a través de la distribución histórica en Baja California, además de encontrar evidencia de reproducción (huevos, renacuajos o metamórficos) en cinco sitios (22, 32, 35, 39 y 43, Anexo B). A pesar de que el esfuerzo de muestreo indica que la especie probablemente no ocurra fuera de la Sierra San Pedro Mártir, su persistencia en dicha zona representa un avance positivo para la conservación de la especie. En este contexto *R. draytonii* probablemente se encuentra extirpada de 14 de las localidades históricas, reduciendo su distribución en un 85% de la registrada para Baja California por Grismer (2002).

De la frontera con Estados Unidos hacia al sur hasta arroyo San Vicente, encontramos que *R. draytonii* está ausente en 22 localidades, incluyendo cinco sitios históricos. El índice de amenazas indica que 16 de estos sitios presentan valores de amenazas mayores a sitios donde se localizó la especie, dentro de estos sitios se encuentran cuatro localidades históricas (Tecate, San Carlos, Santo Tomás y San Vicente, Anexo K). Desafortunadamente en esta región encontramos la mayor concentración de especies acuáticas exóticas (Fig. 13). Christopher (2004) encontró que las poblaciones de *R. draytonii* que coexistían con peces o rana toro introducidos representaban poblaciones sumidero, donde la tasa de crecimiento era cero, y la única forma en que estas poblaciones subsistían era mediante la migración de individuos por poblaciones fuente libre de exóticos. Con base en esta información, se disminuye la probabilidad de encontrar poblaciones de esta especie en la parte norte de la distribución, dado la alta dispersión de especies exóticas en la zona, las poblaciones de *R. draytonii* remanentes se convertirían en poblaciones sumidero, y no sería posible soportar una población viable (Danielson, 1992). La zona con menor número de exóticos es la región de Sierra Juárez, sin embargo varias de las localidades que ahora no tienen exóticos

(ie. La Calabaza), históricamente tuvieron poblaciones de la rana toro *L. catesbeianus* (comm. pers. rancheros locales), por lo que desconocemos si su introducción pudo haber afectado en su momento las poblaciones de *R. draytonii*. Aún es necesario ampliar muestreos en la región de Sierra Juárez para determinar la extensión de especies exóticas en dichos arroyos, y confirmar la ausencia de la especie en aquellos sitios donde los valores del índice de amenaza fue similares a sitios donde la especie está presente (i.e. Rancho la Casa Verde y La Calabaza, Fig. 19).

Aunque la falta de detección de la especie en la parte norte de la distribución, no necesariamente significa la ausencia de la misma, particularmente en los casos donde se realizó un solo muestreo. Cabe señalar que la mayoría de los sitios visitados constituían áreas pequeñas que podían muestrearse por completo en una sola visita. En nueve de los 10 sitios donde se encontró *R. draytonii*, fue encontrada durante el primer muestreo. La ausencia de detección de la especie en la parte norte de su distribución se pudo evidenciar la extirpación de poblaciones, o bien que los números de individuos eran tan bajos en ciertas zonas que los muestreos fueron insuficientes para detectarlos. A pesar de esto, las observaciones sugieren que *R. draytonii* ha experimentado declives de poblaciones en la parte norteña de su distribución en Baja California.

La mayoría de los registros históricos de *R. draytonii* en Baja California se localizan en la Sierra San Pedro Mártir, donde la especie fue considerada abundantemente a principios de los años 1980's (Welsh, 1988). Los muestreos no detectaron ranas de patas rojas en nueve sitios históricos, tres sitios presentaron poblaciones trascoladas de la trucha nativa de la sierra (dos sitios en la parte alta de arroyo San Rafael, y Rancho Viejo), en tres sitios más, el hábitat ha desaparecido, careciendo de agua superficial necesaria para la subsistencia de hábitat (ie. Ejido Benito Juárez, San Ramón, y Misión Santo Domingo). Los niveles de extracción de agua de estas últimas localidades exceden la recarga anual promedio, provocando la desaparición del agua superficial permanente en la zona

(SEMARNAT, 2015). Una gran cantidad de pozos de agua se observaron en el arroyo San Rafael (>60 pozos en un transecto de 20 km en el ejido Benito Juárez), la mayoría para fines de agricultura (com. Pers Roberto González). En Mayo del 2002 y Mayo del 2003, Fidenci (2004) muestreó la cuenca del Santo Domingo, en las localidades de Misión Santo Domingo, Rancho Valladares y El Potrero. En la parte de la Misión Santo Domingo encontró numerosos renacuajos de *R. draytonii*, pero no adultos. En Julio de 2013, esta zona estaba seca y los residentes indicaron que el arroyo únicamente fluye durante las fuertes lluvias. El muestreo se realizó 12.5 km arroyo arriba, donde se encontró agua superficial y varias pozas, aquí se observaron cuatro metamórficos. En Valladares, Fidenci durante el 2003 no encontró *R. draytonii*, en nuestros muestreos se capturaron cinco ranas en una pequeña poza al lado del arroyo. Es posible que *R. draytonii* utilice Valladares como corredor durante las épocas más húmedas del año, dado que las pozas en esta sección del arroyo se secan durante el verano. Finalmente, en el Potrero localizado a elevación media, logramos capturar *R. draytonii* (aunque en número menores a Fidenci).

En relación a la población de mayor elevación registrada para la especie, el último espécimen de *R. draytonii* de la Encantada fue observado por Welsh (1988) en 1974. Mientras que el último ejemplar colectado es del 8 de julio de 1945 (SDNHM 36457, Anexo A). En 1913, 113 especímenes (renacuajos y adultos) fueron recolectados en este mismo sitio (colección de CAS, Anexo A). Actualmente el hábitat consiste de un humedal sin vegetación, con un arroyo canalizado, y *R. draytonii* parece estar extirpada.

Es importante mencionar que a pesar de que el número de ranas observadas en cada localidad fue bajo (a excepción de La Grulla), es imposible concluir el estado actual de las poblaciones, dado que muestreos posteriores a algunos de los sitios dio una perspectiva de aumento en el número de ranas adultas (ie. San Rafael 2014: 6 ranas, 2015: ~ 30 ranas; El Potrero 2013: 7 ranas, 2014: 14 ranas; Rancho Meling 2013: 9 ranas, 2016: ~23 ranas), indicando una posible

recuperación de las poblaciones. Esto quizá indica que en el 2013 (principal año de muestreo) las poblaciones se encontraban en el punto bajo de un ciclo de densidad, como respuesta a algún evento no evaluado (*ie.* lluvias extremas del 2010). La capacidad de respuesta y repoblación de la especie ha sido observada en la localidad de San Francisquito en Estados Unidos, donde la población fue reducida a < 20 individuos después de un incendio en el hábitat, y años después, los muestreos mostraron > 100 individuos en la población (Richmond *et al.*, 2014). En lo referente al tamaño y peso de los adultos encontrados en Baja California, estos se encuentran dentro del rango observado en poblaciones de California (Adam Backlin, datos in publicar).

Las variables ambientales indicadas por los análisis concuerdan con variables conocidas para las poblaciones estudiadas en California, tal como la presencia de vegetación acuática y el porcentaje de pozas medias (Alvarez *et al.*, 2004; Hecnar y M'Closkey, 1996; Jennings y Hayes, 1994). Aunque el potencial de iones de hidrógeno (pH) fue una variable que mostró diferencias únicamente en el análisis de rangos de Wilcoxon, se ha visto que esta variable es importante en aspectos de reproducción para la especie (D'Amore *et al.*, 2010).

La detección de correlación entre la lejanía al poblado y la presencia de actividades antropogénicas permitió parcialmente aceptar la hipótesis nula de lejanía y amenazas, sin embargo tal correlación no se observó en el total de las variables, y el grado de correlación en el 80% de las variables fue bajo ($R^2 < 0.5$). El grado de ganadería no fue significativo en relación a la distancia al poblado ($p = 0.09$), dado que esta actividad se encuentra dispersada a lo largo de la península, tanto en sitios cercanos a la ciudad, como remotos.

A pesar de que se pensó que la lejanía del sitio explicaría mejor la presencia de la *R. draytonii*, realmente fueron cuatro las variables antropogénicas (constituyentes del índice antropogénico B) que resultaron significativas para la determinar la presencia de la especie. Tales variables incluyeron la distancia al

poblado, el porcentaje de área natural, el grado de ganadería y el número de especies exóticas. Siendo la segunda y última variable las que aportan el mayor porcentaje al índice de amenazas (32% cada una).

En lo que refiere a la distancia al poblado, pocos estudios refieren a esta variable como importante para explicar la presencia y abundancia de la rana de patas rojas, sin embargo D'Amore *et al.* (2010), encontraron una relación negativa entre la distancia a caminos y la presencia de *R. draytonii*. En el presente estudio la variable Distancia a Caminos fue altamente correlacionada (>98%) con Distancia a Poblado (por lo que dicha variable fue removida de los análisis). Dada la correlación de esta variable con la presencia de amenazas, es posible que la Distancia al Poblado sea significativa en el sentido de que el hábitat se encuentra menos perturbado.

La importancia para *R. draytonii* de la variable Porcentaje de Área Natural ha sido observada por Davidson *et al.* (2002) en un análisis para la distribución total de la especie. Por su parte, Rowe y García (2014) encontraron que la comunidad nativa de anuros en Oregón está relacionada negativamente con las variables de Porcentaje de Área Urbana y Presencia de Invasores (plantas invasoras, peces exóticos y Rana toro). Por su parte Riley *et al.* (2005) encontraron que un porcentaje de urbanización del 8% disminuía la riqueza de anfibios nativos en California. Por lo que nuestros datos confirman que la pérdida de hábitat afecta negativamente a la especie tanto en California como en Baja California.

En lo referente a especies exóticas, existen varios estudios que demuestran su efecto específicamente en *R. draytonii*. Se ha observado que la rana toro se alimenta tanto de renacuajos como juveniles, existiendo una correlación negativa con la presencia de *R. draytonii*, siendo esta correlación más fuerte en el Sur de California donde la rana toro está ampliamente distribuida (Hayes y Jennings, 1989; Doubledee *et al.*, 2003). Sin embargo Christopher (2004) mostró que los peces introducidos tienen un mayor impacto en la abundancia y presencia de *R.*

draytonii que la rana toro o los langostinos en la región de San Francisco. Por su parte modelos ocupacionales también han indicado la disminución de probabilidad de ocurrencia de *R. draytonii* ante la presencia de peces exóticos (Joseph *et al.*, 2016). Acciones de erradicación de peces exóticos han documentado el aumento significativo de la abundancia de renacuajos y metamórficos de *R. draytonii* a tan solo un año de la erradicación (Alvarez *et al.* 2004; Lee, 2010). Debido al impacto que los peces exóticos pueden tener en el ecosistema, se ha hablado de que son especies exóticas claves, ya que pueden ocasionar la extirpación de poblaciones en tan solo un par de años (Adams, 1999; Christopher, 2004)

En Baja California la rana toro no se encuentra tan ampliamente distribuida como en California, por lo que su presencia no pudo ser un factor primordial en su declive, a excepción de la región de Ensenada-Valle de Guadalupe, donde la Rana toro está establecida al parecer desde los años 1970's. Los datos en Baja California parecen concordar con los observados por Chirstopher (2004) ya que el 70% de los sitios históricos sin presencia actual de *R. draytonii* presentan peces exóticos, y el 90% de los sitios actuales donde se observaron individuos no presentan especies exóticas. Únicamente La Canastilla presenta el pez sol exótico (*Lepomis cyanellus*); en ese lugar se observaron cuatro metamórficos los cuales pudieron provenir de sitios carentes de exóticos. Por otro lado, se desconoce el efecto que las truchas endémicas traslocadas en la parte alta del Santo Domingo y en el arroyo San Rafael han tenido sobre las especies nativas de la zona, al menos tres sitios históricos en San Pedro Mártir donde no se observó la Rana, presenta la trucha trascolada (localidad 27,28,33,36 en Anexo B). Sin embargo, estudios previos de contenidos estomacales de truchas durante un ciclo anual no encontraron a la rana nativa *R. draytonii* como parte de su espectro alimentario en el Arroyo La Grulla (Cirilo-Sánchez y Ruiz-Campos, 1987; Ruiz-Campos, 1993) y el Arroyo San Rafael (Ruiz-Campos y Cota-Serrano, 1992). En California, las truchas introducidas han causado efectos adversos en la *Rana temporaria*, *Rana sierrae*, *Rana muscosa* (Nystrom *et al.*, 2001; Knapp *et al.*, 2007; Vredenburg,

2004), por lo que a pesar de que no existe evidencia de que la trucha traslocada puede estar afectando a la rana de patas rojas, se considera importante realizar estudios más específicos sobre la interacción y posibles efectos entre la trucha traslocada y *R. draytonii*.

En Baja California aunque los peces son el taxa exótico más común en los ecosistemas riparios (42 de 53 sitios con reporte de exóticos, Anexo G), el langostino rojo *Procambarus clarkii* está también ampliamente distribuido (25 sitios, Anexo G y H). Diversos estudios han observado que aunque los langostinos no depredan directamente sobre los renacuajos, si les producen lesiones que podrían ser letales, resultando en una disminución de la sobrevivencia de renacuajos (Christopher, 2004; Nyström *et al.*, 2001); así mismo, reducen la disponibilidad de refugio al disminuir la cobertura de macrofitas acuáticas (Nyström *et al.*, 2001); o pueden excluir a los renacuajos de sus refugios, lo cual aumenta la depredación por otros depredadores.

A pesar del efecto que las especies exóticas tienen sobre las poblaciones de *R. draytonii*, aún existen poblaciones en California donde ambas especies co-existen. Estudios en estas poblaciones han mostrado que *Rana draytonii* únicamente puede subsistir en estos sitios cuando existe alta conectividad con otros sitios libres de exóticos (Christopher, 2004), observando que las poblaciones con exóticos representan poblaciones que en la teoría de meta-poblaciones se les conoce como sumidero, las cuales únicamente subsisten de poblaciones fuentes, en este caso son poblaciones libres de exóticos que emigran a poblaciones sumidero (Christopher, 2004; Hanski y Simberloff, 1977)

Respecto a la variables de ganadería, existen numerosos estudios sobre los efectos que la ganadería, específicamente el pastoreo ocasiona en los humedales. Es conocido que el ganado disminuye la vegetación y con ello la disponibilidad de refugio; altera la fisicoquímica del agua, ya que los desechos del ganado producen cambios en la conductividad, turbidez, concentración de amonio, nitritos, y

disminuye la concentración de oxígeno (Burton *et al.*, 2010). Los niveles elevados de amonio disminuyen la sobrevivencia de larvas de anfibios, disminuye tamaños corporales, o produce malformaciones (Jofre y Karasov, 1999; Joseph *et al.*, 2016). Adicionalmente se ha detectado una mayor probabilidad de infección con *Ranavirus* a poblaciones con impacto de pastoreo (Gray *et al.*, 2007; Hoverman *et al.*, 2012).

Estudios de exclusión de hábitat en sitios con pastoreo han detectado mejoras en las poblaciones de anfibios; entre ellas, aumento en el número de metamórficos de *Rana clamitans* (Burton *et al.*, 2010; Schmutzer *et al.*, 2008), renacuajos y masas de huevos de *Hyla versicolor* y *Pseudacris crucifer* (Kunutsen *et al.*, 2004), y abundancia de renacuajos *Rana catesbeiana* (Schmutzer *et al.*, 2008). Adams y colaboradores (2009) por otro lado, no encontraron diferencias entre pozas con exclusiones y sin exclusiones de ganado en Oregón respecto al número de masas de huevos, sobrevivencia de renacuajos, o tamaño de ranas metamórficas, sin embargo tales diferencias pueden deberse a la cantidad de ganado presente, ya que en dicha zona el ganado se encuentra en una densidad de ~0.1 vacas/ha, a comparación de otros estudios donde la densidad era de ~ 100 vacas/ha (Burton *et al.*, 2010). Para la localidad de La Grulla y La Encantada en la Sierra San Pedro Mártir, el número de ganado oscila entre 500 y 1000 cabezas en un área de 300 ha (~ 3.3 vacas/ha).

Una variable que no resultó significativa es la distancia a agricultura, esta variable es altamente significativa en el declive de la especie y otros anuros nativos en California, existiendo múltiples estudios que muestran una relación negativa entre agricultura y la presencia/abundancia de anfibios nativos, incluyendo *Rana draytonii* (D'Amore *et al.*, 2010; Davidson, 2004; Davidson *et al.*, 2002). La falta de concordancia puede deberse a la forma de realizar la medición de esta variable, ya que en los estudios de California se consideró la dirección de los vientos respecto a la presencia de sitios de agricultura, y se realizaron buffers de hasta 100 km, por lo que una medida de distancia a los sitios de agricultura

puede no resultar significativa si la población no se encuentra en la zona de influencia de los vientos. Aunado a esto, en California se contaba con la base de datos de agroquímicos utilizados en los campos de cultivo, información que no está disponible en nuestro país, por lo que el efecto de los campos de agricultura y sus químicos asociados en el declive de *R. draytonii* en Baja California aún se desconoce.

