



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO

**Salamandras del Eje Volcánico Transversal de México: el
microbioma en un contexto filogenético**

Tesis que presenta

I.B.Q. Julio César García Sánchez

Para Obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

En la Especialidad de

Biología de Plantas

Director de la Tesis: Sean M. Rovito

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sobre todo a la vida, que aunque en ciertas ocasiones se comporte como una “perra” en general es maravillosa.

Gracias Madre mía por enseñarme de la vida y por todo ese amor que siempre me has dado, que sin importar lo lejos que este de tu regazo siempre has logrado calentar mi espíritu. Te quiero mucho. Gracias a ti y a la “chiquilla” me he convertido en el tipo de persona que soy hoy en día.

Muchas gracias “chiquilla” simplemente te quiero con todo mí ser, he sido muy afortunado de tener una hermana como tú. Siempre he podido mostrar mi verdadero ser ante ti.

Gracias carnal por todo lo que me has enseñado y esa forma tan tuya que tienes de proteger a los que amas, aún nos quedan muchas experiencias por vivir como hermanos.

Gracias Eliza, por todo ese amor, cariño y suspiros. Simplemente haces que mi vida sea más feliz.

Gracias a todos mis amigos con los que viví más de una aventura salvando a “GAIA”. Me han enseñado el significado de la amistad verdadera. Y pronto sabrán en verdad que es lo que hace un Bioquímico jaja.

Gracias a los gorditos VIP es grandioso contar con su amistad.

Gracias a mis camaradas de lab, que han demostrado ser buenos amigos y siempre me he sentido muy alegre con todos ustedes.

Gracias Sean, por permitirme ser parte del laboratorio a pesar que confundía a los reptiles con las salamandras.

Y para todas esas personas a las cuales quiero y han sido de influencia positiva para mí, solo puedo decirles que hay que seguir soñando.

“Creo que soñamos, así que no tenemos que estar separados durante tanto tiempo. Si estamos en los sueños de los demás, podemos estar juntos todo el tiempo.” A.A. Milne, Winnie-the-Pooh

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Genómica y Biodiversidad de Vertebrados en la Unidad de Genómica Avanzada del CINVESTAV Irapuato. Bajo la dirección del Dr. Sean M. Rovito y con la asesoría de los doctores Francisco Barona Gómez y Agustino Martínez Antonio. Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de estudios de maestría numero 396120 otorgada durante el periodo comprendido de Septiembre del 2014 a Agosto del 2016.

Índice general

Índice general.....	V
Índice de figuras.....	VII
Índice de tablas.....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1 El microbioma.....	3
1.1.1 Funciones del microbioma.....	3
1.1.2 Factores que determinan la composición del microbioma.....	4
1.2 El microbioma en organismos no modelo.....	6
1.2.1 Los pletodóntidos.....	7
1.3 Salamandras pletodóntidas del Eje Volcánico Transversal de México como modelo de estudio del microbioma.....	8
1.4 Métodos para el estudio del microbioma.....	10
1.4.1 Medios de cultivo y métodos independientes del cultivo.....	10
1.4.2 Herramientas bioinformáticas para el análisis del microbioma.....	11
1.4.3 Índices de diversidad.....	12
2. HIPOTESIS.....	14
3. OBJETIVOS.....	14
3.1 Objetivo general.....	14
3.1.1 Objetivos específicos.....	14
4. MATERIALES Y METODOS.....	15
4.1 Toma de muestra.....	15
4.2 Extracción de ADN.....	15
4.3 Amplificación del gen ribosomal 16S y preparación de librerías.....	16
4.4 Análisis de secuencias.....	18
4.5 Elaboración de matrices de distancia y pruebas de Mantel parcial.....	21
4.5.1 Matriz climatológica.....	21
4.5.2 Matriz geográfica.....	22
4.5.3 Matriz de distancia genética.....	22
4.5.4 Matriz de diversidad beta del microbioma.....	23
5. RESULTADOS.....	25

5.1 Colecta y amplificación de muestras de microbioma.....	25
5.2 Análisis de secuencias	25
5.3 Diversidad taxonómica	26
5.4 Pruebas de Mantel parcial.....	33
6. DISCUSIÓN	35
7. CONCLUSIONES	42
8. BIBLIOGRAFIA.....	43
9. ANEXOS	51

Índice de figuras

Figura 1. Árbol de especies a partir de análisis de BEAST de loci nucleares y mitocondriales.....	9
Figura 2. Mapa de las 12 localidades muestreadas en tres estados de los Estados Unidos Mexicanos	16
Figura 3. Etiquetado combinatorio y estrategia de combinación empleada en este trabajo para la preparación y secuenciación de librerías de Illumina	22
Figura 4. Curvas de rarefacción de OTUs observados a una profundidad de 7,500 secuencias por muestra.....	27
Figura 5. Abundancia relativa taxonómica de las bacterias asociadas a la piel de salamandras a nivel de clase.	30
Figura 6. Abundancia relativa taxonómica de las bacterias asociadas a la piel de salamandras a nivel de familia.	31
Figura 7. Curvas de rarefacción del estimador Chao1 a una profundidad de 7,500 secuencias por muestra.....	32
Figura 8. Curvas de rarefacción de la diversidad filogenética de Faith a una profundidad de 7,500 secuencias por muestra.....	32
Figura 9. Escalamiento multidimensional no métrico (Non-metric multidimensional scaling, NMDS por sus siglas en inglés) de la distancia UniFrac unweighted de las comunidades bacterianas de la piel de salamandras.....	33