En cuanto a la detección de quitridiomycosis en poblaciones de *Rana draytonii*, esta se detectó en el 100% de las localidades. Esto indica la presencia de una amenaza más a sus poblaciones y es importante darle seguimiento. Estudios en California indican que *R. draytonii* no sufre una afectación por quitridiomycosis como otras especies presentando cargas zoosporicas bajas sin aparente afectación (Padgett-Flohr, 2008). En Baja California todas las poblaciones presentaron cargas zoosporicas bajas (media 192 ZE, Tabla XI), lejanas a las establecidas como letales (30,000 ZE, Kinney *et al.*, 2011; Vredenburg *et al.*, 2010), lo cual parece concordar con lo encontrado en poblaciones de California. A pesar de que el objetivo de este trabajo era únicamente determinar la presencia de *Bd* en las poblaciones, los datos muestran algunos patrones observados en otros estudios. Los análisis de regresión mostraron que las variables de Altitud, Temporalidad y Año de muestreo fueron significantes para explicar el número de zoosporas. Otros estudios también han observado el efecto de temporalidad y altitud en sus estudios (Lanoo *et al.*, 2011), lo cual es explicado por los requerimientos térmicos del hongo, al preferir bajas temperaturas y altos niveles de humedad las cuales son más óptimas en los meses más fríos (Berger *et al.*, 2004; Drew *et al.*, 2006; Kriger *et al.*, 2007). El incremento anual, sin embargo, es algo poco común, aunque son pocos los estudios en años sucesivos, Fellers *et al.* (2011) observaron una disminución de la prevalencia de *Bd* en tres años, hipotetizando el desarrollo de una resistencia a la infección (Longcore *et al.*, 2007). El aumento anual en poblaciones de Baja California, aunque debe ser tomado con precaución debido a que únicamente presenta un periodo de muestreo de tres

años, indica la importancia de monitores periódicos de las poblaciones, especialmente en las épocas de primavera, donde se observaron los valores zoospóricos más altos, el modelo resultante indica que La Grulla podría alcanzar valores zoospóricos letales (i.e. 30,000 ZE) en el año 2018 si la tendencia continúa. A pesar de que se mostraron valores promedio menores para juveniles, estos no fueron significativos. Otros factores que se han detectado como importantes en la probabilidad de infección los cuales no fueron considerados son la densidad de individuos o renacuajos (Rachowickz y Briggs, 2007), sin embargo, esta variable está más ligada a ambientes lenticos. A pesar de que aparentemente *R. draytonii* es una especie resistente a *Bd*, aún es necesario conocer si la infestación de *Bd* ocasiona reducción de tiempos de metamorfosis o tamaños de ranas post-metamórficas como se ha observado en otras especies cuyas infecciones no son letales (Davidson *et al.*, 2007; Parris y Cornelius, 2004; Retallick y Miera, 2007)

8.2 Amenazas en el área de estudio para anuros nativos

Quitridiomycosis en el área de estudio— los resultados indicaron que *Bd* está ampliamente distribuido en la mayoría de las especies nativas de anfibios en la zona de estudio (con la excepción de *Spea hammondi* que aún no ha sido evaluado), y de una especie exótica. Por lo tanto, la presencia de *Bd* debe ser considerada como una amenaza potencial a las comunidades de anuros de la región. Una relación positiva entre elevación y mayor prevalencia de *Bd*, indica que las poblaciones a altas elevaciones son las más amenazadas. En general se ha observado que las poblaciones de anfibios a altas elevaciones han sido las más afectadas por quitridiomycosis. Muertes masivas causadas por *Bd* han sido documentadas en varias regiones montañosas (Bosch *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2011; Rachowicz *et al.*, 2006; Stuart *et al.*, 2004). Las apariciones de *Bd* han sido relacionadas a bajas temperaturas y altos niveles de humedad, ambos provocan el crecimiento de *Bd* (Berger *et al.*, 2004; Drew *et al.*, 2006; Kriger *et al.*, 2007). En nuestro sitio de mayor elevación (La Grulla a 2,070 m), la prevalencia de *Bd* fue de

92%, con una media zoospórica de 195. Aunque no se han observado muertes masivas en estas localidades, esto fácilmente puede ser el resultado de una carencia de monitoreo de la población, ya que las muertes masivas son generalmente eventos abruptos, y la probabilidad de observar un animal muerto o moribundo es muy baja, especialmente en sitios remotos de regiones poco visitadas (Green *et al.*, 2002; Piovia-Scott *et al.*, 2011). Únicamente siete de 32 sitios en la zona de estudio fueron negativos, aunque cinco de ellos contuvieron tamaños de muestra pequeños ($n < 5$) y no pueden ser considerados negativos concluyentemente. En dos de estos sitios: Arroyo Santo Tomas ($n = 1$) y Arroyo San Vicente ($n = 9$), ambos contienen aguas termales, los cuales podrían estar inhibiendo el crecimiento de *Bd* (Forrest y Schlaepfer, 2011). Se conoce que *L. catesbeianus* y *X. laevis* son portadores de *Bd* en California (Greenspan *et al.*, 2012; Vredenburg *et al.*, 2013), sin embargo, estas especies solo fueron registradas en seis de 33 sitios, resultando negativo en el caso de *X. laevis*, por lo que es improbable que estas especies sean el vector primario de *Bd* en la región. Estudios recientes han sugerido que vectores tales como la ranita nativa *H. hypochondriaca*, langostinos, aves, reptiles e incluso agua de lluvia pueden jugar un papel importante en la dispersión de *Bd*. (Kilburn *et al.*, 2011; Kolby *et al.*, 2015; McMahon *et al.*, 2013; Padgett-Flohr y Hopkins, 2009). Se requiere estudios experimentales para determinar el papel de éstos y otros vectores en la transmisión y diseminación de *Bd* en anfibios de la región.

Las cargas medias zoospóricas de *Bd* en los anfibios muestreados fueron menores a las consideradas letales en *R. muscosa*, *R. sierrae* y *Lithobates areolatus* (<10,000 ZE, Kinney *et al.*, 2011; Vredenburg *et al.*, 2010), con la excepción de dos individuos de *H. hypochondriaca*. Ambas especies de *Anaxyrus* presentaron los niveles más bajos de ZE, potencialmente relacionado a sus hábitos terrestres, el cual reduce el riesgo de infección. Después de un evento epizootico, las ranas sobrevivientes pueden exhibir cargas bajas de *Bd*, y potencialmente indicar un aumento en la resistencia de infección de *Bd* (Briggs *et*

al., 2005), existiendo la posibilidad de que el muestreo indique un estado post – epizoótico, de ser así, los declives relacionados a *Bd* ya han pasado en la región. Sin embargo, es necesario realizar monitoreos regulares para determinar la tendencia de la infección de *Bd* en las poblaciones nativas de anuros en Baja California.

Especies exóticas.— Las especies acuáticas exóticas están ampliamente distribuidas en los sistemas acuáticos del noroeste de Baja California. Aunque se desconoce la llegada de estos colonizadores, su dispersión es principalmente por medio antropogénicos (Hernández *et al.*, 2008; Mendoza *et al.*, 2014, Ruiz-Campos *et al.*, 2014). En Sierra Juárez (sitios 5, 6, y 9, Anexo B), varios rancheros reportaron introducir peces, langostinos y tortugas con propósitos de pesca u ornato. De manera similar, en la presa Emilio López Zamora, el Arroyo San Carlos, y en el Arroyo San Antonio de la Minas, fueron introducidos peces, langostinos y rana toro a finales de 1970's por razones de ornato. Los rancheros también indicaron la introducción de Rana toro en la Ciénega redonda (sitio 1, Anexo B) de los canales de Mexicali en los 1990's. Todos, a excepción de un registro de rana toro en El Rosario, se localizan en la parte norte del estado. La práctica al parecer común de introducir especies exóticas por los rancheros locales de la región, resalta la necesidad de actividades de educación ambiental sobre los efectos negativos que estas especies tienen en el ecosistema.

Desafortunadamente, existen pocos estudios dentro de la región que traten sobre los efectos de la fauna exótica sobre la fauna nativa. Tales efectos sobre peces nativos han sido observados en la cuenca del Río Colorado (Andreu-Soler *et al.*, 2014; Rorabaugh *et al.*, 2002; Varela-Romero *et al.*, 2003) y en los oasis de Baja California Sur (Alaníz-García *et al.*, 2004; Andreu-Soler y Ruiz-Campos, 2013; Ruiz-Campos *et al.*, 2006), pero no existen en el noroeste de Baja California. Sin embargo, es conocido que los anfibios nativos son susceptibles a ser depredados por especies exóticas, y su competencia con el pez mosquito provoca disminución de su tamaño corporal, y actividad de forrajeo (Lawler *et al.*,

1998; Christopher, 2004), y a pesar de su tamaño pueden consumir renacuajos de *H. regilla* (Goodsell y Kats, 1999). La rana toro por su parte, consume una gran variedad de presas, desde ranas, tortugas, y serpientes, hasta pequeñas aves y roedores, compitiendo y excluyendo especies nativas (Ortíz-Serrato *et al.*, 2014). El langostino rojo, la carpa común, la rana toro y la rana africana están incluidos en la lista de especies exóticas prioritarias para México, debido al severo efecto que producen en el ecosistema (IMTA *et al.*, 2007), por lo que su presencia en la región debe considerarse como una amenaza importante a la biodiversidad no solo de anuros, sino de los hábitats riparios. Se recomienda el control y erradicación de las especies exóticas acuáticas y aplicar acciones de restauración para conservar dichos ambientes.

Recreación.— La mayoría de los cuerpos de agua de la región son utilizados en actividades recreativas. Se observaron estas actividades en los arroyos Guadalupe, Maneadero, Santo Tomás y San Vicente, particularmente donde existían aguas termales. El arroyo San Carlos está altamente impactado por la presencia de balnearios construidos a lo largo del canal del arroyo, destruyendo el hábitat por varios kilómetros. El Arroyo San Carlos esta también enlistado como uno de los acuíferos más contaminados en Baja California, junto con el Arroyo Tijuana (CONAGUA, 2014). Se observaron actividades de vehículos fuera de camino (off-road) en el cañón El Alamo, donde el arroyo se utiliza como camino, esto no solo destruye las pozas que utilizan para reproducción, pero también puede provocar la mortalidad directa de la especie.

Extracción de agua.— La extracción de agua para uso doméstico y con fines de agricultura ha afectado notablemente la hidrología de los arroyos. Cuatro sitios costeros históricos carecen de agua superficial (Santo Tomás, Ejido Benito Juárez, 3.95 km al este de la Colonia Guerrero, y San Ramón) hasta por varios kilómetros arroyo arriba. En estos sitios, se observan gran cantidad de pozos y sistemas de bombeo a lo largo del área. En el arroyo San Rafael, se observó agua superficial 38 km arroyo arriba. En un transecto de 10 km en el arroyo, observamos

únicamente dos pozas con suficiente agua para ser utilizados como sitios de reproducción, con sitios de agricultura ubicados inmediatamente al lado del arroyo. Situaciones similares pueden ser encontradas en el arroyo San Telmo y Santo Domingo. Entrevistas con los locales indican que después de la llegada de las empresas agrícolas en 1998, el arroyo empezó a carecer de agua superficial y grandes pozas con peces y ranas desaparecieron. La CONAGUA determinó que 14 acuíferos en nuestra área de estudio están sobre-explotados, y algunos empiezan a presentar salinización (CONAGUA, 2014). Los resultados sugieren que las poblaciones de *R. draytonii* localizadas en menor elevación son las que se encuentran en mayor peligro, ya que presentan poblaciones pequeñas, y el agua es extraíble con mayor facilidad (sitios 23 y 43, Anexo B).

Ganadería.— La presencia de ganado en los arroyos puede tener efectos adversos en la calidad del hábitat para algunas especies riparias, la compactación del suelo, la pérdida de estabilidad del banco, la reducción de la retención de agua, el aumento de la carga de sedimentos, aumento en la temperatura, y la disminución de la profundidad y cantidad de vegetación nativa alrededor de los sitios de apareamiento, son solo algunos de sus efectos (Fleischner, 1994; Kaufman y Kreuger, 1984; Li *et al.*, 1994; Orodho *et al.*, 1990; Sidle y Sharma, 1996). Estudios en el Parque Nacional de Sierra San Pedro Mártir indicaron que la compactación del suelo reduce la infiltración de agua de la zona freática, lo cual promueve la desertificación de los humedales de montaña (CONANP, 2006). Los registros de ganado indican su presencia desde 1796, e indican un promedio de 6,000 cabezas de ganado anual en el Parque de la Sierra San Pedro Mártir en el período de 1924 a 1960 (Delgadillo-Rodríguez, 2004). Uno de los ejemplos de los daños causados por la ganadería es posiblemente La Encantada, donde *R. draytonii* junto con hábitat propicio para la especie fue una vez abundante. Entrevistas con los rancheros indican que aproximadamente 500 cabezas de ganado estaban presentes durante nuestra visita en junio del 2013. La misma amenaza existe para La Grulla, sitio que presenta la población más grande de

rana en Baja California. El grado del impacto de la ganadería sobre las poblaciones de ranas es desconocido, debido a que no existe un censo o dato previo sobre *R. draytonii* en el sitio. Debido a que los humedales son fuertemente utilizados únicamente durante los meses de verano (CONANP, 2006), es posible que el ecosistema tiene tiempo de rehabilitarse durante el invierno, o que el número de ganado puede estar por debajo del límite que podría resultar fuertemente perjudicial para *R. draytonii*. La persistencia de la población de La Grulla, también puede verse favorecida por la hidrología del sitio, ya que se encuentra en una zona baja, en la parte final del arroyo y del húmedal, donde la retención de agua es mayor. Se recomienda realizar zonas de exclusión de ganado en La Grulla para poder entender los efectos que el ganado podría tener sobre la persistencia de la diversidad del sitio.

8.3 Genética de poblaciones

La estructura observada en las poblaciones de *R. draytonii* muestran una mayor conectividad dentro de las propias cuencas, y una diferenciación significativa entre cuencas (San Rafael, San Telmo y Santo Domingo); sin embargo, dentro de la cuenca del Santo Domingo La Grulla está aislada de las poblaciones de menor elevación. Los datos de una alta estructura genética (i.e. diferenciación entre cuencas y elevación), aunada a valores significantes de diferenciación entre sus poblaciones ($p < 0.01$ en microsatélites y SNPs) concuerdan con otros estudios que muestran una alta estructura genética en anfibios que se distribuyen en zonas serranas, donde las crestas montañosas y las distancias altitudinales son limitantes en el flujo génico de las especies (Albert *et al.*, 2015; Funk *et al.*, 2005; García-Paris *et al.*, 2000; Lind *et al.*, 2010; Monsen y Blouin, 2003; Shaffer *et al.*, 2000; Schoville *et al.*, 2011). Este patrón es congruente a su vez, con la estructura observada para las poblaciones aisladas del sur de California de *R. draytonii* (Richmond *et al.*, 2013). La alta diferenciación entre sus poblaciones y estructura puede deberse a su vez por la baja capacidad de dispersión de la especie ($< 3\text{km}$, Bulger *et al.*, 2003), y a la susceptibilidad de los

anfibios a presentar alta estructura genética cuando las distancias inter-poblacionales exceden varios kilómetros (Shaffer *et al.*, 2000).

El modelo “Valle-Montaña” propuesto por Funk *et al.* (2005, Fig. 4), establece que las poblaciones a bajas elevaciones mantienen un mayor flujo génico entre ellas, y que este flujo proporciona migrantes hacia las poblaciones de mayores elevaciones. Establece también, que el flujo génico entre poblaciones de media y alta elevación entre cuencas es limitado. Debido al número pequeño de localidades de *Rana draytonii* con muestras genéticas (9 sitios en 3 cuencas hidrológicas) no es posible evaluar adecuadamente el modelo propuesto por Funk *et al.* (2005), sin embargo los datos muestran patrones similares a los que el modelo supone. Se encontró una correlación negativa entre la elevación y la riqueza alélicas, heterocigosidad observada y heterocigosidad esperada, lo cual indica una mayor diversidad a menores elevaciones, y una disminución en altas elevaciones. Posiblemente el aislamiento de poblaciones en altas elevaciones es debido a diferencias ecológicas, tales como temporadas de reproducción y actividad, relacionadas a las diferencias termales de los sitios (Howard y Wallace, 1985). El ambiente térmico en La Grulla es muy diferente a las poblaciones de bajas elevaciones, esta localidad recibe nevadas constantes en invierno y la capa superficial de agua se congela, limitando la actividad de la especie. Aún se desconoce la temporada de reproducción exacta, pero es posible que ocurra poco después de las últimas nevadas de marzo, a diferencia de las poblaciones de menor elevación las cuales se reproducen entre diciembre y febrero.

El modelo de Funk *et al.* (2005) también propone que las poblaciones a altas elevaciones son altamente susceptibles a extirpación (dado su aislamiento y baja diversidad genética). Las localidades históricas registradas a mayor elevación para la cuenca del San Rafael (Rancho Garet a 1,340 m, sitio 28, Fig. 8, Anexo B), y de la Cuenca del Santo Domingo (La Encantada a 2,130 m, sitio 34, Fig. 8, Anexo B) se encuentran al parecer extirpadas. Es posible que dada la susceptibilidad de extirpación propia de poblaciones en altas elevaciones, tales como un flujo génico

restringido con otras poblaciones; distintas características ecológicas (*i.e.* temperaturas menores); y además presiones antropogénicas (el índice antropogénico de ambas localidades es del 70 y 77%, mientras que sitios con *Rana draytonii* oscilaron entre 82 y 94%, Anexo K), propiciaron la extirpación de dichas poblaciones. Para el caso de La Encantada, es notable la pérdida de hábitat a causa de la historia de ganadería en la zona, sin embargo para el Rancho Garet en la cuenca del San Rafael, la ganadería está prácticamente ausente, siendo el único impacto es la traslocación de la trucha nativa *Onchochyncus mykiss* en los años 1940's; sin embargo como se mencionó anteriormente no existe evidencia que la trucha depreda sobre *R. draytonii* (Ruiz-Campos y Cota-Serrano, 1992). Otro factor que pudo ayudar a propiciar su extirpación es la presencia de quitridiomycosis, la cual afecta de mayor manera a poblaciones de alta montaña dado que las condiciones climáticas propician su crecimiento (Bosch *et al.*, 2007; Rachowicz *et al.*, 2006; Stuart *et al.*, 2004). Este patrón también se observó en los datos recabados donde las poblaciones de alta elevación serían las primeras en alcanzar niveles letales de quitridiomycosis.