Índice de tablas

Tabla 1. Datos generales de las localidades muestreadas.	18
Tabla 2. Secuencia de nucleótidos de los oligos utilizados para la amplificación del gen 16S.	20
Tabla 3. Especies y localidades de muestreo de los 25 individuos utilizados para generar la matriz de distancia genética.	24
Tabla 4. Numero de muestras amplificadas por especie, y utilizadas en los análisis de diversidad alfa y beta, después de una rarefacción a 7,500 secuencias por muestras.....	26
Tabla 5. Abundancia relativa de bacterias en la piel de las salamandras a nivel de clase	28
Tabla 6. Pruebas de Mantel parcial entre las cinco matrices de distancia (md) realizadas en este trabajo	34

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
Bd	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>
Ecodist	Dissimilarity-based functions for ecological analysis
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético (por sus siglas en ingles)
EVTM	Eje Volcánico Transversal de México
NGS	Secuenciación de nueva generación (por sus siglas en ingles)
NMDS	Escalamiento multidimensional no métrico (por sus siglas en ingles)
OTUs	Unidad operacional taxonómica (por sus siglas en ingles)
pb	Pares de bases
PC	Componente principal (por sus siglas en ingles)
PCA	Análisis de componentes principales (por sus siglas en ingles)
PCoA	Análisis de coordenadas principales (por sus siglas en ingles)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en ingles)
PD	Diversidad filogenética (por sus siglas en ingles)
PEAR	Paired-End reAd mergeR
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology
RDP	Ribosomal Data Project
TAE	Tris base, Acetato y EDTA
TE	Tris base y EDTA
WATERS	Workflow for the Alignment, Taxonomy and Ecology of Ribosomal Sequences

RESUMEN

Salamandras del Eje Volcánico Transversal de México: el microbioma en un contexto filogenético

El estudio de los microbiomas ha florecido en los últimos años, esto debido en parte a la amplia gama de funciones que el microbioma desarrolla en los organismos hospedadores. En anfibios, se conoce poco sobre el microbioma de la piel. Sin embargo, se ha demostrado que las bacterias de la piel de los anfibios desempeñan un papel importante en la protección contra patógenos fúngicos. A pesar de los grandes avances tecnológicos, utilizando la secuenciación de amplicones para la caracterización del microbioma, aún no queda claro cuáles son los factores que determinan la composición del microbioma. La composición del microbioma puede estar influenciada por factores ambientales, espaciales, el estado de desarrollo del hospedador y factores específicos de la especie, pero los papeles relativos de cada uno de estos factores en determinar la composición del microbioma no son bien entendidos. Por lo tanto, en este trabajo utilizamos comparaciones filogenéticas controladas de especies de plelodóntidos estrechamente relacionadas, con el fin de determinar el papel que la historia filogenética, el ambiente y el espacio geográfico desempeñan en la conformación del microbioma. Utilizamos la secuenciación de amplicones de 16S, para comparar el microbioma bacteriano de la piel de cinco especies microendémicas del género *Pseudoeurycea* del Eje Volcánico Transversal de México y una especie de amplia distribución del mismo género (*P. leprosa*), la cual se encuentra en microsimpatria con las especies microendémicas. Al comparar la composición del microbioma de estas especies de salamandras en un contexto filogenético y espacial, podremos inferir que factores tienen mayor influencia en la composición del microbioma. En este trabajo se encontró entre otras cosas, que la distancia filogenética entre hospedadores tiene una implicación en la composición del microbioma, incluso después de tomar en cuenta la distancia geográfica entre los sitios de colecta. Estos resultados tienen una importante implicación en el entendimiento de las interacciones entre hospedador, microbioma y ambiente, especialmente en el contexto del declive mundial de anfibios, ocasionado por las enfermedades fúngicas.

ABSTRACT

Salamanders of the Trans-Mexican Volcanic Belt: the microbiome in a phylogenetic context

The study of microbiomes has flourished in the recent years, in part due to the wide range of functions that the microbiome performs in host organisms. In amphibians, little is known about the skin microbiome, yet skin bacteria have already been shown to play a role in protection against fungal pathogens. Despite the major technological advances in characterizing microbiomes using amplicon sequencing, it is still not clear which factors determine microbiome species composition and diversity. Microbiome composition may be influenced by development stage, environmental, spatial, and species-specific factors, but the relative roles of each in shaping the microbiome are not well understood. Therefore, we used phylogenetically controlled comparisons of closely related plethodontid species in order to determine the role that phylogenetic history, environment, and geographic space play in shaping the microbiome. We used amplicon sequencing to compare bacterial skin microbiomes of five closely related, microendemic species of *Pseudoeurycea* in the Trans-Mexican Volcanic Belt and one widespread species of the same genus (*P. leprosa*) that occurs in sympatry with the microendemic species. By comparing the composition of the microbiome of these species of salamanders in a phylogenetic and spatial context, we can infer which factors have the strongest influence on microbiome composition. We found that phylogenetic relatedness of the host has an effect on the differences in the composition of the microbiome, even after taking into account the geographical distance between the collection sites. These results have important implications for our understanding of interactions between host, microbiome, and environment, especially in the context of worldwide amphibian declines due to fungal disease.