La Grulla es la única población de alta elevación remanente de la especie, ubicada a 1250 m, se encuentra aislada del resto de las poblaciones tal como lo mostró el análisis de STRUCTURE, sin embargo tal aislamiento ha provocado que presente niveles significantes de endogamia ($G_{is} = 0.156$, $p=0.002$ [datos de microsatélites]), niveles bajos de riqueza alélicas ($A_R 1.18$ [microsatélites]) y de heterocigosidad ($H_o 0.071$ [microsatélites], Tabla XV). Tales valores la colocan en un alto riesgo de extinción, debido a que por medio de los efectos de la deriva génica y de una depresión endogámica puede perder fácilmente alelos importantes para procesos adaptativos (Markert *et al.*, 2010). Aunque no se han visto efectos de endogamia en La Grulla, no se ha realizado un estudio enfocado a la detección de sus posibles efectos (*i.e.* pérdida de fecundidad, malformaciones, etc), por lo que se desconoce si la baja diversidad genética está impactando la

eficacia biológica (fitness) poblacional. Es importante darle seguimiento a esta población.

Otros supuesto del modelo de Funk es que si las poblaciones de bajas elevaciones son extirpadas (tal es el caso en Baja California, donde las poblaciones históricas y el hábitat disponible en las cuenca del San Rafael, San Telmo y Santo Domingo se ha perdido), aumenta la tasa de extinción local. Esto se debe a la reducción del potencial de rescate que las poblaciones de menor elevación (y genéticamente más diversas) proveían a poblaciones arroyo arriba, al perder una fuente importante de migrantes y variación genética. Esto implicaría que las poblaciones de cada cuenca, especialmente en la cuenca San Rafael y San Telmo (donde solo se identificó una sola localidad), son más susceptibles a procesos ocasionados por deriva génica y endogamia, al no contar con migración de poblaciones cercanas, y por ende son las poblaciones de *R. draytonii* con riesgo de extinción. En particular la población del arroyo San Rafael, La Palmita, se encuentra en los límites del agua superficial en el arroyo, dada la creciente demanda de agua en la zona para agricultura, el límite de agua superficial arroyo se ha desplazado arroyo arriba. Dada la ubicación geográfica de la población, si la demanda de agua aumenta, el hábitat desaparecería, provocando posiblemente la extirpación de la población dada la poca capacidad de dispersión de la especie y la fidelidad de la especie a sitios de ovoposición y de sitios de descanso que ha mostrado en estudios de telemetría (Bulger *et al.*, 2003; Fellers y Kleeman, 2007; Keung, 2015).

Comparando los resultados de diversidad genética (A_R , H_o y H_e) de las poblaciones de Baja California tanto con datos publicados para poblaciones de California, como la nueva base de datos que utiliza únicamente los 11 microsatélites que amplificaron para Baja California se presentan valores significativamente menores, incluso por debajo de poblaciones aisladas en la periferia de la distribución sureña en California (*ie.* Los Alisos, Tabla XVII) y de las poblaciones de Sierra Nevada, las cuales están geográficamente en una historia

similar de aislamiento y extirpación de poblaciones (Richmond *et al.*, 2013, 2014). También se encontraron valores menores de riqueza de alelos privados y riqueza alélicas que las poblaciones aisladas del sur de California.

Esta distribución fragmentada observada en Baja California es similar a la presente en la zona Norte de la distribución de la especie, donde las poblaciones de Sierra Nevada se encuentran ahora aisladas de aquellas de la parte Central de la distribución (Richmond *et al.*, 2014). En estas poblaciones, estudios genéticos muestran un baja diversidad alélicas, altos niveles de consanguinidad entre las pozas, y tamaños poblacionales pequeños (Richmond *et al.*, 2014). Las poblaciones en la SSPM al parecer enfrentan problemas similares, encontrando poblaciones pequeñas y aisladas del resto de la distribución de la especie, lo cual las hace más susceptibles a la pérdida de diversidad genética a causa de la deriva génica. Los bajos valores de diversidad genética reflejan la necesidad de conservación de estas poblaciones. Este patrón concuerda con el observado en otros taxa, en donde se ha reportado una menor diversidad genética (en términos de heterocigosidad) en taxa con alguna categoría de riesgo, en comparación con taxa cercanos que no presentan problemas de riesgo, indicando una conexión entre el riesgo de extinción y una baja diversidad genética (Blomqvist *et al.*, 2010; Hansson y Westerberg, 2002).

El patrón observado de baja diversidad y alta estructura genética no solo podría deberse a la pérdida de hábitat y consecuente disminución de tamaños poblacionales y conectividad, sino al hecho de que son poblaciones ubicadas en la periferia de la distribución de la especie (Brown, 1984). El modelo "abundancia-centro", indica que tanto la diversidad intrapoblacional, así como el apareamiento al azar declinan conforme nos acercamos a la periferia de la distribución. Diversas revisiones indican que los anuros son el taxa que presenta el mayor número de ejemplos que presentan este patrón (Eckert *et al.*, 2008). Los datos concuerdan con este modelo, ya que las poblaciones se encuentran en la periferia sureña de la distribución, y presenta una fuerte diferenciación genética y baja diversidad

genética. En general, las poblaciones en el centro de la distribución de las especies presentan una mayor conectividad, colocando una ventaja evolutiva con respecto a poblaciones marginales en los extremos del ámbito de distribución, donde usualmente encontramos tamaños poblacionales pequeños y mayor aislamiento, lo cual los hace más susceptibles a la pérdida de diversidad genética por medio de la deriva génica (Kirkpatrick y Barton, 1997; Eckert *et al.*, 2008; Sexton *et al.*, 2009, Richmond *et al.*, 2014). Dado que las poblaciones remanentes de *R. draytonii* en Baja California, se ubican justamente en el límite sureño de la distribución, es posible que siempre hayan tenido dichos valores de diversidad genética (Hoffman *et al.*, 2004). En tal caso el flujo génico asistido entre las poblaciones no sería adecuado. Algunos estudios han mostrado que un flujo génico del interior a la periferia de las poblaciones pueden impedir procesos adaptativos (Kirkpatrick y Barton, 1997) y aumentar la probabilidad de que las poblaciones periféricas se extingan (Boulding y Hay, 2001).

Determinar si la baja diversidad genética y la alta estructura es resultado de la pérdida de hábitat, de su ubicación en la periferia de la distribución, o ser características propias de anfibios en zonas montañosas es difícil de discernir. Sin embargo es evidente que las poblaciones remanentes de *R. draytonii* se encuentran en alto riesgo de extinción basado en los bajos niveles de diversidad genética y la pérdida de hábitat en zonas de bajas elevación que teóricamente le proporcionaba conectividad a sus poblaciones. Se recomienda iniciar con la creación de hábitat de apareamiento en cada población para aumentar los tamaños poblaciones y disminuir el efecto de la deriva génica en la pérdida de diversidad genética. Dada la situación genética encontrada se propone realizar migración asistida, que permite incrementar la diversidad genética, especialmente en Santo Tomás. También sugerimos iniciar programas de restauración de hábitat en sitios históricos y cercanos a las poblaciones remanentes, que permita aumentar el ámbito de distribución de cada población y de la especie. Afortunadamente los métodos de translocación han mejorado substancialmente y

son cada vez más exitosos (Germano y Bishop, 2009; Knapp *et al.*, 2016; Newell *et al.*, 2013, Scheele *et al.*, 2014).

Comparación de bases de datos (Microsatélites y SNPs)

Las tres bases de datos de SNPs que se compararon (100%, 90% y 80%), mostraron resultados muy similares en los distintos análisis relacionados a la determinación de clusters, diversidad genética y diferenciación genética, lo cual demuestra que la incorporación de datos faltantes y la consecuente incorporación de un mayor número de *loci* no afecta la estimación de estos parámetros en las poblaciones de *R. draytonii* estudiadas. Las diferencias se resumen en un incremento en los valores de diversidad genética (A_r , H_o , H_e) y diferenciación genética (F_{st}) conforme aumenta el número de *loci*, así como un aumento en el número de individuos admixtos en el análisis de clusters. Sin embargo las similitudes entre los resultados implican que una base de datos pequeña (415 *loci*) tiene suficientes datos informativos que una base de datos mayor (1,163, Tabla IV), y a un tiempo computacional menor. Sin embargo, para el análisis filogenético la base de datos que incorporó un mayor número de datos faltantes (70%), mostró mayores soportes de rama, lo que indica que la incorporación de datos faltantes es importante para la determinación de filogenias (Huang y Knowles, 2016)

Los resultados de cada base de datos arrojaron resultados diferentes en varios análisis. En las gráficas de asignación de clusters, microsatélites y SNPs difirieron para $K=3$ y 4, especialmente con las base de datos de 90% y 80% las cuáles mostraron mayor cantidad de individuos admixtos, y aunque estudios indican que la incorporación de datos faltantes para pruebas de asignación aumenta el poder de asignación de individuos (Chattopadhyay *et al.*, 2014), nuestros resultados no mostraron mejoría en la asignación de individuos. Por su parte los valores de diversidad genética concordaron en que la población de la Grulla mostró los valores mas bajos de P_{Ar} , A_r , H_o y H_e , aunque en general son valores menores a los que indicaron los microsatélites. De igual forma los valores de diferenciación

genética F_{st} fueron significantes en ambas bases de datos, estos fueron menores en los SNPs. Al parecer estudios de simulación han indicado que datos obtenidos por medio de ddRad suelen subestimar el número de polimorfismos (Arnold *et al.*, 2013). Es necesario analizar las poblaciones de California con datos de SNPs para poder realizar una comparación con los resultados obtenidos de microsatélites, y corroborar que la baja diversidad genética presente en Baja California se refleja en los datos de SNPs.

8.4 Recomendaciones

- a. Establecer hábitat de apareamiento en sitios estratégicos de cada cuenca, permitiendo aumentar el éxito reproductivo de cada población, y aumentar tamaños poblacionales que disminuyan el efecto de la deriva génica en la pérdida de diversidad genética.
- b. Aumento de conectividad entre las poblaciones, mediante la rehabilitación de biotopos acuáticos y riparios que permitan aumentar el flujo génico natural entre las poblaciones y permitir la posible entrada de variabilidad genética.
- c. Seguimiento al hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis*, especialmente en la población de La Grulla, la cual al ser la única población de alta elevación, y al presentar bajos niveles de diversidad genética, puede ser más susceptible a los efectos este patógeno.
- d. Dar seguimiento a las especie íctica exótica *Lepomis cyanellus* en la cuenca del Santo Domingo, y promover acciones para evitar su dispersión arroyo arriba.
- e. Promover acciones de conservación en La Grulla, dada la susceptibilidad de la especie a su extirpación, es importante evaluar el efecto del ganado sobre sus poblaciones.
- f. Visitar los sitios indicados por el índice antropogénico como sitios propicios para la presencia de *Rana draytonii*, pero que durante este estudio no fue detectada.
- g. Iniciar acciones de restauración de hábitat para futuros esfuerzos de reintroducción, en sitios cercanos a las poblaciones actuales, lo cual permita la migración natural entre las poblaciones.

- h. Realizar campañas de educación ambiental para evitar la diseminación de las especies exóticas por ignorancia de su efecto por parte de los rancheros y ejidatarios.
- i. Establecer en colaboración con diversas instituciones (CONABIO, SEMARNAT, UABCS, Organizaciones Civiles etc) y en los diferentes niveles de gobierno la erradicación de especies exóticas.
- j. Establecer los caudales ecológicos de los arroyos para poder asegurar la permanencia de las poblaciones de anfibios.

9. CONCLUSIONES

La rana de patas rojas *Rana draytonii* se encuentra en la Cuenca del San Rafael, San Telmo y Santo Domingo, representando un área del 15% de su distribución histórica en Baja California, México.

No existe una correlación significativa entre lejanía del sitio a zonas urbanas y la presencia de actividades antropogénicas, siendo esta correlación nula para la variable de Ganadería.

Las variables ambientales importantes para la especie en los sitios analizados fueron: porcentaje de vegetación acuática, porcentaje de pozas bajas, porcentaje de canto rodado en el banco del arroyo, y el pH.

Las variables antropogénicas que disminuyen la probabilidad de presencia de *R. draytonii* en los sitios históricos fueron: distancia a zonas urbanas, porcentaje de área natural, ganadería y especies exóticas.

El hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* está presente en cinco de las seis especies nativas del área de estudio, incluyendo la especie exótica *L. catesbeianus*. Este hongo también ocurre en el total de localidades donde se observó *R. draytonii*, pero con valores zoospóricos no letales.

En Baja California *R. draytonii* presenta cuatro poblaciones con una alta estructura genética, baja diversidad genética, e indicios de endogamia en dos de sus poblaciones.

La única población remanente en alta elevación, La Grulla, (2,100 m) presenta alto riesgo de extirpación dado su aislamiento geográfico, baja diversidad genética, endogamia y un hábitat con un índice de amenazas alto, principalmente por la presencia de ganado.

10. LITERATURA CITADA

- Adams, M.J. 1999. Correlated factors in amphibian decline: exotic species and habitat change in Western Washington. *J. Wildlife Manage.* 63: 1162-1171.
- Adams, M.J., A.P. Christopher, B. McCreary, S.K. Galvan, S.J. Wessell, W.H. Wentle, C.W. Anderson, A.B. Kuehl. 2009. Short-term effect of cattle exclosures on Columbia spotted frog (*Rana luteiventris*) populations and habitat in northeastern Oregon. *J. Herpetol.* 43(1):132-138.
- Alaníz-García, J., G. Ruiz-Campos, A. Valdéz-González, F. Abarca-González. 2004. Interacción trófica entre dos especies cas sintópicas, una nativa (*Fundulus lima*) y la otra exótica (*Xiphophorus helleri*), en el oasis San Ignacio, Baja California Sur, México. En: Lozano-Vilano M. L., A. J. Contreras-Balderas (eds.). Homenaje al Doctor Andrés Reséndez Medina: un ictiologo mexicano. Primera Edición. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey. pp. 193–216.
- Albert, E.M., S. Fernández-Beaskoetxea, J.A. Godoy, U. Tobler, B.R. Schmidt, J. Bosh. 2015. Genetic Management of an amphibian population after a chytridiomycosis outbreak. *Conser. Genet.* 16:103-111.
- Alfaro, M.E., S. Zoller, F. Lutzoni. 2003. Bayes or bootstrap? A simulation study comparing the performance of Bayesian Markov chain Monte Carlo sampling and bootstrapping in assessing phylogenetic confidence. *Mol. Biol. Evol.* 20:255-266.
- Allentoft, M.E., J. O'Brien. 2010. Global amphibian declines, loss of genetic diversity and fitness: a review. *Diversity.* 2:47-71.
- Alvarez, J.A., C. Dunn, A.F. Zuur. 2004. Response of California red-legged frogs to removal of non-native fish. 2002-2003. *Transactions of the Western Section of the Wildlife Society.* 39:9-12.
- Andreu-Soler, A., G. Ruiz-Campos, A. Varela-Romero. 2014. Impactos de los peces exóticos sobre la condición somática del pez en peligro de extinción *Cyprinodon macularius* (Cyprinodontiformes: Cyprinodontidae) en la cuenca baja del Rio Colorado. En: Low Pfeng, A.M., P.A. Quión, E.M. Peters Recagno (eds.). Especies invasoras acuáticas: casos de estudio en ecosistemas de México. SEMARNAT-INECC-UPEI. Primera edición. México D.F. pp 493 a 521.
- Andreu-Soler, A., G. Ruiz-Campos. 2013. Effects of exotic fishes on the somatic Condition of the endangered killifish *Fundulus lima* (Teleostei: Fundulidae) in oases of Baja California Sur, Mexico. *Southwest Nat.* 58(2):192-201.
- Armbruster, P., D.H. Reed. 2005. Inbreeding depression in benign and stressful environments. *Heredity.* 95:235-242.
- Arnold, B., R.B. Corbett-Detig, D. Hartl, K. Bomblies. 2013. RADseq underestimates diversity and introduces genealogical biases due to nonrandom haplotype sampling. *Mol. Ecol.* 22:3179-3190.
- Avise, J.C. 1989. A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. *Trends Ecol. Evol.* 4:279-281.
- Baena, M.L., G. Halffter, A. Lira-Noriega, J. Soberón. 2008. Extinción de especies. En: Soberón J., G. Halffter, J. Llorente-Bousquets (eds.). Capital natural de México.

- Vol. I. Conocimiento actual de la biodiversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Primera Edición. México, D.F. pp 263-282.
- Beebee, T.J.C. 2005. Conservation genetics of amphibians. *Heredity*. 95:423-427.
- Berger, L., R. Speare, H.B. Hines, G. Marantelli, A.D. Hyatt, K.R. McDonald, L.F. Skerratt, V. Olsen, J.M. Clarke, G. Gillspie, M. Mahony, N. Sheppard, C. Williams, M.J. Tyler. 2004. Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Aust. Vet. J.* 82:434-439.
- Berger, L., R. Speare, P. Daszak, D.E. Green, A.A. Cunningham, R. Slocombe, C.L. Goggin, A.D. Hyatt, K.R. MacDonald, H.B. Hines, K.R. Lips, G. Marantelli, H.H. Parkes. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rainforests of Australia and Central America. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:9031-9036.
- Blaustein, A.R., D.B. Wake, W.P. Sousa. 1994. Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conserv. Biol.* 8:60-71.
- Blomqvist, D., A. Pauliny, M. Larsson, L. Flodin. 2010. Trapped in the extinction vortex? Strong genetic effects in a declining vertebrate population. *BMC Evol. Biol.* 10:1-9.
- Blouin, M.S., I.C. Phillipsen, K.J. Monsen. 2010. Population structure and conservation genetics of the Oregon spotted frog, *Rana pretiosa*. *Conserv. Genet.* 11:2179-2194.
- Bosch, J., L.M. Carrascal, L. Duran, S. Walker, M.C. Fisher. 2007. Climate change and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of central Spain; is there a link?. *Proc. R. Soc. B.* 274:253-260.
- Boulding, E.G., T. Hay. 2001. Genetic and demographic parameters determining population persistence after a discrete change in the environment. *Heredity*. 86: 313-324.
- Boyle, D.G., D.B. Boyle, V. Olsen, J.A.T. Morgan, A.D. Hyatt. 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis. Aquat. Organ.* 60:141-148.
- Brede, E.G., T.J.C. Beebee. 2004. Contrasting population structure in two sympatric anurans: implications for species conservation. *Heredity*. 92:110-117.
- Brehme, C.S., S.L. Schuster, C.J. Rochester, S.A. Hathaway, R.N. Fisher. 2006. MCBCP Arroyo Toad monitoring program: 3-year trend analyses for 2003-2005. U. S. Geological Survey data summary prepared for Marine Corps Base Camp Pendleton. pp 102.
- Briggs, C.J., V.T. Vredenburg, R.A. Knapp, L.J. Rachowicz. 2005. Investigating the population-level effects of chytridiomycosis, a fungal disease of amphibians. *Ecology*. 86:3149-3159.
- Brooks, D.R., D.A. McLennan, V. Leon-Regagnon, E. Hoberg. 2006. Phylogeny, ecological fitting and lung flukes: helping solve the problem of emerging infectious diseases. *Rev. Mex. Biodiv.* 77:225-233.