1. ANTECEDENTES

1.1 El microbioma

En años recientes, se ha descubierto que tanto los humanos como muchos otros organismos a nuestro alrededor somos criaturas simbióticas, las cuales albergamos un gran número de microorganismos, ya sea en nuestro interior o exterior. El término microbioma fue originalmente acuñado por Joshua Lederberg (Lederberg, 2001), como “la comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que literalmente comparten un espacio en nuestro cuerpo”. Estos microorganismos pueden ser bacterias, hongos, arqueas, o cualquier organismo microscópico, sin embargo las bacterias son el componente del microbioma más estudiado a la fecha. Por supuesto que esta definición puede quedarse corta, ya que solo hace mención a la presencia y no al papel funcional de estos microorganismos. Por lo que generalmente al definir el microbioma, también se hace referencia al conjunto de genomas de estos microorganismos (parte funcional). Históricamente, la microscopía, química analítica, y técnicas de cultivo han sido herramientas esenciales para el estudio de los microbiomas, pero recientes innovaciones nos han impulsado a una edad de oro para el estudio de los microbiomas (Russell *et al.*, 2014). Una de estas innovaciones que ha revolucionado el estudio de los microbiomas, son las tecnologías de secuenciación de nueva generación. Estas tecnologías nos permiten estudiar el microbioma con métodos independientes de cultivo al analizar el ADN extraído directamente de una muestra en lugar de a partir de microbios cultivados de forma individual, permitiéndonos investigar varios aspectos del microbioma, como lo es la diversidad taxonómica y la función de estas comunidades microbianas.

1.1.1 Funciones del microbioma

Todos los animales somos hospedadores de microorganismos simbióticos; como resultado de estas asociaciones ancestrales, los animales dependen de los microorganismos para desarrollar en ellos muchas de las funciones críticas para la vida. Estas funciones pueden dividirse en tres grandes grupos: tróficas, metabólicas y de protección (Guarner & Malagelada, 2003). Las funciones tróficas incluyen el control de la proliferación, diferenciación de las células epiteliales y la maduración del sistema inmune. Las funciones metabólicas incluyen el procesamiento de los

compuestos no digeribles por el hospedador, como pueden ser algunos polisacáridos de las plantas, obtención de energía de los alimentos ingeridos (Janson *et al.*, 2008) y la producción de algunas vitaminas, como lo son: la vitamina K y B12 (LeBlanc *et al.*, 2011). En cuanto a la protección, la superficie del cuerpo de los animales, tanto en el interior como exterior, está cubierta de microorganismos. Por lo que con el fin de colonizar el cuerpo de los animales, los microorganismos exógenos (incluyendo patógenos) deben competir por un espacio y recursos con los microorganismos ya hospedados (Oliver *et al.*, 2014). Así entonces, la composición del microbioma puede brindar defensa ante distintas enfermedades y patógenos. Si la composición del microbioma se perturba, puede ser la causa de enfermedades como se observa en el caso de *Helicobacter pylori*. Esta bacteria es un residente común de la mucosa gástrica del estómago humano y en condiciones normales (individuos sanos) se ha visto que es benéfica (Blaser *et al.*, 2008). Sin embargo, cuando se ve afectada la composición del microbioma, *H. pylori* puede colonizar más del 90 % del estómago, causando distintas enfermedades (Kusters *et al.*, 2006).

En el caso particular de los anfibios, se ha reportado la enfermedad quitridiomycosis (Longcore *et al.*, 1999), causada por el hongo del filum Chytridiomycota, *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), que ha diezclado en gran medida a varias poblaciones de anfibios en el mundo (Skerratt *et al.*, 2007). Este hongo patógeno solo infecta a los anfibios, particularmente su piel, causándoles una hiperqueratosis, hiperplasia epidérmica, úlceras, y un cambio en la regulación osmótica que a menudo conduce a un paro cardíaco (Voyles *et al.*, 2009). Curiosamente, algunas especies de anfibios son capaces de coexistir con el Bd, mientras que otras sucumben a la enfermedad (Davidson *et al.*, 2003; Hanselmann *et al.*, 2004). Esto puede deberse a que existen diferentes microorganismos, como la bacteria *Janthinobacterium lividum*, que son capaces de inhibir el crecimiento del Bd (Harris *et al.*, 2009), lo que les confiere a los individuos portadores de estas bacterias, una protección contra el patógeno fúngico Bd.

1.1.2 Factores que determinan la composición del microbioma

Ya que las funciones que desarrolla el microbioma son de gran importancia para los animales, se ha incrementado el interés por su estudio, siendo los factores que influyen en la composición del microbioma uno de los tópicos de mayor interés. Por ejemplo, Costello *et al.* (2009) estudiaron la composición del microbioma de 18 partes del cuerpo (piel, intestino, cavidad oral y respiratoria,

etc.) en 9 personas adultas sanas mediante la secuenciación del gen 16S bacteriano. En este estudio se encontró que la composición del microbioma fue determinada primordialmente por la parte del cuerpo que fue muestreada.