- Brown, J.H., A. Kodric-Brown. 1977. Turnover rates in insular biogeography: effect of immigration on extinction. *Ecology*. 58, 445-449.
- Bulger, J. B., N. J. Scott Jr., R. B. Seymour. 2003. Terrestrial activity and conservation of adult California red-legged frogs *Rana aurora draytonii* in coastal forests and grasslands. *Biol. Cons.* 110:85-95.
- Burton, E.C., M.J. Gray, A.C. Schmutzer, D.L. Miller. 2010. Differential responses of postmetamorphic amphibians to cattle grazing in wetlands. *J. Wildl. Manag.* 73:269-277.
- Canonico, G.C., A. Arthington, J.K. McCrary, M.L. Thieme. 2005. The effects of the introduced tilapias on native biodiversity. *Aquat. Conserv.* 15:463-483.
- Chattopadhyay, B., K.M. Garg, U. Ramakrishnan. 2014. Effect of diversity and missing data on genetic assignment with RAD-Seq markers. *BMC Research notes*. 7:841
- Cheng, T.L., S.M. Rovito, D.B. Wake, V.T. Vredenburg. 2011. Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 108:9502-9507.
- Christopher, S. 2004. Introduce predator effect on a threatened anuran. Tesis (PhD en Ecología y Evolución). California, Estados Unidos. University of California Santa Barbara. 374 p.
- Chu, N.D., S.T. Kaluziak, G.C. Trussell, S.V. Vollmer. 2014. Phylogenomic analyses reveal latitudinal population structure and polymorphisms in heat stress genes in the North Atlantic snail *Nucella lapillus*. *Mol. Ecol.* 23:1863-1873.
- Cirilo-Sánchez, H., G. Ruiz-Campos. 1987. Feeding habits of the San Pedro Mártir Rainbow Trout, *Salmo nelsoni*. En: Proceedings of the Desert Fishes Council. pp. 153-163.
- CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). 2015. Estadísticas del Agua en México. SEMARNAT, Tlalpan, México, D.F. 298p
- CONANP (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas). 2006. Programa de Conservación y Manejo, Parque Nacional Sierra de San Pedro Mártir. CONANP, Tlalpan, México, D.F. 176p.
- Crnokrak, P., D.A. Roff. 1999. Inbreeding depression in the wild. *Heredity*. 83:260-270.
- Cruz, M.J., S. Pascoal, M. Tejado, R. Rebelo. 2006. Predation by an exotic crayfish, *Procambarus clarkii*, on natterjack toad, *Bufo calamita*, embryos: its role on the exclusion of this amphibian from its breeding ponds. *Copeia*. 2:274-280.
- Cushman, S.A. 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biol. Conserv.* 128:231-240.
- D'Amore, A., V. Hemingway, K. Wasson. 2010. Do a threatened native amphibian and its invasive congener differ in response to human alteration of the landscape? *Biol. Invasions*. 12:145-154.
- Danielson, B.J. 1992. Habitat selection, interspecific interaction and landscape composition. *Evol. Ecol.* 6:399-411.
- Daszak, P., A. Cunningham, A. D. Hyatt. 2003. Infectious disease and amphibian

- population declines. *Divers. Distrib.* 9:141-150.
- Daugherty, C.H., A.L. Sheldon. 1982. Age-specific movement patterns of the frog *Ascaphus truei*. *Herpetologica*. 38:468-474.
- Davidson, C. 2001. Declining downwind: amphibian population declines in California and historical pesticide use. *Ecol. Appl.* 14:1892-1902.
- Davidson, C., M.F. Benard, H.B. Shaffer, J.M. Parker, C. O'Leary, J.M. Conlon, L.A. Rollins-Smith. 2007. Effects of chytrid and carbaryl exposure on survival, growth and skin peptide defenses in foothill yellow-legged frogs. *Environ. Sci. Technol.* 41:1771-76.
- Davidson, C., H.B. Shaffer, M.R. Jennings. 2002. Spatial tests of the pesticide drift, habitat destruction, UV-B, and climate-change hypotheses for California amphibian declines. *Conserv. Biol.* 16:1588-1601.
- Dawson, K.J., K. Belkhir. 2001. A Bayesian Approach to the Identification of Panmictic Populations and the Assignment of Individuals. *Genet. Res.* 78(1):59-77.
- Delgadillo-Rodríguez, J. 1998. Florística y ecología del norte de Baja California, México. Universidad Autónoma de Baja California. Segunda Edición. Mexicali, Baja California, México. 407p.
- Delgadillo-Rodríguez, J. 2004. El bosque de coníferas de la Sierra de San Pedro Mártir, Baja California. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales–Instituto Nacional de Ecología. México, D.F. 159p.
- Di Rienzo, A., A.C. Peterson, J.C. Garza, A.M. Valdes, M. Slatkin, N.B. Freimer. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:3166-3170.
- Domínguez-Torres, J., E. Mellink. 2003. Invasive aquatic animals and possible effects on native frogs and toads in Mediterranean Baja California. *Bull. South. Calif. Acad. Sci.* 102:89-95.
- Doubledee, R.A., E.B. Muller, R.M. Nisbet. 2003. Bullfrogs, disturbance regimes, and the persistence of California red-legged frogs. *J. Wildlife Manage.* 67:424-438.
- Drew, A., E.J. Allen, L.J. Allen. 2006. Analysis of climatic and geographic factors affecting the presence of chytridiomycosis in Australia. *Dis. Aquat. Org.* 68:245-250.
- Driscoll, D.A. 1997. Mobility and metapopulation structure of *Geocrinia alba* and *Geocrinia vitellina*, two endangered frog species from southwestern Australia. *Aust. J. Ecol.* 22:185-195.
- Driscoll, D.A. 1999. Genetic neighbourhood and effective population size for two endangered frogs. *Biol. Conserv.* 88:221-229.
- Earl, D.A., B.M. vonHoldt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4(2):359-361.
- Eaton, D.A.R. 2014. PyRAD: assembly of de novo RADseq loci for phylogenetic analyses. *Bioinformatics.* 30(13):1844-1849.
- Eckert, C.G., K.E. Samis, S.C. Loughheed. 2008. Genetic variation across species'

- geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. *Mol. Ecol.* 17:1170-1188.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5):1792-97.
- Edgar, R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics.* 26(19):2460-2461.
- Edmands, S. 2007. Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Mol. Ecol.* 16:463-475.
- Emerson, K.J., C.R. Merz, J.M. Catchen, P.A. Hohenlohe, W.A. Cresko, W.E. Bradshaw, C.M. Holzapfel. 2010. Resolving postglacial phylogeography using high-throughput sequencing. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:16196-16200.
- Excoffier, L., H.E.L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10:564-567.
- Falush, D., M. Stephens, J.K. Pritchard. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics.* 164:1567-1587.
- Fellers, G.M., P.M. Kleeman. 2007. California red-legged frog (*Rana draytonii*) movement and habitat use: implications for conservation. *J. Herpetol.* 41(2):271-281.
- Fellers, G.M., R.A. Cole, D.M. Reinitz, P.M. Kleeman. 2011. Amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in coastal and montane California, USA anurans. *Herpetol. Conserv. Biol.* 6:383-394.
- Ficetola, G.F., T.W.J. Garner, F. De Bernardi. 2007. Genetic diversity, but not hatching success, is jointly affected by postglacial colonization and isolation in the threatened frog, *Rana latastei*. *Mol. Ecol.* 16:1787-1797.
- Fidenci, P. 2004. The California red-legged frog, *Rana aurora draytonii*, along the Arroyo Santo Domingo, northern Baja California, México. *Herpetol. Bull.* 88:27-31.
- Fleischner, T.L. 1994. Ecological costs of livestock grazing in western North America. *Conserv. Biol.* 8:629-644.
- Forrest, M.J., M.A. Schlaepfer. 2011. Nothing a hot bath won't cure: infection rates of amphibian chytrid fungus correlate negatively with water temperature under natural field settings. *PLoS ONE* 6:e28444.
- Fox, J. 2005. The R commander: a basic statistics graphical user interface to R. *J. Stat. Softw.* 14(9):1-42.
- Fox, J., S. Weisberg. 2011. An R companion to Applied Regression, Second Edition. Thousand Oaks CA: Sage. URL: <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>
- Frankham, R. 2005. Genetics and extinction review. *Biol. Conserv.* 126:131-140.
- Frankham, R., K. Lees, M.E. Montgomery, P.R. England, E.H. Lowe, D.A. Briscoe. 1999. Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential?. *Anim. Conserv.*

2:255-260.

- Frankham, R., J.D. Ballou, D.A. Briscoe. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press. First Edition. Cambridge. 644p
- Frías-Álvarez, P., J.J. Zuñiga-Vega, O. Flores-Villela. 2010. A general assessment of the conservation status and decline trends of mexican amphibians. *Biodivers. Conserv.* 19:3699-3742.
- Frías-Álvarez, P., V.T. Vredenburg, M. Familiar-López, J.E. Longcore, E. González-Bernal, G. Santos-Barrera, L. Zambrano, G. Parra-Olea. 2008 Chytridiomycosis survey in wild and captive mexican amphibians. *Ecohealth.* 5:18-26.
- Friar, E.A., T. Ladoux, E.H. Roalson, R.H. Robichaux. 2000. Microsatellite analysis of a population crash and bottleneck in the Mauna Kea silversword, *Argyroxiphium sandwicense* ssp. *sandwicense* (Asteraceae), and its implications for reintroduction. *Mol. Ecol.* 9:2027-2034.
- Funk, W.C., M.S. Blouin, P.S. Corn, B.A. Maxell, D.S. Pilliod, S. Amish, F.W. Allendorf. 2005. Population structure of Columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) is strongly affected by the landscape. *Mol. Ecol.* 14:483-496.
- García-Paris, M., D.A. Good, G. Parra-Olea, D.B. Wake. 2000. Biodiversity of Costa Rican salamanders: Implications of high levels of genetic differentiation and phylogeographic structure for species formation. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:1640 - 1647.
- Gamradt, S.C., L.B. Kats. 1996. Effect of introduced crayfish and mosquitofish on California newts. *Conserv. Biol.* 10:1155-1162.
- Germano, J. M., Bishop, P. J., 2009. Suitability of amphibians and reptiles for translocation. *Conservation Biology* 23, 7–15.
- Godoy, J.A. 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas.* 18(1):23-33.
- González-Bernal, E.L. 2008. Estado de conservación de *Pseudacris hypochondriaca* en la península de Baja California, México. Tesis (Maestría en Ciencias Biológicas). Mexico, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. 72 p.
- Goodsell, J.A., L.B. Kats. 1999. Effect of Introduced mosquitofish on pacific tree frogs and the role of alternative prey. *Conserv. Biol.* 13(4):921-924.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *J. Heredity.* 86:485-486.
- Gray M.J., D.L. Miller, A.C. Schmutzer, C.A. Baldwin. 2007. Frog 3 virus prevalence in tadpole populations inhabiting cattle-access and non-access wetlands in Tennessee, USA. *Dis. Aquat. Org.* 77:97-103.
- Green, D.E., K.A. Converse, K.A., A.K. Schrader. 2002. Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the USA, 1996–2001. *Ann. NY Acad. Sci.* 969:323-339.
- Greenspan, S.E., A.J. Calhoun, J.E. Longcore, M.G. Levy. 2012. Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* to wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) via a bullfrog

- (*L. catesbeianus*) vector. *J. Wildlife Dis.* 48:575-582.
- Grismer, L.L. 2002. Amphibians and reptiles of Baja California, including its pacific islands and the islands in the Sea of Cortés. University of California Press. First Edition. Berkeley, California. 399p.
- Hancock, J.M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. En: Goldstein, D.B., C. Schlotterer (eds.). *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, First Edition. New York. pp 1-9.
- Hanski, I., D. Simberloff. 1997. The metapopulation approach, its history, conceptual domain, and application to conservation. En: Hanski, I.A., M.E. Gilpin (eds.) *Metapopulation biology: ecology, genetics, and evaluation*. Academic Press. First Edition. San Diego. pp 5-26.
- Hansson B., L. Westerberg. 2002. On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Mol. Ecol.* 11:2467-2474.
- Hayes, M.P., M.R. Jennings. 1989. Habitat correlates of distribution of the California red-legged frog (*Rana aurora draytonii*) and the foothill yellow-legged frog (*Rana boylei*): Implications for management. En Szaro, R.E., K.E. Severson, D.R. Patton (eds.). *Symposium on the Management of Amphibians, Reptiles, and Small Mammals in North America (1st, 1988, Flagstaff, Arizona)*. U.S. Department of Agriculture. Fort Collins, Colorado. pp 144-158.
- Hayes, M.P., M.R. Jennings. 2006. *Rana draytonii*. *Prey. Herpetol. Rev.* 37(4):449.
- Hayes, M.P., M.R. Tennant. 1985. Diet and feeding behavior of the California red-legged frog, *Rana aurora draytonii* (Ranidae). *Southwest. Nat.* 30:601-605.
- Hecnar, T., R.T. M'Closkey. 1997. The effects of predatory fish on amphibian species richness and distribution. *Biol. Conserv.* 79:123-131.
- Hedrick, P.W. 2001. Conservation genetics: where are we now?. *Trends Ecol. Evol.* 16:629-636.
- Hedrick, P.W., P.S. Miller. 1992. Conservation genetics: techniques and fundamentals. *Ecol. Appl.* 2:30-46.
- Hernández, L., A.M. Maeda-Martínez, G. Ruiz-Campos, G. Rodríguez-Almaraz, F. Alonzo-Rojo, J.C. Sainz. 2008. Geographic Expansion of the Invasive Red Crayfish *Procambarus Clarkii* (Girard, 1852) (Crustacea: Decapoda) in Mexico. *Biol. Invasions.* 10(7):977-984.
- Hoffman, E.A., M.S. Blouin. 2004. Historical data refute recent range contraction as cause of low genetic diversity in isolated frog populations. *Mol. Ecol.* 13:271-276.
- Hoverman, J.T., M.J. Gray, D.L. Miller, N.A. Haislip. 2012. Widespread Occurrence of Ranavirus in Pond-Breeding Amphibian Populations. *EcoHealth.* 9:36-48.
- Howard, J.H., R.L. Wallace. 1985. Life history characteristics of populations of the long-toed salamander (*Ambystoma macrodactylum*) from different altitudes. *Am. Midl. Nat.* 113:361-373.
- Huang, H., L.L. Knowles. 2014. Unforeseen consequences of excluding missing data from next-generation sequences: simulation study of RAD sequences. *Syst. Biol.*

65(3):357–365.

- Huelsenbeck, J., B. Rannala. 2004. Frequentist properties of Bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex substitution models. *Syst. Biol.* 53:904-913.
- Hyatt, A.D., D.G. Boyle, V. Olsen, D.B. Boyle, L. Berger, D. Obendorf, A. Dalton, K. Kriger, M. Hero, H. Hines, R. Phillott, R. Campbell, G. Marantelli, F. Gleason, A. Colling. 2007. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Organ.* 73:175-192.
- IMTA, Conabio, GECl, Aridamérica, The Nature Conservancy. 2007. Especies invasoras de alto impacto a la biodiversidad. Prioridades en México. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Primera Edición. Jiutepec, Morelos. 73p.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature). 2016. IUCN red list of threatened species. Version 2016.2. www.iucnredlist.org. Visitado el 12 de Octubre 2016.
- Jakobsson, M., N.A. Rosenberg. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics.* 23(14):1801-1806.
- Jamieson, I.G., F.W. Allendorf. 2012. How does the 50/500 rule apply to MVPs?. *Trends Ecol. Evol.* 27:578–584.
- Jarne, P., P.J.L. Lagoda. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* 11, 424-429.
- Jehle R., J. Arntzen, T. Burke, A. Krupa, W. Hodl. 2001. The annual number of breeding adults and the effective population size of syntopic newts (*Triturus cristatus*, *T. marmoratus*). *Mol. Ecol.* 10:839-50.
- Jennings, M.R. 1988. Natural history and decline of native ranids in California. En: Delisle, H.F., P.R. Brown, B. Kaufman, B.M. McGurty (eds.). *Proceedings of the Conference on California herpetology*. Southwestern Herpetologists Society Special Publication. pp 61-72.
- Jennings, M.R., M.P. Hayes. 1994. *Amphibians and Reptiles Species of Special Concern in California*. California Department of Fish and Game. Rancho Cordova, California. 260p.
- Jofre, M.B., W.H. Karasov. 1999 Direct effect of ammonia on three species of North American anuran amphibians. *Environ. Toxicol. Chem.* 18:1806-1812.
- Joseph, M.B., D.L. Preston, P.T.J. Johnson. 2016. Integrating occupancy models and structural equation models to understand species occurrence. *Ecology.* 97(3):765-775.
- Kalinowski, S.T. 2005. HP-Rare: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity. *Mol. Ecol. Notes.* 5:187-189.
- Kaufman, J.B., W.C. Kreuger. 1984. Livestock impacts on riparian ecosystems and streamside management implications... a review. *J. Range Manage.* 37:430-438.
- Keller, L.F., D.M. Waller. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol. Evol.* 17:230-241.

- Keung, N. 2015. Longitudinal distribution and summer diurnal microhabitat use of California Red-Legged Frogs (*Rana draytonii*) in costal Waddell Creek. (Maestría en Ciencias). San Jose State University, Facultad de ciencias biológicas. 85p.
- Kilburn, V.L., R. Ibáñez, D.M. Green. 2011. Reptiles as potential vectors and hosts of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Panama. Dis. Aquat. Organ. 97:127-134.
- Kimura, M., J.F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics. 49:725-738.
- Kinney, V.C., J.L. Heemeyer, A.P. Pessier, M.J. Lannoo. 2011. Seasonal pattern of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and mortality in *Lithobates areolatus*: Affirmation of Vredenburg's "10,000 Zoospore Rule". PLoS One, 6(3):e16708.
- Kirkpatrick, M., N.H. Barton. 1997. Evolution of species' range. Am. Nat. 150:1-23.
- Knapp, R.A., D.M. Boiano, V. Vredenburg. 2007. Recovery of a declining amphibian (Mountain Yellow-legged Frog, *Rana muscosa*) following removal of non-native fish. Biol. Conserv. 135:11-20.
- Knapp, R.A., G.M. Feller, P.M. Kleeman, D.A.W. Miller, V.T. Vredenburg, E.B. Rosenblum, C.J. Briggs. 2016. Large-scale recovery of an endangered amphibian despite ongoing exposure to multiple stressors. P. Natl. Acad. Sci. USA. 113(42):11889-11894.
- Knutson, M.G., W.B. Richardson, D.M. Reineke, B.R. Gray, J.R. Parmelee, S.E. Weick. 2004. Agricultural ponds support amphibian populations. Ecol. Appl. 14:669-684.
- Kolby, J.E., S.D. Ramirez, L. Berger, D.W. Griffin, M. Jocque, L.F. Skerratt. 2015. Presence of amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in rainwater suggests aerial dispersal is possible. Aerobiologia 31:411-419.
- Kruger, K.M., F. Pereoglou, J.M. Hero. 2007. Latitudinal variation in the prevalence and intensity of chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) infection in Eastern Australia. Cons. Biol. 21:1280-1290.
- Krofta, D.M. 2003. California red-legged frog: jumping to survival. Endanger. Species Bull. May-June 2003:8-19.
- Lannoo, M.J., C. Petersen, R.E. Lovich, P. Nanjappa, C. Phillips, J.C. Mitchell, I. Macallister. 2011. Do frogs get their kicks on route 66? Continental US transect reveals spatial and temporal patterns of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection. PLoS ONE 6(7):e22211.
- Laweler, S.P., D. Dritz, T. Strange, M. Holyoak. 1998. Effects of introduced mosquitofish and bullfrogs on the threatened California red-legged frog. Conserv. Biol. 13:613:622.
- Lee, G.K. 2010. The presence of *Micropterus salmoides* (Large Mough Bass) influences the population of *Rana draytonii* (California Red-legged Frog) and *Pseudacris regilla* (Pacific Treefrog) in two ponds in Santa Barbara county, California. Tesis (Maestría en Ciencias Biológicas). San Luis Obispo, California. California Polytechnic State University. 100 p.
- León-Regagnon, V., S. Guillen-Hernández, M.A. Arizmendi-Espinosa. 2005 Intraspecific

- variation of *Haematoloechus floedae* Harwood, 1932 (Digenea: Plagiorchiidae), from *Rana* spp. in North and Central America. *J. Parasitol.* 91:915-921.
- Li, H.W., G.A. Lamberti, T.N. Pearsons, C.K. Tait, J.L. Li, J.C. Buckhouse. 1994. Cumulative effects of riparian disturbances along high desert trout streams of the John Day Basin, Oregon. *T. Am. Fish. Soc.* 123:627-640.
- Lind, A.J., P.Q. Spinks, G.M. Feller, H.B. Shaffer. 2011. Rangewide phylogeography and landscape genetics of the Western U.S. endemic frog *Rana boylei* (Ranidae): implications for the conservation of frogs and rivers. *Conserv. Genet.* 12:269-284.
- Lips, K.R., J.R. Mendelson III, A. Muñoz-Alonso, L. Canseco-Márquez, D.G. Mulcahy. 2004. Amphibians population declines in montane southern México: resurveys of historical localities. *Biol. Conserv.* 119:555-564.
- Lips, K.R., P.A. Burrowes, J.R. Mendelson III, G. Parra-Olea. 2005. Amphibian population declines in Latin America: a synthesis. *Biotropica.* 37:222-226.
- Livo, L.J. 2004. Methods for obtaining *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) samples for PCR testing. En: Roger, K.B. (ed.). Colorado Division of Wildlife Boreal Toad Research Report 2003. Colorado, EE.UU. pp. 64-68.
- Longcore, J.R., J.E. Longcore, A.P. Pessier, W.A. Halteman. 2007. Chytridiomycosis widespread in anurans of Northeastern United States. *J. Wild. Manage.* 71:435-444.
- Loo, J.A. 2011. Manual de genética de la conservación. CONAFOR Primera Edición. México. 196p.
- D.F.Lovich, R.E. 2009. Phylogeography and conservation of Arroyo Toad (*Bufo californicus*). Tesis (PhD en Biología). Loma Linda, California. Loma Linda University. 140p.
- Lowe, S., M. Browne, S. Boudjelas, M. De Poorter. 2000. 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database. The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN). 12p.
- Luikart, G., F.W. Allendorf, J.M. Cornuet, W.B. Sherwin. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J. Hered.* 89:238-247.
- Luja-Molina, V.H. 2011. Ecología, demografía y estado de conservación de poblaciones pequeñas y aisladas en oasis de Baja California Sur, México: el caso de la rana arborícola de Baja California. Tesis (Doctorado en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales). La Paz, Baja California Sur. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 141 p.
- Markert, J.A., D.M. Champlin, R. Gutjahr-Gobell, J.S. Grear, A. Kuhn, T.J. McGreevey Jr., A. Roth, M.J. Bagley, D.E. Nacci. 2010. Population genetic diversity and fitness in multiple environments. *BMC Evol. Biol.* 10:205.
- McCullagh, P., J.A. Nelder. 1989. Generalized linear models. Chapman and Hall. Second Edition. London. 511p.
- McMahon, T.A., L.A. Brannelly, M.W. Chatfield, P.T. Johnson, M.B. Joseph, V.J.

- McKenzie, C.L. Richards-Zawacki, M.D. Venesky, J.R. Rohr. 2013. Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* has nonamphibian hosts and releases chemicals that cause pathology in the absence of infection. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 110:210-215.
- McNeely, J.A., K.R. Miller, W.V. Reid, R.A. Mittermeier, T.B. Werner T.B. 1990. *Conserving the World's Biological Diversity. Consolidated Business Forms. First Edition.* Lock Heaven Pensilvania. 193p.
- Meirmans, P.G., P.H. Van Tienderen. 2004. GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Mol. Ecol. Notes.* 4:792-794.
- Mellink, E., V. Ferreira-Bartrina. 2000. On the wildlife of wetlands of the Mexican portion of the Río Colorado delta. *Bull. South. Cal. Acad. Sci.* 99:115-127.
- Mendelson III, J.R., K.R. Lips, R.W. Gagliardo, G.B. Rabb, J.P. Collins, *et al.* 2006. Confronting amphibian declines and extinctions. *Science.* 313: 48.
- Mendoza, R., C. Ramírez-Martínez, C. Aguilera, M.E. Meave del Castillo. 2014. Principales vías de introducción de las especies exóticas. En: Mendoza, R., P. Koleff (coords.). *Especies acuáticas invasoras en México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.* pp 43-73.
- Monsen, K.J., M.S. Blouin. 2003. Genetic structure in a montane ranid frog: restricted gene flow and nuclear-mitochondrial discordance. *Mol. Ecol.* 12:3275-3286.
- Newell D.A., R.L. Goldingay, L.O. Brooks. 2013. Population recovery following decline in an endangered stream-breeding frog (*Mixophyes fleayi*) from subtropical Australia. *PLoS One.* 8(3):e58559.
- Nyström, P., O. Svensson, B. Lardner, C. Bronmark, W. Graneli. 2001. The influence of multiple introduced predators on a littoral pond community. *Ecology.* 82:1023-1039.
- Ochoa-Ochoa, L., J.N. Urbina-Cardona, F.B. Vázquez, O. Flores-Villela, J. Bezaury-Creel. 2009. The effects of governmental protected areas and social initiatives for land protection on the conservation of Mexican amphibians. *PLoS One.* 4:e6878.
- Orodho, A.B., M.J. Trlica, C.D. Bonham. 1990. Long term heavy grazing effects on soil and vegetation in the four corners region. *Southwest. Nat.* 35:9-14.
- Ortíz-Serrato, L., G. Ruiz-Campos, J.H. Valdez-Villavicencio. 2014. Diet of the exotic american bullfrog, *Lithobates catesbeianus*, in a stream of northwestern Baja California, Mexico. *West. N. Am. Nat.* 74(1):116-122.
- Otha, T., M. Kimura. 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genet. Res.* 22:201-204.
- Padgett-Flohr, G.E. 2008. Pathogenicity of *Batrachochytrium dendrobatidis* in two threatened California amphibians: *Rana draytonii* and *Ambystoma californiense*. *Herpetol. Conserv. Biol.* 3:182-191.
- Padgett-Flohr, G.E., R.L. Hopkins. 2009. *Batrachochytrium dendrobatidis*, a novel pathogen approaching endemism in central California. *Dis. Aquat. Organ.* 83:1-9.
- Parra-Olea, G, M. García-Paris, D. B. Wake. 1999 Status of some populations of mexican salamanders (Amphibia: Plethodontidae). *Rev. Biol. Trop.* 47:217-223.

- Parra-Olea, G., O. Flores-Villela, C. Mendoza-Almeralla. 2014. Biodiversidad de anfibios en México. *Rev. Mex. Biodiv. Supl.* 85: S460-S466.
- Parris, M.J., T.O. Cornelius. 2004. Fungal pathogen causes competitive and developmental stress in larval amphibian communities. *Ecology*. 85:3385-95
- Peralta-García, A. 2006. Relaciones filogenéticas del genero *Batrachoseps* en Baja California. Tesis (Licenciatura en Biología). Ensenada, Baja California. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias. 99 p.
- Peterson, B.K., J.N. Weber, E.H. Kay, H.S. Fisher, H.E. Hoekstra. 2012. Double Digest RADseq: An Inexpensive Method for De Novo SNP Discovery and Genotyping in Model and Non-Model Species. *PLoS ONE* 7(5): e37135.
- Piñero, D., D. Cabrera-Toledo, C.E. Canteros, *et al.* 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. En: CONABIO. Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. México, D.F. pp 437-494.
- Piovia-Scott, J., K.L. Pope, S.P. Lawler, E.M. Cole, J.E. Foley. 2011. Factors related to the distribution and prevalence of the fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Rana cascadae* and other amphibians in the Klamath Mountains. *Biol. Conserv.* 144:2913-2921.
- R Development Core Team. 2008. R: A language and environment of statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. URL <http://www.R-project.org>.
- Rachowicz, L.J., R.A. Knapp, J.A. Morgan, M.J. Stice, V.T. Vredenburg, J.M. Parker, C.J. Briggs. 2006. Emerging infectious disease as a proximate cause of amphibian mass mortality. *Ecology*. 87:1671-1683.
- Rachowicz, L.J., J. Briggs. 2007. Quantifying the disease transmission function: effects of density on *Batrachochytrium dendrobatidis* transmission in the Mountain Yellow-Legged Frog *Rana muscosa*. *J. Anim. Ecol.* 76:711-721.
- Rannala, B., J.L. Mountain. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:9197-9201.
- Recuero, E., I. Martínez-Solano, G. Parra-Olea, M. García-París. 2006. Phylogeography of *Pseudacris regilla* (Anura: Hylidae) in western North America, with a proposal for a new taxonomic rearrangement. *Mol. Phylogenet. Evol.* 39:293-304.
- Reitzel, A.M., S. Herrera, M.J. Layden, M.Q. Martindale, T.M. Shank. 2013. Going where tRADitional markers have not gone before: utility of and promise for RAD sequencing in marine invertebrate phylogeography and population genomics. *Mol. Ecol.* 22:2953-2970.
- Retallick, R.W., V. Miera. 2007. Strain differences in the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and nonpermanent, sublethal effects of infection. *Dis. Aquat. Organ.* 75:201-7
- Richmond, J., A. Backlin, P. Tatarian, B. Solvesky, R. Fisher. 2014. Population declines lead to replicate patterns of internal range structure at the tips of the distribution of the California red-legged frog (*Rana draytonii*). *Biol. Conserv.* 172:128-137.

- Richmond, J., K. Barr, A. Backlin, A. Vandergast, R. Fisher. 2013. Evolutionary dynamics of a rapidly receding southern range boundary in the threatened California red-legged frog (*Rana draytonii*). *Evol. Appl.* 6(2013):808-22.
- Riley, S.P.D., G.T. Busteed, L.B. Kats, T.L. Vandergon, L.F.S. Lee, R. Dagit, J.L. Kerby, R.N. Fisher, R.M. Sauvajot. 2005. Effects of urbanization on the distribution and abundance of amphibians and invasive species in southern California streams. *Conserv. Biol.* 19:1894-1907.
- Rorabaugh, J.C., M.J. Sredi, V. Miera, C.A. Drost. 2002. Continued invasion by an introduced frog (*Rana berlandieri*): southwestern Arizona, southeastern California, and Rio Colorado, Mexico. *Southwest. Nat.* 47:12-20.
- Rosenberg, N.A. 2004. DISTRUCT: a program for the geographical display of population structure. *Mol. Ecol. Notes.* 4:137-138.
- Rovito, S.M., G. Parra-Olea, C.R. Vásquez-Almazán, T.J. Papenfuss, D.B. Wake. 2009. Dramatic declines in neotropical salamander populations are an important part of the global amphibians crisis. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 106:3231-3236.
- Rowe, J.C., Garcia, T.S. 2014. Impacts of Wetland Restoration Efforts on an Amphibian Assemblage in a Multi-invader Community. *Wetlands.* 34:141-153.
- Royston, J.P. 1995. Remark AS R94: A remark on Algorithm AS 181: The W test for normality. *Appl. Stat. J. Roy. St. C.* 44:547-551.
- Ruiz-Campos, G., J.H. Valdez-Villavicencio. 2012. *Xenopus laevis*: Geographic Distribution. *Herpetol. Rev.* 43:99.
- Ruiz-Campos, G. 1993. *Bionomía y ecología poblacional de la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss nelsoni* (Evermann), de la Sierra San Pedro Mártir, Baja California, México.* Tesis (Doctorado en Ecología Acuática y Pesca). Monterrey, Nuevo León. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. 223 p.
- Ruiz-Campos, G., P. Cota-Serrano. 1992. *Ecología alimenticia de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss nelsoni*) del Arroyo San Rafael, Sierra San Pedro Mártir, Baja California, México.* *Southwest. Nat.* 37:166-177.
- Ruiz-Campos, G., F. Camarena-Rosales, S. Contreras-Balderas, C.A. Reyes-Valdez, J. De La Cruz-Agüero, E. Torres-Balcazar. 2006. Distribution and Abundance of the Endangered Killifish, *Fundulus lima* (Teleostei: Fundulidae), in Oases of Central Baja California Peninsula, México. *Southwest. Nat.* 51(4):502-509.
- Ruiz-Campos, G., S. Contreras-Balderas, A. Andreu-Soler, A. Varela-Romero, E. Campos. 2012. An annotated distributional checklist of exotic freshwater fishes from the Baja California peninsula, Mexico. *Rev. Mex. Biodiv.* 83:216-234.
- Ruiz-Campos, G., A. Varela-Romero, S. Sánchez-González, F. Camarena-Rosales, A. Maeda-Martínez, A.F. González-Acosta, A. Andreu-Soler, E. Campos-González, J. Delgadillo-Rodríguez. 2014. Peces invasores del noroeste de México. En: Mendoza R, Koleff P (ed), *Especies acuáticas invasoras en México.* Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, Primera edición. México, D.F. pp. 43-73

- Scheele, B.C., F. Guarino, W. Osborne, D.A. Hunter, L.F. Skerratt, D.A. Driscoll. 2014. Decline and re-expansion of an amphibian with high prevalence of chytrid fungus. *Biol. Conserv.* 170(1):86-91.
- Schmutzer, A.C., M.J. Gray, E.C. Burton, D.L. Miller. 2008. Impacts of cattle on amphibian larvae and the aquatic environment. *Freshwater Biol.* 53:2613-2625.
- Schoville, S.D., T.S. Tustall, V.T. Vredenburg, A.R. Backlin, E. Gallegos, D.A. Wood, R.N. Fisher. 2011. Conservation genetics of evolutionary lineages of the endangered mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa* (Amphibia: Ranidae), in southern California. *Biol. Conserv.* 144:2031-2040.
- Selkoe, K.A., R.J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Lett.* 9:615-629.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2015. ACUERDO por el que se actualiza la disponibilidad media anual de agua subterránea de los 653 acuíferos de los Estados Unidos Mexicanos, mismos que forman parte de las regiones hidrológico-administrativas que se indican. Diario Oficial de la Federación, 20 de abril 2015.
- Seppä, P., A. Laurila. 1999. Genetic structure of island populations of the anurans *Rana temporaria* and *Bufo bufo*. *Heredity.* 82:309-317.
- Sexton, J.P., P.J. McIntyre, A.L. Angert, K.J. Rice. 2009. Evolution and ecology of species range limits. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40:415-436.
- Shaffer, H.B., G.M. Fellers, A. Magee, S.R. Voss. 2000. The genetics of amphibian declines: population substructure and molecular differentiation in the Yosemite toad, *Bufo canorus* (Anura, Bufonidae) based on single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) and mitochondrial DNA sequence data. *Mol. Ecol.* 9:245-257.
- Shaffer, H.B., G.M. Fellers, S.R. Voss, J.C. Oliver, G.B. Pauly. 2004. Species boundaries, phylogeography and conservation genetics of the red-legged frog (*Rana aurora/draytonii*) complex. *Mol. Ecol.* 13:2667-2677.
- Side, R.C., A. Sharma. 1996. Stream channel changes associated with mining and grazing in the Great Basin. *J. Environ. Qual.* 25:1111-1121.
- Skerratt, L.F., L. Berger, R. Speare, S. Cashins, K. R. McDonald, A. Phillott, H. Hines, N. Kenyon. 2007. Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth.* 4:125-134.
- Sociedad Geológica Mexicana (SGM). 2011. Panorama Minero del Estado de Baja California. En: Panorama Minero de los Estados. Gobierno Federal, México. pp 51.
- Spielman, D., B.W. Brook, R. Frankham. 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:15261-15264.
- Stebbins, R.C. 2003. Western reptiles and amphibians. Houghton Mifflin. Tercera Edición. Boston. 533p.
- Storer, T.I. 1925. A synopsis of the amphibia of California. *Univ. Calif. Publ. Zool.* 27:1-342.
- Stuart, S.N., J.S. Chanson, N.A. Cox, B.E. Young, A.S. Rodrigues, D.L. Fischman, R.W.