En cuanto a trabajos realizados en anfibios, Kueneman *et al.* (2014) realizaron un estudio para saber si el estado de desarrollo de los anfibios afectaba la composición del microbioma del hospedador. Por ello, estudiaron la composición del microbioma de la piel de la rana acuática *Rana cascadae* en diferentes estados de desarrollo: renacuajos, sub-adultos y adultos. Esta especie habita en los prados húmedos de montaña, lagos y arroyos, se reproduce en estanques tranquilos y por lo general deposita sus huevos en aguas poco profundas (Briggs, 1987). En este estudio tomaron las muestras de microbioma de individuos del mismo estanque (en la región Klamath de California), para así homogenizar el efecto del ambiente sobre la composición del microbioma. Al determinar las comunidades bacterianas que estaban asociadas a la piel de estos anfibios, mediante la secuenciación del gen 16S bacteriano, efectivamente observaron que la composición del microbioma en anfibios varía según la etapa de desarrollo del hospedador (Kueneman *et al.*, 2014).

Se ha visto en diferentes trabajos, que el hospedero tiene un fuerte efecto en la composición del microbioma, inclusive mayor que el efecto que podría tener el ambiente (Erwin *et al.*, 2012; Easson & Thacker 2014). Un ejemplo de esto, en la piel de los anfibios, se puede apreciar en el trabajo desarrollado por McKenzie *et al.* (2012). En este trabajo, se comparó la composición del microbioma de la piel de tres especies de anfibios: dos ranas de distintas familias, *Rana pipiens* (Ranidae) y *Pseudacris triseriata* (Hylidae) y un ajolote, *Ambystoma tigrinum* (Ambystomatidae) mediante la secuenciación del gen 16S bacteriano. Las especies de anfibios se tomaron de 4 estanques diferentes, en los cuales cohabitan, esto con el propósito de saber si el ambiente tenía un efecto sobre la composición del microbioma de la piel del anfibio. Al comparar la composición del microbioma entre los individuos tomados de diferentes localidades, se observó que la especie del hospedador fue un factor altamente determinante de la composición de la comunidad bacteriana. Mientras que el estanque no fue un predictor significativo de la comunidad bacteriana, aunque existe una variación entre los sitios dentro de las especies. En los trabajos de Kueneman (2014) y McKenzie (2012) incluyeron muestras de agua y suelo, ellos observaron que las comunidades bacterianas asociadas a la piel de los anfibios son muy

diferentes a la del ambiente (agua y suelo) en donde se encontraba el anfibio. Siguiendo con esta temática, (Fitzpatrick & Allison, 2014), evaluaron la especificidad de bacterias asociadas a la piel de la salamandra terrestre *Plethodon jordani*, en comparación con las superficies en sus entornos inmediatos (troncos y piedras) usando secuencias del gen 16S bacteriano. Encontraron que las bacterias asociadas al hospedador y las de vida libre eran significativamente diferentes. Sin embargo, la abundancia relativa estaba fuertemente relacionada; los taxones más abundantes en la piel de salamandra también eran los más abundantes sobre los troncos y piedras húmedos del suelo del bosque. Por lo tanto, aunque las comunidades bacterianas en la piel de las salamandras son estadísticamente diferentes de las de superficies inanimadas, no son enteramente distintas. Además, encontraron pocas especies específicas a las salamandras y en baja abundancia relativa.

Así mismo trabajos realizados con diversos anfibios acuáticos han demostrado que el hospedero tiene un mayor impacto sobre la composición del microbioma que el ambiente (Kueneman *et al.*, 2014; Walke *et al.*, 2014). Es de nuestro conocimiento, que algunos de los factores que están influenciando la composición del microbioma del hospedador son: el sitio de toma de muestra, el ambiente al que esté sometido y factores específicos del hospedador. Sin embargo, aún no se conoce cuál es el efecto relativo de estos factores sobre la composición del microbioma del hospedador.

1.2 El microbioma en organismos no modelo

Aunque en un principio la mayoría de los estudios del microbioma bacteriano se han enfocado en humanos, en específico en el tracto digestivo, recientemente se han utilizado otros modelos de estudio, siendo la piel de los anfibios uno de los más destacados. Este órgano tiene una capa mucosa rica en glicoproteínas y alberga muchos simbioses microbianos y patógenos (Austin, 2000). Además, es un órgano muy dinámico, el cual conlleva funciones de gran importancia como son la: osmoregulación, defensa y comunicación química. Así entonces, la piel de los anfibios es uno de los sistemas que más se han usado para el estudio de las comunidades microbianas asociadas a la piel. Gran parte de esta investigación se ha basado en la interacción del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* con la piel de los anfibios (Bletz *et al.*, 2013). En el caso particular de los pletoodontidos, el estudio del microbioma de la piel se torna un poco más interesante, ya que es la piel por donde respiran (Duellman, 1994; Campbell *et al.*, 2012).

1.2.1 Los pletodóntidos

Los pletodóntidos (familia Plethodontidae) son una de las diez familias de salamandras. Las especies de esta familia están ampliamente distribuidas en el este y el oeste de América del Norte y América Central, con poblaciones también en América del Sur, el sur de Europa, y Corea. Plethodontidae es por mucho la familia de salamandras más rica en especies, con 451 especies reconocidas de las 687 especies de salamandras (www.amphibiaweb.org). La mayoría de sus miembros se caracterizan por una supresión completa de la fase larvaria acuática, ya que las crías eclosionan de los huevos como adultos miniatura (Wake, 1996).