- Waller. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*. 306:1783-1786.
- Stuart, S.N., M. Hoffmann, J.S. Chanson, N.A. Cox, R.J. Berridge, P. Ramani, B.E. Young (eds.). 2008. *Threatened amphibians of the world*. Lynx Editions. First Edition. Barcelona. 134p.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol. Evol.* 15:199-203.
- Tallmon, D.A., G. Luikart, R.S. Waples. 2004. The alluring simplicity and complex reality of genetic rescue. *Trends Ecol. Evol.* 19:489-496
- U.S. Fish and Wildlife Service (USFWS). 2002. Recovery Plan for the California Red-Legged Frog (*Rana aurora draytonii*). USFWS. Portland, Oregon. 173p.
- Varela-Romero, A., G. Ruiz-Campos, L.M. Yépez-Velázquez, J. Alaníz-García. 2003. Distribution, habitat, and conservation status of desert pupfish (*Cyprinodon macularius*) in the lower Colorado River basin, Mexico. *Rev. Fish Biol. Fish.* 12:157-165.
- Venables, W.N., B.D. Ripley. 2002. *Modern Applied Statistics with S*. Springer. Fourth Edition. New York. 498p.
- Vredenburg, V.T. 2004. Reversing introduced species effects: experimental removal of introduced fish leads to rapid recovery of a declining frog. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:7646–7650.
- Vredenburg, V.T., R.A. Knapp, T.S. Tunstall, C.J. Briggs. 2010. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 107:9689–9694.
- Vredenburg, V.T., S.A. Felt, E.C. Morgan, S.V.G. McNally, S. Wilson, S.L. Green. 2013. Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Xenopus* Collected in Africa (1871-2000) and in California (2001-2010). *PLoS ONE*. 8:e63791.
- Wang, J. 2004. Application of the one-migrant-per-generation rule to conservation and management. *Conserv. Biol.* 18:332–343.
- Weeks, J.M., I. Sims, C. Lawson, D.J. Harrison. 2003. River mining: assessment of the ecological effects of river mining in the Rio Minho and Yallahs rivers, Jamaica. British Geological Survey Commissioned Report, CR/03/16N. pp 53.
- Welsh, H.H. 1988. An ecogeographic análisis of the herpetofauna of the Sierra San Pedro Mártir Region, Baja California, with a contribution to the biogeography of the Baja California hepetofauna. *Proc. Calif. Acad. Sci.* 46:1-72.
- Wickham, H. 2009. *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. Springer-Verlag. First Edition. New York. 211p.
- Wilson, J.D., M.E. Dorcas. 2003. Effects of habitat disturbance on stream salamanders: implications for buffer zones and watershed management. *Conserv. Biol.* 17(3):763-7

ANEXOS

- Anexo A.** Registros de *R. draytonii* en colecciones científicas y publicaciones. SDNHM: San Diego Natural History Museum, MVZ: Museum of Vertebrate Zoology, LACM: Los Angeles County Museum, USNM: The National Collection, UABC: Universidad Autónoma de Baja California, CAS: California Academy of Science. 120
- Anexo B.** Sitios de visitados durante el presente proyecto. Se indica el año de registro en localices históricas; el año de muestreo, así como el número de días visitados y si los muestreos se realizaron durante el día (D) o la noche (N); la elevación; y la distancia total recorrida en el sitio en búsqueda de *Rana draytonii*. Los sitios están ordenados de norte a sur, por cuenca hidrológica..... 122
- Anexo C.** Aportaciones de cada uno de los primeros ocho componentes principales seleccionados para las variables ambientales. En negritas se indica los valores más altos en cada componente. 124
- Anexo D.** Resultados del modelo de regresión lineal generalizado para las variables ambientales, utilizando los ocho componentes principales del Anexo C. * indica valores significantes ($p < 0.05$) 125
- Anexo E.** Valores de cada variable antropogénica registrada en los sitios de muestreo. Distancia al poblado (Dis. Pob) y distancia al cultivo (Dis. Cul) en kilómetros; porcentaje de área natural (% A.N.), ganadería (Gan), turismo (Tur), extracción de agua (Ex. Ag.) y número de especies Exóticas (Esp. Exo). 126
- Anexo F.** Distribución geográfica de los niveles de amenaza de ganadería, turismo y extracción de agua en los sitios de estudio..... 128
- Anexo G.** Registro de especies exóticas en la región mediterránea. Se incluyen los registros previos a la fecha y los registros nuevos obtenidos durante el presente estudio. 1) *Procambarus clarkii*, 2) *Ameiurus melas*, 3) *Cyprinus carpio*, 4) *Dorosoma petenense*, 5) *Gambusia affinis*, 6) *Ictalurus punctatus*, 7) *Lepomis cyanellus*, 8) *Lepomis macrochirus*, 9) *Micropterus salmoides*, 10) *Tilapia cf. zillii*, 11) *Rana catesbeiana*, 12) *Xenopus laevis*, 13) *Apalone spinifera*, 14) *Trachemys scripta*. Códigos de las referencias A) Sánchez et al. 1993; B) Grismer 2002; C) Hernández et al. 2008; D) Ruiz-Campos et al. 2012; E) Ruiz-Campos and Valdez-Villavicencio 2012, 2014; F) Registro de Museo (CAS); y G) este estudio. 129
- Anexo H.** Mapa de distribución geográfica de registros previos y nuevos de especies exóticas del área de estudio. Los mapas agrupan las especies por grupos taxonómicos: invertebrados, peces, anfibios (ranas) y reptiles (tortugas)..... 131
- Anexo I.** Características y aportaciones de cada uno de los seis componentes principales seleccionados para las variables ambientales, utilizando la base de datos donde se eliminaron siete variables ambientales por correlación con variables antropogénicas. 133

- Anexo J.** Resultados del modelo de regresión lineal generalizado para las variables ambientales con siete variables ambientales eliminadas por correlación con variables antropogénicas. * indica valor significativo..... 134
- Anexo K.** Obtención del índice de amenazas 2, para el total de los sitios visitados. Se excluyen aquellos sitios que carecían de hábitat. Se incluyen los datos originales para cada variable y los datos ajustados a la escala utilizada: porcentaje de área natural (% A.N), distancia al poblado (D.P.), ganadería (Gan), y número de especies exóticas (Exo). El número de localidad corresponde al Anexo B..... 135
- Anexo L.** Sitios muestreados para *B. dendrobatidis*. Se indica el número de individuos muestreados, la prevalencia, la media del valor zoospórico equivalente (ZE) y la elevación del sitio..... 137
- Anexo M.** Diversidad genética para las poblaciones de *Rana draytonii* a lo largo de su distribución. Obtenido de Richmond et al. 2013, 2014. N: número de muestras, Lp: Locus polimórfico, A: Riqueza alélica, Ar: riqueza alélica por rarefracción, Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada, Gis: índice de endogamia. 139
- Anexo N.** Lista de publicaciones científicas resultantes de los datos obtenidos del presente trabajo de tesis..... 140

Anexo A. Registros de *R. draytonii* en colecciones científicas y publicaciones. SDNHM: San Diego Natural History Museum, MVZ: Museum of Vertebrate Zoology, LACM: Los Angeles County Museum, USNM: The National Collection, UABC: Universidad Autónoma de Baja California, CAS: California Academy of Science.

	Localida	Número de Catálogo	Años	n
1.	Tecate	SDNHM 10411	1933	1
2.	20 mi al sur de Tecate	MVZ 31786-91	1939	6
3.	Cañon San Carlos, 7.3 miles este del Highway 1	LACM 9803	1957	1
4.	Santo Tomas, Arroyo Santo Tomas	USNM 37699	1905	1
5.	Arroyo San Vicente, 12 mi E of San Vicente	SDNHM 61159	1978	1
6.	Arroyo San Rafael, near Colonel	Grisner (2002)		1
7.	Mike's Sky Ranch, Sierra San Pedro Mártir	LACM 137817, 1388519-20; Welsh (1988)*	1970; 1973	3
8.	Arroyo San Rafael, ca. 7 mi N Mike's Sky Ranch,	MVZ 140736; Welsh (1988)*	1973	1
9.	Rancho Meling (San José), Sierra San Pedro Mártir	CAS 57482-83; MVZ 9663-4, 9837; SDNHM 42195; Welsh (1988)*	1923, 1925, 1952, 1973*	6
10.	Rancho El Molino, Arroyo San José	UABC 1501	2006	1
11.	Rancho Las Cabras, Arroyo San José	CAS 57510; LACM 91123	1923; 1971	2
12.	La Jolla, Sierra San Pedro Mártir	Welsh (1988)*	1973	
13.	Rancho El Potrero, Arroyo El Potrero	Fidenci (2004)*; UABC 1504, 1623-4, 1627-8	2002*, 2003*, 2006	15
14.	Rancho Viejo, Sierra San Pedro Mártir	Welsh (1988)*	1973	
15.	Arroyo La Encantada, Sierra San Pedro Mártir	CAS 57045-57, 57073-171, 57610; SDNHM 36457; Welsh (1988)*	1923, 1945, 1973	113, 1

16. La Grulla, Sierra San Pedro Mártir	USNIM 37700; CAS 57237-93; MVZ 9820-7, 9838-9, 51088-9; MVZ 140732-5; SDNHM 44283-6, 57441-50; UABC 1649-50	1905; 1923; 1925, 1949; 1961, 1973; 1976; 2006	90
17 Arroyo San Antonio Head (=Arroyo La Vibora), SSPM	Welsh (1988)*	1973	
18. Arroyo Valladares, SSPM	MVZ 9830-4	1925	5
19. Rancho San Antonio Murillos, SSPM	USNIM 37701; MVZ 9835-6; Welsh (1988)*; UABC 878, 1223	1905; 1925; 1973; 2003, 2004	5
20. Rio Santo Domingo, 3.7 mi E (by road) Colonia Guerrero,	MVZ 171777; Fidenci (2004)*	1977, 2002*	1
21. San Ramon, mouth of Rio Santo Domingo	MVZ 9870-5	1925	6
22. Rio Santo Domingo	CAS 2656, 55793; CAS 2656	1922; 1937	2
23. San Pedro Martir Mountains	USNIM 23668-70; CAS 798-800, 12956-7	1889; 1893, 1953	8

Anexo B. Sitios de visitados durante el presente proyecto. Se indica el año de registro en localices históricas; el año de muestreo, así como el número de días visitados y si los muestreos se realizaron durante el día (D) o la noche (N); la elevación; y la distan distancia total recorrida en el sitio en búsqueda de *Rana draytonii*. Los sitios están ordenados de norte a sur, por cuenca hidrológica.

Localidad	Año de registro	Muestreo		Elev. (m)	Dist. (km)
		2013	2014		
01- Rancho las Dos Cumbres, Arroyo Tecate	1933	1D	-	620	1
02- Cañada Panda, 17 km SE Tecate		1D	-	580	1.5
03- Nejí		1D	-	915	0.2
04- El Gato, Cañón Las Parras		2D	-	855	0.5
05- Cañón El Alamo, Arroyo Las Palmas	1939	1D, 1N	1D	488	1.3
06- Dam at Rancho El Compadre, Sierra Juárez		1D	-	1,115	0.2
07- Rancho Talegas, Arroyo Las Calabazas		1D	-	1,180	1
08- Rancho Los Aguajitos		1D	-	930	1
09- Rancho San Faustino, Sierra Juárez		2D, 1N	-	1,270	1
10- El Morro, Cañada El Morro		1D	-	5	2
11- Rancho San Juan de Dios, Arroyo La Calabaza		1N	-	1,260	0.4
12- Cañón Agua Caliente, Arroyo Guadalupe		2D, 1N	-	390	1.5
13- La Misión, Arroyo Guadalupe		2N	1N	1	0.5
14- Arroyo Casa Verde, Sierra Juárez		2D, 1N	2D, 1N	1,370	1.7
15- Real del Castillo, Arroyo El Barbón		1D, 1N	1D	625	1
16- Cañada Salsipuedes		1D, 1N	-	125	0.5
17- Cañada Miracielo		1D, 1N	1D	358	1
18- 11.8 km E Hwy 1, San Carlos Canyon	1957	1D, 1N	1N	70	0.5
19- Arroyo El Zorrillo, Ejido Uruapan		1D	-	187	0.8
20. Santo Tomás	1905	-	-	160	-
21- Rancho Agua Caliente		3D, 3N	-	495	2
22- 19.3 km E of San Vicente	1978	2D, 2N	2D, 1N	218	3.5
23- Ejido Benito Juárez ⁱ	(1990's)	-	-	120	-

Localidad	Año de registro	Muestreo		Elev. (m)	Dist. (km)
		2013	2014		
24- 23 km E of Colonet		1D, 1N	2D, 1N	220	1
25- 32 km E of Colonet		-	3D, 2N	340	3.5
26- 6.6 km West of Rancho Mike's Sky		1N	-	1,036	0.55
27- Rancho Mike's Sky	1970, (1973-9)	2D, 2N	2D, 1N	1,220	4.3
28- Rancho Garet	(1973-9)	1D, 1N	-	1,350	0.8
29- Rancho Meling (San José), Arroyo San José	1923-1952, (1973-9)	2D, 2N	1D, 1N	620	0.2
30- Rancho El Molino, Arroyo San José	2006	3D, 2N	-	555	1.5
31- Cañón La Jolla	(1973-9)	-	2D, 2N	1,560	2.1
32- Rancho El Potrero	2002-3; 2006	2D, 2N	1N	890	1.5
33- Rancho Viejo	(1973-9)	1D	1D	2,050	2.5
34- La Encantada	1923-45, (1973-9)	2D, 1N	-	2,130	4
35- La Grulla	1905-2006	3D, 2N	2D, 2N	2,070	2
36- Arroyo La Vibora	(1973-9)	-	2D, 2N	1,880	1
37- Rancho Valladares	1925	2D, 2N	1D	720	3
38- 7.5 km S from Rancho Valladares	-	-	2D, 2N	635	3
39- Rancho San Antonio	1905-2004	2D, 2N	2D, 2N	560	1
40- Arroyo El Caballo	-	-	1D	500	0.5
41- San Ramón	1925	-	-	6	-
42- 3.95 km E of Colonia Guerrero	1977, 2002	-	-	60	-
43- 2 km S of Rancho La Canastilla	-	2D, 1N	1D, 1N	145	2
44- San Isidoro, Arroyo El Horno,	-	-	2D, 2N	920	2.2

Anexo C. Aportaciones de cada uno de los primeros ocho componentes principales seleccionados para las variables ambientales. En negritas se indica los valores más altos en cada componente.

Ejes	1	2	3	4	5	6	7	8
Desviación estándar	2.37	1.87	1.73	1.30	1.26	1.18	1.12	1.04
Varianza	0.22	0.14	0.12	0.06	0.06	0.05	0.05	0.04
Varianza acumulada	0.22	0.35	0.47	0.53	0.59	0.65	0.69	0.74
Contribución de cada variable								
Temperatura	0.00	0.02	0.28	-0.33	-0.16	-0.20	0.12	0.38
pH	0.08	-0.14	-0.36	-0.20	0.23	0.13	0.05	-0.02
Conductividad	-0.20	-0.40	-0.18	0.05	-0.22	-0.05	0.05	0.02
Salinidad	-0.20	-0.40	-0.19	0.04	-0.22	-0.05	0.06	0.03
Sólidos Disueltos Totales	-0.20	-0.40	-0.18	0.06	-0.21	-0.05	0.05	0.02
Velocidad de la corriente	-0.08	-0.16	-0.03	0.39	0.46	-0.07	0.16	0.05
Ancho del Arroyo	0.08	-0.15	0.24	-0.25	0.18	0.28	-0.19	-0.15
Ancho total del Arroyo	0.04	-0.13	0.37	0.02	-0.12	0.16	0.12	-0.39
Profundidad	0.25	0.14	-0.04	-0.08	-0.17	-0.05	0.01	0.13
Cobertura vegetal	0.15	-0.24	-0.16	-0.04	0.14	0.01	-0.37	0.01
Número de Caídas de agua	0.27	-0.03	-0.17	0.24	0.17	-0.06	-0.01	-0.21
Número de Pozas	0.17	-0.15	0.23	-0.20	0.01	-0.22	0.17	0.14
% de Vegetación acuática	0.15	0.13	-0.21	0.10	-0.10	-0.49	0.17	0.15
% de Pozas Bajas	0.26	0.11	-0.20	-0.06	0.05	-0.34	0.07	-0.29
% de Pozas Medianas	0.32	-0.16	-0.06	0.08	-0.21	-0.05	-0.17	0.01
% de Pozas Profundas	0.29	-0.16	0.01	0.16	-0.28	0.18	0.02	0.11
% de Tierra en el banco	-0.09	0.15	-0.37	-0.30	-0.08	0.21	-0.15	0.09
% de Arena en el banco	-0.15	0.08	0.27	0.41	-0.14	-0.22	-0.24	-0.01
% de Grava en el banco	-0.06	-0.11	0.04	-0.08	0.29	0.06	0.64	0.04
% de canto rodado en el banco	0.01	-0.25	0.18	-0.19	0.02	-0.34	-0.11	-0.35
% de adoquín en el banco	0.24	-0.24	0.13	0.06	-0.11	0.21	0.15	0.05
% de roca grande en el banco	0.27	0.07	-0.02	0.35	-0.02	0.22	0.06	0.00
% de arena en el arroyo	-0.28	0.17	0.03	0.14	-0.18	0.08	0.06	-0.15
% de grava en el arroyo	0.00	-0.15	0.16	0.15	0.29	0.02	-0.26	0.56
% de canto rodado en el arroyo	0.20	-0.21	0.08	-0.11	0.19	-0.18	-0.17	-0.04
% de roca grande en el arroyo	0.33	0.01	-0.01	0.03	-0.19	0.17	0.19	0.09

Anexo D. Resultados del modelo de regresión lineal generalizado para las variables ambientales, utilizando los ocho componentes principales del Anexo C. * indica valores significantes ($p < 0.05$)

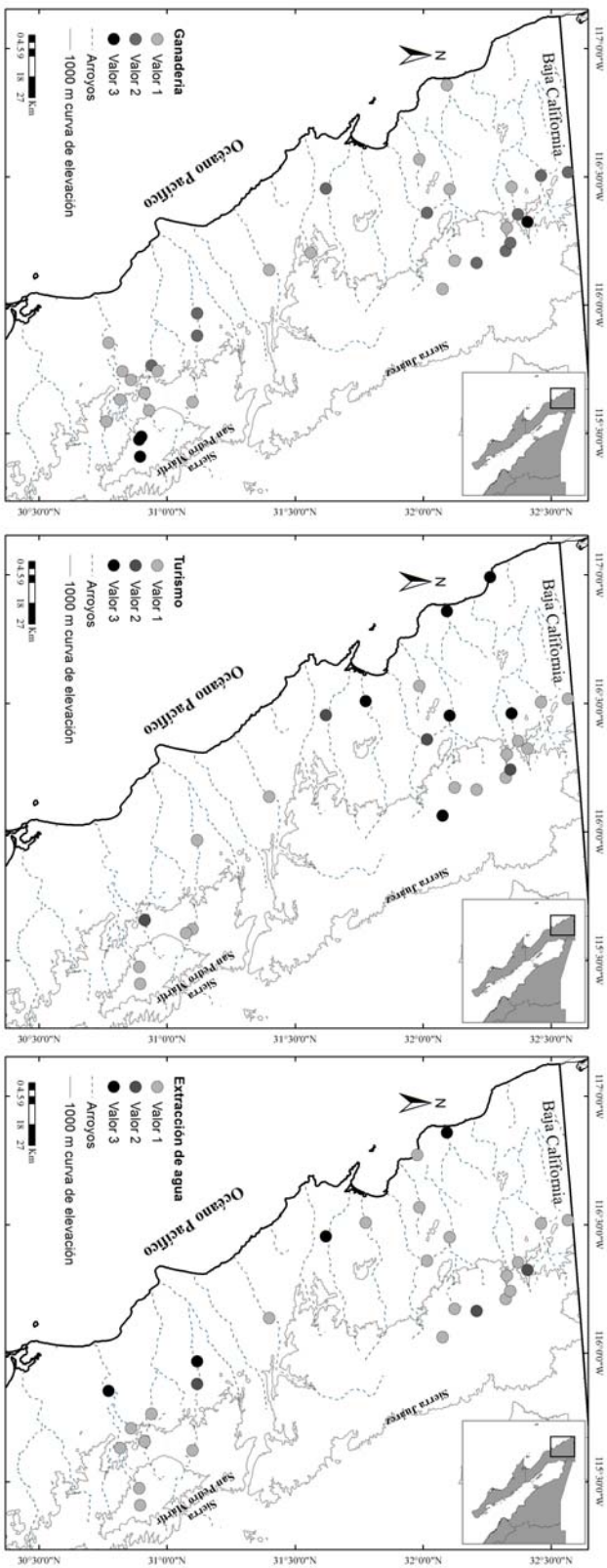
Variable dependiente: rana	Estimado	Error estándar	Valor de Z	valor de P
(Intercepto)	-0.08856	0.30672	-0.289	0.77279
PC1	0.24087	0.13831	1.742	0.0816
PC2	0.10034	0.16559	0.606	0.54452
PC3	0.34177	0.21353	1.601	0.10947
PC4	0.13261	0.22358	0.593	0.55309
PC5	-0.26372	0.2489	-1.06	0.28936
PC6	-1.07753	0.33346	-3.231	0.00123*
PC7	0.19461	0.26414	0.737	0.46126
PC8	-0.07251	0.29787	-0.243	0.80767

Anexo E. Valores de cada variable antropogénica registrada en los sitios de muestreo. Distancia al poblado (Dis. Pob) y distancia al cultivo (Dis. Cul) en kilómetros; porcentaje de área natural (% A.N.), ganadería (Gan), turismo (Tur), extracción de agua (Ex. Ag.) y número de especies Exóticas (Esp. Exo).

no	Localidad	Dis. Pob	Dis. Cul	% A.N.	Gan	Tur	Ex. Ag.	Esp. Exo.
1	Rancho Las dos Cumbres, arroyo Tecate	0.7	0.15	58	2	1	1	1
2	Cañada Panda, Tecate	6.4	5.6	98	2	1	1	2
3	Nejí	6.4	0.5	21	3	1	2	0
4	El Gato, Cañón Las Parras	9.6	5.8	64	2	1	1	1
5	Cañón El Alamo, arroyo Las Palmas	8.6	8.4	100	1	3	0	0
6	Represo en Rancho El Compadre	13.6	11.17	65	2	2	1	1
7	Rancho Talegas, arroyo Las Calabazas	15.3	10	98	1	1	1	1
8	Rancho Los Aguajitos	20	14.6	100	2	1	1	1
9	Rancho San Faustino	30	27	95	2	1	2	1
10	El Morro, arroyo El Morro	0.1	0.5	30	0	3	0	1
11	Rancho San Juan de Dios, arroyo La Calabaza	21	19	100	1	1	1	0
12	Cañón Agua Caliente, arroyo Guadalupe	11.3	2.3	82	1	3	1	3
13	La Misión, arroyo Guadalupe	0.1	0.3	5	1	3	3	5
14	Arroyo Casa Verde, Rancho la Casa Verde	26	21	100	1	3	1	0
15	Arroyo El Barbón, Real del Castillo	14	3	90	2	2	1	2
16	Cañada Salsipuedes, arroyo Salsipuedes	9	2	100	0	0	1	0
17	Cañada Miracielo, arroyo San Antonio	6.8	4	83	1	1	1	2
18	Arroyo San Carlos	2.3	0.6	10	0	3	1	4
19	Arroyo El Zorrillo, Ejido Uruapan	1.5	0.37	10	2	2	3	1
21	Rancho Agua Caliente, arroyo Santo Tomas	19	18	95	1	0	0	1
22	Rancho Agua Caliente, arroyo San Vicente	14	1.8	90	1	1	1	1
24	Arroyo San Rafael, 23 km E Colonet	12	0.1	95	2	1	3	0
25	Arroyo San Rafael, 32 km E Colonet	20	5	100	2	0	2	0
26	Oeste del Rancho Mikes Sky	31	21	100	0	0	0	1
27	Rancho Mike Sky, arroyo San Rafael	31.7	19	98	1	1	1	1

no	Localidad	Dis. Pob	Dis. Cul	% A.N.	Gan.	Tur.	Ex. Ag.	Esp. Exo.
28	Rancho Garet, SSPM	37	27	100	0	1	0	1
29	Rancho Meiling, arroyo San José	40	14	90	2	0	1	0
30	Rancho El Molino, arroyo San José	35	11	100	1	0	0	0
31	La Jolla	44	44	100	1	0	0	0
32	Rancho El Potrero, cuenca Santo Domingo	37	38	98	1	2	1	1
33	Rancho Viejo	42.5	52	65	3	0	0	1
34	La Encantada, Sierra San Pedro Mártir	43	59	50	3	1	1	0
35	La Grulla, Sierra San Pedro Mártir	52	31	50	3	1	1	1
36	La Vibora	47	49	100	0	0	0	1
37	Arroyo Valladares, cuenca Santo Domingo	30	30	90	1	0	1	0
38	Sur de Valladares	26	26	100	1	0	0	0
39	Arroyo San Antonio Murillos	36	37	100	1	0	1	0
43	Arroyo Santo Domingo, cerca de La Canastilla	14	15	100	1	0	3	1
44	San Ysidoro	42	40	100	1	0	0	0

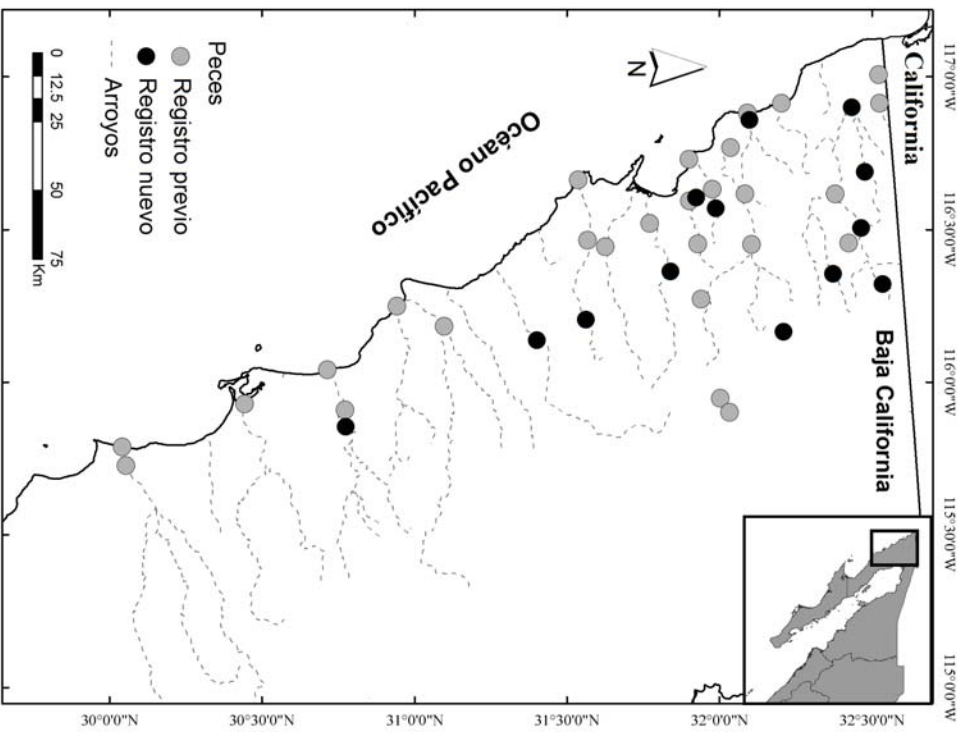
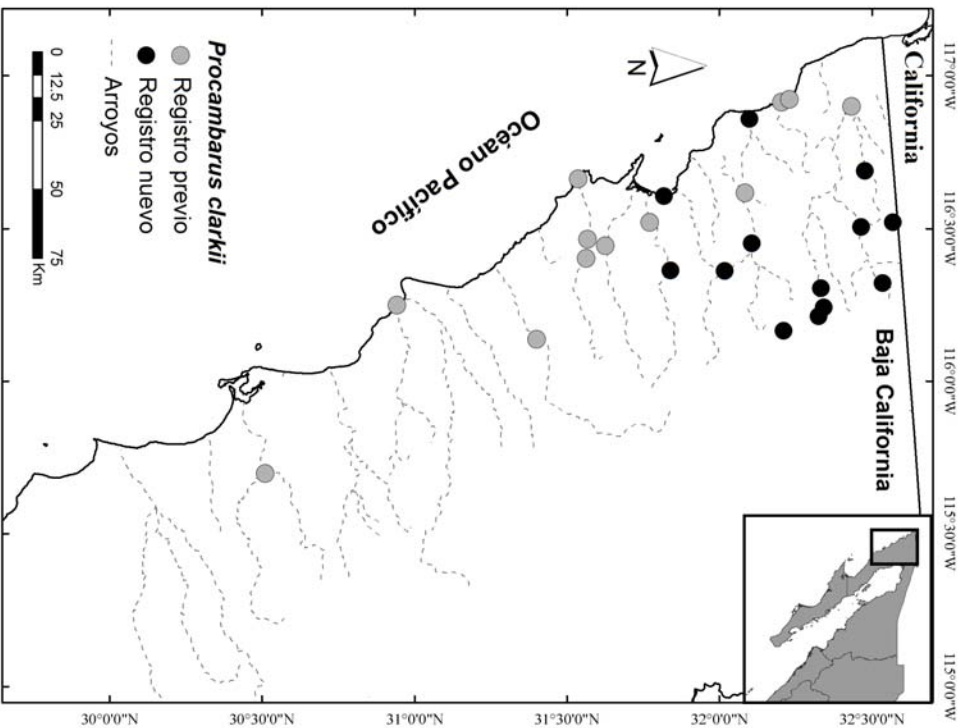
Anexo F. Distribución geográfica de los niveles de amenaza de ganadería, turismo y extracción de agua en los sitios de estudio.



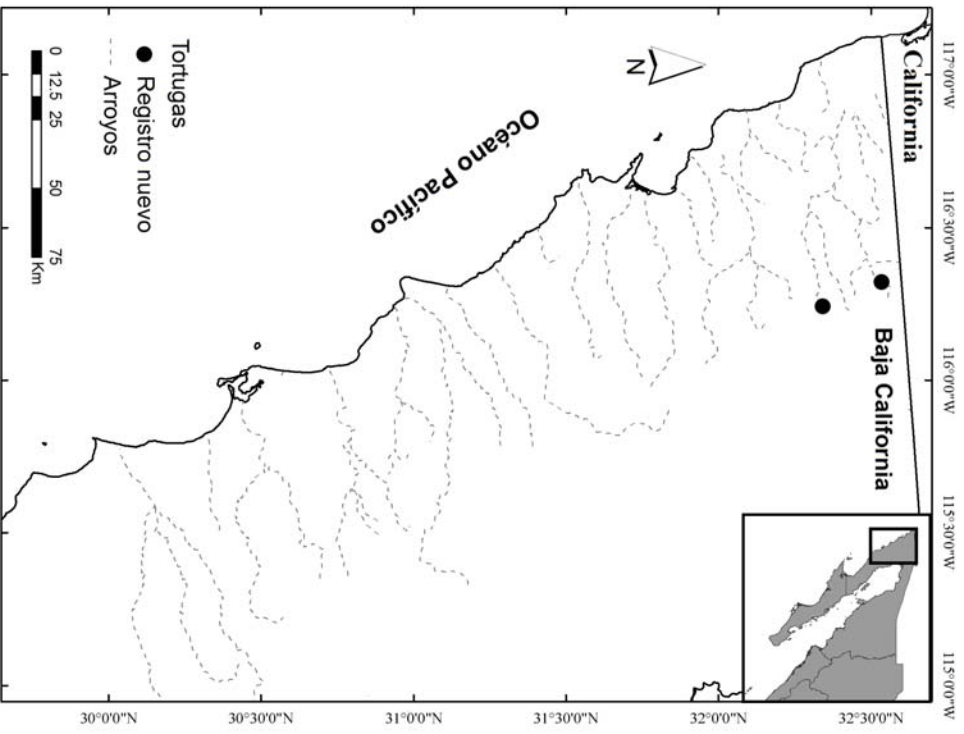
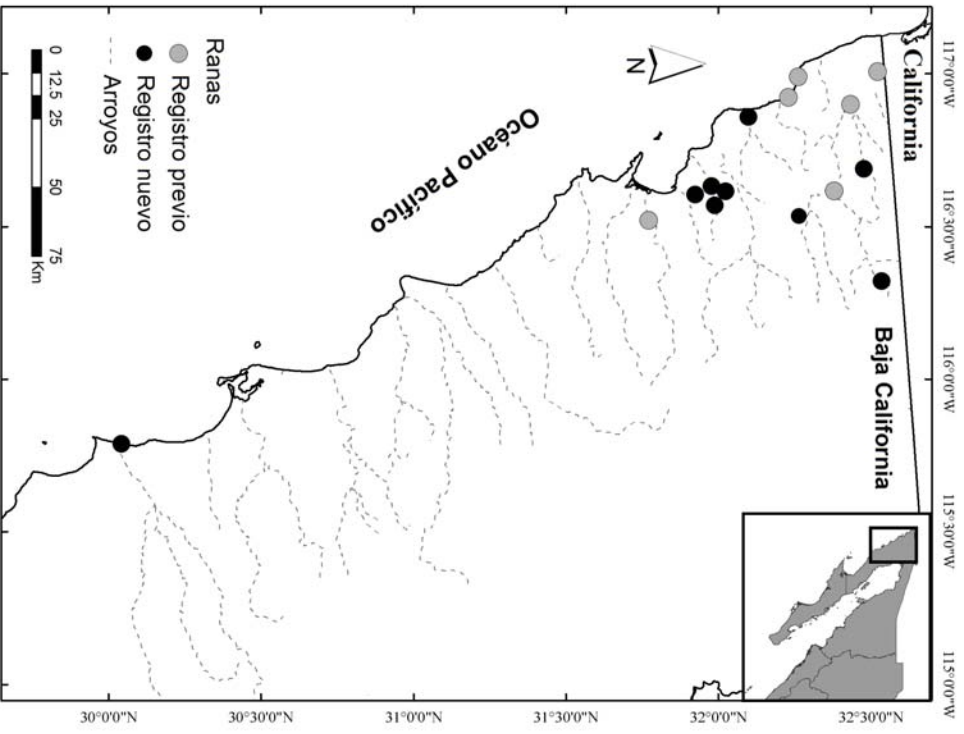
Anexo G. Registro de especies exóticas en la región mediterránea. Se incluyen los registros previos a la fecha y los registros nuevos obtenidos durante el presente estudio. 1) *Procambarus clarkii*, 2) *Ameiurus melas*, 3) *Cyprinus carpio*, 4) *Dorosoma petenense*, 5) *Gambusia affinis*, 6) *Ictalurus punctatus*, 7) *Lepomis cyanellus*, 8) *Lepomis macrochirus*, 9) *Micropterus salmoides*, 10) *Tilapia cf. zillii*, 11) *Rana catesbeiana*, 12) *Xenopus laevis*, 13) *Apalone spinifera*, 14) *Trachemys scripta*. Códigos de las referencias A) Sánchez et al. 1993; B) Grismer 2002; C) Hernández et al. 2008; D) Ruiz-Campos et al. 2012; E) Ruiz-Campos and Valdez-Villavicencio 2012, 2014; F) Registro de Museo (CAS); y G) este estudio.