Las salamandras de esta familia son apulmonadas, por lo que todos los adultos de las especies terrestres de la familia Plethodontidae respiran por su piel y para lograr la respiración deben permanecer húmedas (Petranka, 1998). Es por ello que al realizar actividades en la superficie, donde la mayoría de la alimentación y apareamiento ocurre (Houck & Verrell, 1993; Tilley & Bernardo, 1993), requieren de una alta humedad relativa por lo que suelen estar en contacto con una superficie húmeda (hojarasca, troncos, tierra, debajo de piedras húmedas, etc.) Incluso cuando existen condiciones de alta humedad en la superficie, estas salamandras están en una situación de deshidratación por lo que deben volver a sus refugios subterráneos para la hidratación completa (Anthony *et al.*, 1997).

Los pletodóntidos tropicales pertenecen a la tribu Bolitoglossini (Wake, 2012), que se distribuyen sólo en Mesoamérica (México y Centroamérica) y Sudamérica. La radiación adaptativa de estos pletodóntidos tropicales ha dado lugar a que ocupen hábitats arborícolas (Wake, 1987) y fosoriales, (Wake, 1966, 1976), e incluso incluyen una especie acuática (Wake, 2001). Las especies de la tribu Bolitoglossini poseen una gran disparidad en cuanto a su tamaño, y existen tanto gigantes (hasta 161 mm longitud hocico-cloaca; Taylor & Smith, 1945) como miniatura (hasta 19 mm LHC; Rovito *et al.*, 2013), relativamente hablando. La mayoría de las especies de Bolitoglossini depositan sus huevos en entornos terrestres pero muchas especies depositan sus huevos en bromelias u otras epifitas arbóreas. Todos los Bolitoglossini comparten un sistema alimenticio especializado (lengua retráctil).

1.3 Salamandras pletodóntidas del Eje Volcánico Transversal de México como modelo de estudio del microbioma

El Eje Volcánico Transversal de México (EVTM) es una región geológica compleja, con un alto grado de complejidad topográfica debido a su actividad volcánica, el cual data desde mediados del Mioceno al presente. Esta cadena de volcanes atraviesa los estados de Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guanajuato, Querétaro, México, Hidalgo, Morelos, Tlaxcala, Puebla y Veracruz (Gómez-Tuena *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2012). Estudios filogenéticos (Bryson *et al.*, 2011) y filogeográficos (Bryson & Riddle, 2012; Parra-Olea *et al.*, 2012) muestran que la formación del EVTM se correlaciona con la diversificación y especiación de varios linajes de animales, entre ellos las salamandras.

El EVTM resulta de interés para el estudio de la composición del microbioma de los animales, ya que allí se encuentran una gran variedad de especies animales. Esto incluye algunas especies de salamandras pletodóntidas del género *Pseudoeurycea*, como lo son: *P. altamontana*, *P. longicauda* y *P. robertsi*, las cuales se ubican en el centro del EVTM (Estado de México), y *P. gadovii* y *P. melanomolga* que se ubican al este (Puebla, Tlaxcala y Veracruz). Estas salamandras son microendémicas y tienen una estrecha relación filogenética entre sí, como se muestra en la **Figura 1** modificada de (Rovito *et al.*, 2015). Además el EVTM cuenta con una especie de salamandra del mismo género (*P. leprosa*), la cual es de amplia distribución, ocurre en microsimpatria con las especies microendémicas y está más distantemente relacionada a las especies microendémicas como se muestra en el árbol filogenético **Figura 1**. Por lo que al comparar la composición del microbioma de estas especies de salamandras en un contexto filogenético y espacial, podríamos inferir el papel que desempeñan la historia filogenética, el ambiente y el espacio geográfico en determinar la composición del microbioma.

1.4 Métodos para el estudio del microbioma

El estudio de los microbiomas puede dividirse en dos tipos, el microbioma taxonómico o el funcional, cada uno con un enfoque diferente. El microbioma taxonómico es aquel que estudia la estructura de la comunidad, que microorganismos están presentes y en qué cantidad. Por otro lado el microbioma funcional es aquel que estudia las actividades metabólicas y productos finales que resultan de la actividad microbiana (Nicholson *et al.*, 2012).

1.4.1 Medios de cultivo y métodos independientes del cultivo

Tradicionalmente los microorganismos se han estudiado mediante el uso de medios de cultivo. La gran ventaja con los cultivos es que los aislados pueden ser recuperados y estudiados por su capacidad para utilizar diferentes sustratos y otros parámetros fisiológicos. Esto es de suma importancia, ya que nos permite entender de una mejor manera la fisiología de los microorganismos y aplicar estos aislados en procesos biotecnológicos (Gao *et al.*, 2013). Sin embargo, las técnicas de cultivo tradicionales sufren de varios inconvenientes. Pueden llegar a ser muy demandantes en cuanto mano de obra y no muestran una imagen representativa de la composición del microbioma. Incluso en sistemas muy estudiados como lo es el intestino humano, solo una pequeña porción (aproximadamente el 20%) de los microorganismos pueden ser cultivados con los enfoques disponibles actualmente (Eckburg *et al.*, 2005). Mientras que en otros nichos ecológicos, como es el suelo, se estima que solo el 10% de las bacterias pueden ser cultivadas (Torsvik *et al.*, 1998).

El desarrollo de las técnicas moleculares nos ha permitido el no depender de los medios de cultivo para el estudio de los microorganismos. El método independiente de cultivo más común para el estudio del microbioma taxonómico recae en el análisis del gen ribosomal 16S. Este gen tiene una longitud de aproximadamente 1500 pares de base y está presente en todas las bacterias y arqueas (Morgan & Huttenhower 2012). Una característica importante del gen 16S es que contiene regiones conservadas al igual que nueve regiones hipervariables (V1–V9) (Chakravorty *et al.*, 2007). Las regiones conservadas tienen una baja tasa de sustitución nucleotídica, por lo que tienen una secuencia similar entre todas las especies de bacterias, mientras que las regiones hipervariables demuestran una diversidad de secuencias notable entre diferentes especies de

bacterias. Estas dos características, nos permiten diseñar primers que sean universales y que además, logren la identificación taxonómica entre organismos a nivel de familia en todos los filos de bacterias. Otras de las ventajas de utilizar el gen 16S en el estudio de los microbiomas, es que existen bases de datos dedicadas a este gen y que son de acceso público. Estas bases de datos son: “Ribosomal Database Project” (Cole *et al.*, 2009), SILVA (Quast *et al.*, 2013), Greengenes (DeSantis *et al.*, 2006) y EzTaxon-e (Kim *et al.*, 2012).

1.4.2 Herramientas bioinformáticas para el análisis del microbioma

En los últimos años los costos de secuenciación han decrecido de manera drástica. Es por ello que hoy en día es posible generar millones de secuencias por muestra, lo que nos permite evaluar las diferencias en las comunidades bacterianas de una mejor manera. Este aumento en el poder de secuenciación ha requerido el desarrollo de herramientas computacionales acordes que nos permitan manejar la creciente cantidad de datos de secuencias producidas por las tecnologías modernas (Kuczynski *et al.*, 2012). Existen varias técnicas bioinformáticas para el análisis del microbioma como lo es “mothur” (Schloss *et al.*, 2009), “WATERS” (Hartman *et al.*, 2010), “the RPD pyrosequencing tools” (Cole *et al.*, 2009) y “QIIME” (Caporaso *et al.*, 2010). En general, estos pipelines para el análisis de datos de secuencias de 16S tienen flujos de trabajo similares y permiten el análisis de las secuencias crudas obtenidas a partir de la secuenciación de alto rendimiento, lo que permite a los usuarios importar los datos de secuencia y producir medidas de diversidad de los microorganismos (Russell *et al.*, 2014). Algunos pasos iniciales son: la demultiplexación de secuencias (eliminación de códigos de barras y separación de las muestras combinadas), filtrado de calidad y la agrupación de las secuencias en unidades operacionales taxonómicas (operational taxonomic units, OTUs por su siglas en ingles). OTU es un término que significa la “cosa que está siendo estudiada” (Sokal & Sneath, 1963). Es una unidad de clasificación taxonómica de los objetos de estudio en base a característica que tienen en común, como puede ser la agrupación de secuencias de ADN las cuales tienen un porcentaje de identidad determinado según las necesidades del estudio. Una de las ventajas de QIIME sobre los otros pipelines es la habilidad de explotar los metadatos de las muestras, por ejemplo la información clínica de los individuos muestreados, para así producir visualizaciones en donde resalten los patrones de interés del set de datos analizados.

1.4.3 Índices de diversidad

La biodiversidad representa la variedad y heterogeneidad de organismos o rasgos en todos los niveles de la jerarquía de la vida, desde moléculas hasta ecosistemas (McGrath *et al.*, 1999). Típicamente, se enfoca en la diversidad de especies, pero otras formas de diversidad como la genética y química también son de importancia (Morris *et al.*, 2014). En general se cree que una alta diversidad, incluida la diversidad microbiana, es beneficiosa para un ecosistema, proveyéndole una resistencia superior a perturbaciones ecológicas (Bäckhed *et al.*, 2005). La diversidad típicamente se describe en términos de riqueza de especies y uniformidad. La riqueza refleja el número de especies en un sistema (diversidad alfa), pero no toma en cuenta su proporción relativa. La uniformidad revela la composición de la distribución de las especies en una comunidad al incluir su abundancia relativa. Existen diferentes índices para describir la diversidad. Uno de ellos es el índice Simpson, el cual es una medida cuantitativa que refleja cuantos tipos diferentes de especies existen en una muestra y simultáneamente toma en consideración que tan uniformemente las entidades básicas (como individuos) están distribuidas. (Legendre, 1998). La fórmula para el índice Simpson es:

$$D = \frac{\sum_{i=1}^S n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

Dónde:

S es el número de especies.

N es el total de organismos presentes (o unidades cuadradas).

n es el número de ejemplares por especie.