Localidad	Cordenadas	Elev	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Rancho Ciénega Redonda	32.53071, -116.32568	970	G													
El Carrizo dam, Tijuana	32.47764, -116.68703	285	G									G	G			G
Cañada Panda, 17 km SE of Tecate	32.46100, -116.50385	580	G			G										
Abelardo L. Rodríguez dam, Tijuana	32.44183, -116.90962	95	C				G						B			
El Gato, Cañón Las Parras	32.37159, -116.35219	855					G									
Rancho El Compadre, Sierra Juárez	32.34129, -116.24087	1,115	G													G
Arroyo El Testerazo	32.29547, -116.56877	318					G									
Rancho El Chaco	32.26318, -116.53410	407			G				G					G		
Rancho San Faustino, Sierra Juárez	32.20913, -116.16386	1,270	G													
Cañón Agua Caliente, Arroyo Guadalupe	32.10450, -116.45150	390	G				D		D							
La Misión, Arroyo Guadalupe	32.09720, -116.85879	1	G	G			D							G		
Rancho Angélica, S. Antonio Minas	32.02216, -116.61506	370												G		
Real del Castillo, Arroyo El Barbón	32.01600, -116.35920	625	G											G		
Cañada Miracielo, Arroyo San Antonio	31.98677, -116.56700	358					G		G				G	G		
San Antonio de las Minas	31.97615, -116.63202	268							D				G	G		
Rancho Madrigal, Cañón Doña Petra	31.92247, -116.60377	240	G				G		D				G			
Arroyo Santa Clara	31.83831, -116.36114	374	G				G									
La Lagunita, Playa Hermosa, Ensenada	31.81680, -116.60604	1	G													
Boca del Arroyo El Rosario	30.04190, -115.78721	1					D							G		
Rancho las Dos Cumbres, Arroyo Tecate	32.56712, -116.51713	630	G													
Los Aguajitos, Arroyo Las Calabazas	32.32824, -116.30123	930	G													
Rancho Talegas, Arroyo Las Calabazas	32.32326, -116.21054	1,180	G													
Puente El Morro	32.26260, -116.99026	5												G		
Agua Caliente, Arroyo Santo Tomas	31.56149, -116.20435	495							G							
Agua Caliente, Arroyo San Vicente	31.40090, -116.13600	218					G									
near Rancho La Canastilla	30.77407, -115.85330	145							G							
Total localidades nuevas			14	1	2	1	8	0	6	0	2	0	8	2	1	2

Anexo H. Mapa de distribución geográfica de registros previos y nuevos de especies exóticas del área de estudio. Los mapas agrupan las especies por grupos taxonómicos: invertebrados, peces, anfibios (ranas) y reptiles (tortugas).



Continuación Anexo H.



Anexo I. Características y aportaciones de cada uno de los seis componentes principales seleccionados para las variables ambientales, utilizando la base de datos donde se eliminaron siete variables ambientales por correlación con variables antropogénicas.

Ejes	1	2	3	4	5	6
Desviación estándar	2.14	1.69	1.36	1.25	1.13	1.08
Varianza	0.23	0.14	0.09	0.08	0.06	0.06
Varianza acumulada	0.23	0.37	0.46	0.54	0.61	0.66
<i>Contribución de cada variable</i>						
Temperatura	-0.04	0.22	0.15	0.41	0.26	0.17
pH	-0.09	-0.27	-0.50	-0.01	-0.06	-0.13
Velocidad de la corriente	0.08	0.13	-0.28	-0.55	0.10	0.16
Ancho del Arroyo	-0.14	0.27	-0.19	0.21	-0.29	-0.24
Ancho total del Arroyo	-0.12	0.37	0.13	0.05	-0.36	0.09
Profundidad	-0.23	-0.22	0.19	0.12	0.14	0.00
Numero de Pozas	-0.24	0.22	-0.02	0.21	0.26	0.28
% de Vegetación acuática	-0.10	-0.28	0.13	-0.11	0.52	0.12
% de Pozas Medianas	-0.37	-0.09	0.09	-0.03	0.06	-0.13
% de Pozas Profundas	-0.37	-0.07	0.14	-0.12	-0.15	0.05
% de Tierra en el banco	0.16	-0.39	-0.13	0.29	-0.14	-0.10
% de Arena en el banco	0.16	0.25	0.43	-0.27	0.15	-0.18
% de Grava en el banco	0.02	0.11	-0.32	-0.07	-0.01	0.67
% de Canto Rodado en el banco	-0.08	0.32	-0.16	0.19	0.19	-0.24
% de adoquín en el banco	-0.34	0.13	-0.03	-0.08	-0.23	0.10
% de roca grande en el banco	-0.27	-0.15	0.17	-0.34	-0.22	-0.02
% de arena en el arroyo	0.33	0.03	0.25	-0.01	-0.20	0.14
% de grava en el arroyo	-0.05	0.22	-0.15	-0.27	0.19	-0.33
% de canto rodado en el arroyo	-0.26	0.13	-0.22	-0.01	0.23	-0.17
% de roca grande en el arroyo	-0.36	-0.16	0.14	0.03	-0.12	0.16

Anexo J. Resultados del modelo de regresión lineal generalizado para las variables ambientales con siete variables ambientales eliminadas por correlación con variables antropogénicas. * indica valor significativo.

Variable dependiente: rana	Estimado	Error estándar	Valor de Z	valor de P
(Intercepto)	-0.05285	0.29017	-0.182	0.85548
PC1	-0.21706	0.13281	-1.634	0.10218
PC2	0.31907	0.18338	1.74	0.08187
PC3	-0.05752	0.20267	-0.284	0.77656
PC4	-0.29314	0.23295	-1.258	0.20825
PC5	-0.91393	0.31282	-2.922	0.00348
PC6	0.21771	0.25822	0.843	0.39917

Anexo K. Obtención del índice de amenazas 2, para el total de los sitios visitados. Se excluyen aquellos sitios que carecían de hábitat. Se incluyen los datos originales para cada variable y los datos ajustados a la escala utilizada: porcentaje de área natural (% A.N.), distancia al poblado (D.P.), ganadería (Gan), y número de especies exóticas (Exo). El número de localidad corresponde al Anexo B.

No.	Localidad	Valores originales				Valores ajustados				Índice
		%AN	DP	Gan	Exo	%AN	DP	Gan	Exo	
1	Valor mínimo del índice									
1	Rancho Las dos Cumbres, arroyo Tecate ^H	58	0.7	2	1	0	0	-3	-10	-3.93
2	Cañada Panda, 17 km SE Tecate	98	6.4	2	2	0	2	-2	-2.5	0.62
3	Nejil	21	6.4	3	0	2.1	2	-3	0	0.55
4	El Gato, Cañón Las Parras	64	9.6	2	1	6.4	2	-2	-5	0.26
5	Cañón El Alamo, arroyo Las Palmas	100	8.6	1	0	10	2	-1	0	3.28
6	Represo en Rancho El Compadre	65	13.6	2	1	6.5	3	-2	-2.5	1.23
7	Rancho Talegas, arroyo Las Calabazas	98	15.3	1	1	9.8	4	-1	-2.5	2.65
8	Rancho Los Aguajitos, Sierra Juárez	100	20	2	1	10	4	-2	-2.5	2.49
9	Rancho San Faustino, Sierra Juárez	95	30	2	1	9.5	6	-2	-5	1.76
10	El Morro, Cañada El Morro	30	0.1	0	1	3	0	0	-2.5	0.16
11	Rancho San Juan de Dios, La Calabaza	100	21	1	0	10	5	-1	0	3.65
12	Cañón Agua Caliente, arroyo Guadalupe	82	11.3	1	3	8.2	3	-1	-7.5	0.38
13	La Misión, arroyo Guadalupe	5	0.1	1	5	0.5	0	-1	-10	-3.31
14	Rancho la Casa Verde, Sierra Juárez	100	26	1	0	10	6	-1	0	3.78
15	Arroyo El Barbón, Real del Castillo	90	14	2	2	9	3	-2	-7.5	0.41
16	Cañada Salsipuedes, arroyo Salsipuedes	100	9	0	0	10	2	0	0	3.50
17	Cañada Miracielo, arroyo San Antonio	83	6.8	1	2	8.3	2	-1	-7.5	0.29
18	Arroyo San Carlos ^H	10	2.3	0	4	1	1	0	-10	-2.80
19	Arroyo El Zorrillo, Ejido Uruapan	10	1.5	2	1	1	1	-2	-5	-1.63
21	Rancho Agua Caliente, arroyo Santo Tomas ^H	95	19	1	1	9.5	4	-1	-5	1.74
22	Rancho Agua Caliente, arroyo San	90	14	1	1	9	3	-1	-5	1.45

	Vicente ^H									
24	Arroyo San Rafael, 23 km E Colonet ^H	95	12	2	0	9.5	3	-2	0	3.01
25	Arroyo San Rafael, 32 km E Colonet	100	20	2	0	10	4	-2	0	3.30
26	West of Mikes sky Ranch, SSPM	100	31	0	1	10	7	0	-5	2.50
27	Rancho Mike Sky, arroyo San Rafael ^H	98	31.7	1	1	9.8	7	-1	-5	2.21
28	Rancho Garret, SSPM ^H	100	37	0	1	10	8	0	-5	2.63
29	Rancho Meling, arroyo San José ^H	90	40	2	0	9	8	-2	0	3.48
30	Rancho El Molino, arroyo San José ^H	100	35	1	0	10	8	-1	0	4.03
31	La Jolla ^H	100	44	1	0	10	9	-1	0	4.15
32	Rancho El Potrero, cuenca Santo Domingo ^H	98	37	1	1	9.8	8	-1	0	3.96
33	Rancho Viejo SSPM ^H	65	42.5	3	1	6.5	9	-3	-5	0.94
35	La Grulla, SSPM ^H	50	52	3	1	5	10	-3	0	2.20
36	La Vibora, SSPM ^H	100	47	0	1	10	10	0	-5	2.88
37	Arroyo Valladares, SSPM ^H	90	30	1	0	9	6	-1	0	3.45
38	Sur de Valladares, SSPM ^H	100	26	1	0	10	6	-1	0	3.78
39	Arroyo San Antonio Murillos, SSPM ^H	100	36	1	0	10	8	-1	0	4.03
43	Arroyo Santo Domingo, cerca de La Canastilla	100	14	0	1	10	3	-1	-5	1.78
34	La Encantada, SSPM ^H	50	43	3	0	5	9	-3	0	2.08
44	San Ysidoro	100	42	1	0	10	9	-1	0	4.15
	Valor máximo del índice					10	10	0	0	4.50

Anexo L. Sitios muestreados para *B. dendrobatidis*. Se indica el número de individuos muestreados, la prevalencia, la media del valor zoonótico equivalente (ZE) y la elevación del sitio.

No.	Localidad	N	Prevalencia (%)	ZE	Elevación (m)
1	Abelardo L. Rodríguez Dam, Tijuana	1	0	0	118
2	El Carrizo Dam, Tijuana	1	100	925.2	272
3	Rancho las dos Cumbres, Tecate	2	0	0	620
4	Rancho Ciénega Redonda, Tecate	9	100	-	750
5	Cañón El Alamo, Reserva Kumiyay	6	17	1.5	488
6	El Gato, Cañón Las Parras, Ejido Guadalajara	1	100	3150.7	855
7	Rancho Talegas Arroyo las Calabazas	2	0	0	1,187
8	Rancho San Faustino, Sierra Juárez	4	50	87.8	1,270
9	Cañada El Morro, Rosarito	9	0	0	5
10	La Misión, Arroyo Guadalupe	10	20	1207	1
11	Cañada Salsipuedes	6	50	114.9	125
12	Rancho Madrigal, Ensenada	1	100	6.1	300
13	Cañada Miracielo, San Antonio de las Minas	5	20	0.3	358
14	Cañón Agua Caliente, Valle de Guadalupe	6	17	32.8	390
15	Arroyo El Barbon, Cañón Hondo	2	0	0	625
16	Rancho la Casa Verde, Arroyo Casa Verde	3	0	0	1,370
17	Arroyo San Carlos, Ensenada	5	80	310.1	70
18	Rancho Agua Caliente, Arroyo Santo Tomas	1	0	0	495
19	Arroyo San Vicente	9	0	0	218
20	Arroyo San Rafael, La Palmita	20	30	545.9	220
21	Arroyo San Rafael (35 km E of Colonet)	2	50	0.9	340

22	Arroyo San Rafael, 3 km NW of Mike's Sky Ranch	6	33	8.9	1,036
23	Rancho Meiling	9	89	236.2	620
24	Rancho El Molino	4	25	-	555
25	Santo Domingo, near Rancho La Canastilla	6	33	0.01	145
26	6 km downstream of Rancho Valladares	5	40	88.4	635
27	Rancho Valladares	11	82	135.2	720
28	Rancho El Potrero, Sierra San Pedro Mártir	7	57	5.1	890
29	Cañón La Jolla, Sierra San Pedro Mártir	3	100	1369.9	1,560
30	Arroyo San Antonio Murillos	11	127	93.4	560
31	Rancho San Isidoro, Sierra San Pedro Mártir	4	100	2453	920
32	Arroyo La Vibora, Sierra San Pedro Mártir	5	60	1658.8	1,880
33	La Grulla, Sierra San Pedro Mártir	24	92	360.5	2,070

Anexo M. Diversidad genética para las poblaciones de *Rana draytonii* a lo largo de su distribución. Obtenido de Richmond et al. 2013, 2014. N: número de muestras, Lp: Locus polimórfico, A: Riqueza alélica, Ar: riqueza alélica por rarefacción, Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada, Gis: Índice de endogamia.

	Poblaciones		N	Lp	A	Ar	Ho	He	Gis
Sierra Nevada	Hughes Place	10	10	2.14	1.87	0.299	0.286	-0.044	
	Sailor Flat	17	9	1.79	1.55	0.232	0.21	-0.104	
	Big Gun Diggings	18	12	2.86	2.28	0.417	0.439	0.049	
	Bear Creek	24	14	3	2.32	0.414	0.458	0.098*	
	Spivey Pond	4	12	2.29	2.29	0.482	0.455	-0.059	
San Francisco	Mori Point	10	15	3.29	2.43	0.49	0.51	0.049	
	Miliagra Ridge	10	15	2.71	2.16	0.48	0.46	-0.046	
	Rodeo Lake	5	13	2.43	2.24	0.51	0.48	-0.075	
	P84	5	13	3	2.49	0.45	0.52	0.137*	
	P72	5	13	3.71	3.04	0.64	0.66	0.022	
	Cuyamaca River	13	13	2.8	2.23	0.404	0.43	0.059	
	Orcutt Creek	15	15	4.33	3.23	0.62	0.631	0.018	
Sur de California	Santa Maria	9	14	3.73	2.8	0.43	0.524	0.18*	
	San Antonio Ck	14	15	4.07	3.16	0.634	0.619	-0.025	
	Manzana Creek	4	15	2.67	2.67	0.6	0.553	-0.085	
	West Santa Ynes Mnt	35	15	5.21	3.48	0.664	0.669	0.008	
	Central Santa Ynes Mnt	16	15	3.87	3.01	0.623	0.598	-0.042	
	Tecolote Canyon	10	14	2.93	2.38	0.409	0.437	0.065	
	Tajigua	20	15	3.27	2.71	0.589	0.521	-0.131*	
	Santa Ynez River	13	15	4.2	2.93	0.55	0.553	0.005	
	Matija Creek	13	15	3	2.43	0.487	0.481	-0.014	
	Ventura River	7	12	2.4	2.15	0.333	0.391	0.148	
Sur de California aisladas	San Francisquito	31	15	3.2	3.33	0.608	0.569	-0.068*	
	Aliso Canyon	35	13	2.69	2.8	0.363	0.384	0.054*	
	East of Las Virgenes	19	15	2.19	2.2	0.304	0.331	-0.07	
Baja California	San Rafael	19	8	2.09	2.09	0.34	0.306	-0.109	
	San Telmo	19	4	1.55	1.55	0.144	0.154	0.067	
	Santo Domingo	47	8	2.64	2.38	0.263	0.286	0.082*	
	La Grulla	25	2	1.18	1.18	0.071	0.084	0.156*	