Otro índice usado para describir la diversidad es el índice Shannon (Shannon, 1948) el cual asume que todas las especies se representan en una muestra y que están muestreadas al azar. La fórmula para el índice Shannon es:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

Dónde:

S es el número de especies

p_i es la proporción de individuos de la especie, respecto al total de individuos: n_i/N

n_i es el número de individuos de la especie

N es el número de todos los individuos de todas las especies

En resumen, el estudio del microbioma se ha incrementado exponencialmente en los últimos años, gracias a las tecnologías de secuenciación de nueva generación y a las herramientas bioinformáticas que nos han permitido analizar los datos obtenidos. Hoy en día es de nuestro conocimiento que la composición del microbioma en los hospedadores se ve influenciada por diferentes factores, como lo son: el estadio de desarrollo, ambiente y factores específicos del hospedador (especie). Sin embargo, aún no se conoce cuál es el rol específico de cada uno de estos factores en la determinación de la composición del microbioma. Es por ello que se requieren trabajos que estudien la composición del microbioma en un contexto más definido, controlando los factores filogenéticos (especie), espaciales y ambientales a los que está sometido el hospedador. A la fecha no existen estudios acerca de la composición del microbioma de la piel de salamandras del EVTMM o de algún otro anfibio en México. Estos estudios son necesarios ya que la composición del microbioma puede proteger a los anfibios en contra de patógenos, como el *Batrachochytrium dendrobatidis*, pero es necesario un panorama inicial del microbioma de estos animales para generar estrategias que detengan el avance de estos patógenos.

2. HIPOTESIS

La composición del microbioma de cada especie de salamandra y la abundancia relativa de las especies bacterianas será más fuertemente controlada por diferencias en la historia evolutiva (filogenia), con un poco de influencia de la distancia espacial (geografía) y el ambiente (clima).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Caracterizar la composición microbiana de seis especies de salamandras en distintas localidades del Eje Volcánico Transversal Mexicano (EVTM), mediante el uso de secuenciación de nueva generación (NGS), para determinar cuáles factores tienen mayor influencia sobre la composición del microbioma.

3.1.1 Objetivos específicos

- 1.- Obtención de muestras de microbioma de seis especies de salamandras del EVT M
- 2.- Amplificación del gen 16S (región V3 V4) y preparación de librerías
- 3.- Análisis de datos obtenidos para la inferencia de los factores determinantes de la composición del microbioma.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Toma de muestra

La colecta y muestreo de individuos se llevó a cabo entre los meses de mayo y junio del año 2015. Se buscaron seis especies de salamandras del genero *Pseudoeurycea*: *P. longicauda*, *P. leprosa*, *P. altamontana*, *P. robertsi*, *P. melanomolga* y *P. gadovii*, las cuales son las especies de enfoque del presente trabajo. Adicionalmente, se colecto una especies más de salamandra, *Aquiloerycea cephalica*, la cual vive en microsimpatria con algunas de las especies de enfoque. Se muestreó en 12 localidades de 3 estados de los Estados Unidos Mexicanos: Veracruz, Puebla, y México (**Figura 2**). El punto de muestreo, el tamaño de muestra de cada especie de salamandra y las características del sitio se muestran en la **Tabla 1**.

La búsqueda de salamandras se realizó debajo de piedras, troncos y corteza de árboles. Los individuos fueron atrapados a mano utilizando guantes de nitrilo nuevos para cada espécimen y se depositaron en bolsas de plástico individuales hasta realizar la toma de muestra del microbioma de la piel. En el campo cada individuo fue lavado dos veces con 50 ml de agua estéril (100 ml de agua en total), esto con el propósito de eliminar partículas de suelo y bacterias que no estuvieran asociadas a la piel de las salamandras. Después del lavado, se hizo un frotis con hisopos de punta de rayón estériles (Medical Wire & Equipment MW113). El frotis se realizó en todo el cuerpo del anfibio durante 30 segundos; como control negativo, un hisopo estéril se agitó en el aire durante 30 segundos. Cada hisopo se depositó en un tubo criogénico estéril de 2 ml y se almacenó en nitrógeno líquido. Después de regresar del campo las muestras se almacenaron en un ultra congelador a -80°C hasta la extracción del ADN.

4.2 Extracción de ADN

El ADN bacteriano de cada hisopo fue extraído con el kit PowerSoil DNA Isolation (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA), en total se realizó la extracción de 85 muestras. El hisopo de cada muestra se depositó en un tubo “PowerBead” (provisto en el kit), el cual contiene perlas de granate de 0.7 mm y un buffer de lisis. El procedimiento se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante pero con cambios menores para muestras con bajas cantidades de

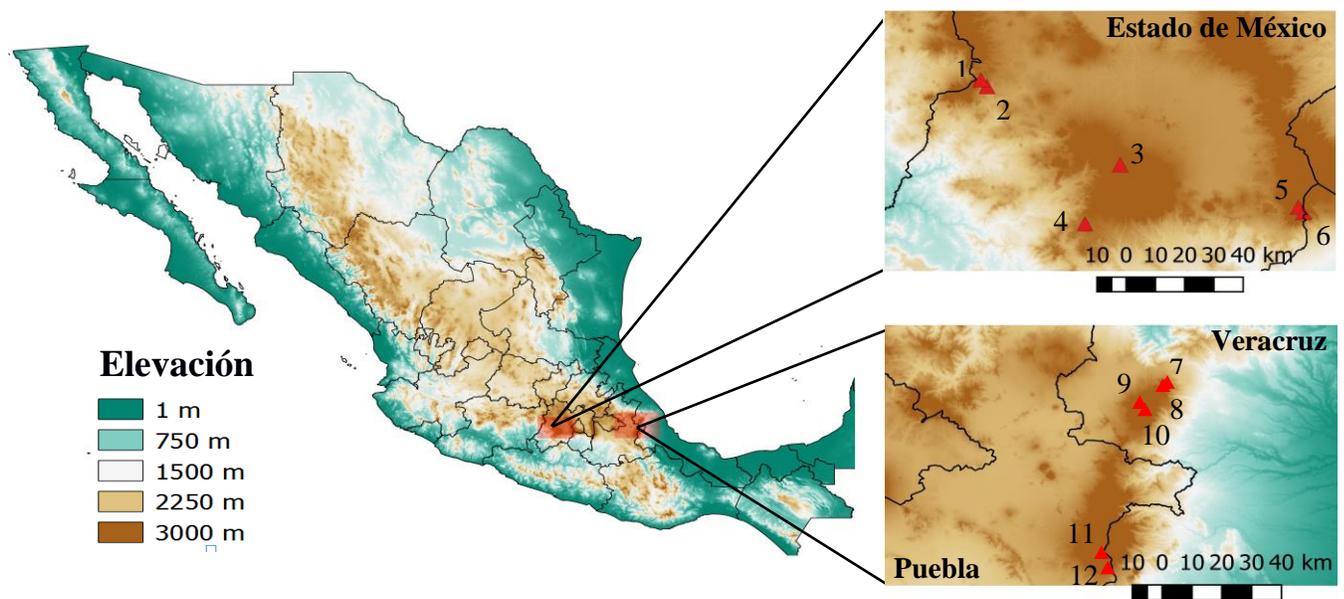


Figura 2. Mapa de las 12 localidades muestreadas en tres estados de los Estados Unidos Mexicanos: Veracruz, Puebla y Estado de México. Los números corresponden a los sitios descritos en la Tabla 1.

ADN, descrito en detalle en Fierrer *et al.* (2008) (ANEXOS). Los cambios al protocolo consistieron en: 1) incubar las muestras durante 10 minutos a 60°C después de la adición de la solución C1, 2) vórtex del tubo “PowerBead” en posición horizontal durante 2 minutos, y 3) permitir que la solución C6 se asiente en el filtro durante 5 minutos antes de la elución final. El ADN bacteriano obtenido se almacenó en un congelador a -20°C hasta su uso.

4.3 Amplificación del gen ribosomal 16S y preparación de librerías.

Una vez que contamos con las extracciones del ADN bacteriano, se amplificó la región V3–V4 del gen ribosomal 16S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Cada reacción de 25 µl contuvo 12.5 µl de 2x KAPPA HiFi HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems KK2602), 10 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de ADN genómico y 0.75 µl de cada oligo (0.3 µM de concentración final). Las condiciones de PCR consistieron en un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 3 minutos, seguido por 34 ciclos a 98°C por 20 segundos, 61°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Antes de llevar a cabo la amplificación de todas las extracciones de ADN bacteriano, se realizaron pruebas de PCR para encontrar el número de ciclos mínimo necesario para la amplificación de los fragmentos de interés y así evitar la sobreamplificación y la formación de

quimeras. Por cada muestra se realizaron PCR en triplicado para así amplificar el ADN de las bacterias que se encontraban en poca cantidad, evitando así sesgos en la amplificación, y obtener suficiente producto para los pasos posteriores. Los oligos utilizados en este trabajo fueron 515F/806R (Caporaso *et al.*, 2011), los cuales amplifican un fragmento de 460 pares de bases (pb) aproximadamente de la región V3–V4 del gen ribosomal 16S. Además, cada par de oligos cuenta con una etiqueta (barcode), la cual consiste en 6 nucleótidos anexados en el extremo 5' de ambos oligos, tanto en el “forward” como en el “reverse”, por lo que este barcode se incorpora en ambos extremos de los amplicones resultantes de la PCR (Vo & Jedlicka, 2014). El añadir este barcode nos permite la identificación de cada muestra después de la demultiplexación de secuencias. Los barcode fueron diseñados para poder ser corregidos en base al código Hamming, de modo que el verdadero barcode pueda ser recuperado si llegase a ocurrir un error de secuenciación en un solo nucleótido (Bystrykh, 2012). En la **Tabla 2** se muestra la secuencia de nucleótidos, incluyendo los barcode de los 8 pares de primer utilizados en este trabajo.

La preparación de librerías se llevó a cabo siguiendo el protocolo establecido por Vo y Jedlicka (2014), el cual se explica en detalle en la sección de ANEXOS. A grandes rasgos la preparación de librerías se realizó de la siguiente manera: Primero, se juntaron los triplicados de PCR por muestra (promedio total de 75 μ l) y se limpiaron estos productos con ayuda de perlas magnéticas Sera-mag (Thermo Scientific, part No: 24152105050250), con un volumen relativo de 1.2X por muestra (promedio de 90 μ l). Esto nos permite eliminar impurezas, amplicones de tamaño no deseado y concentrar las muestras (volumen final de 20 μ l). Después se cuantificaron los productos ya lavados con ayuda de un fluorímetro Qubit® 3.0 (Thermo Scientific, Q33216) y el kit de ensayo de alta sensibilidad para ADN bicateriano (Thermo Scientific, Q32851), para así combinar los amplicones de las diferentes librerías de manera equimolar, de modo que cada librería contuviera cada uno de los 8 barcode diferentes utilizados en este trabajo (**Figura 3**, tomada de (Vo & Jedlicka 2014)). Por último se ligó un adaptador TruSeq de Illumina diferente a cada una de las librerías en un proceso libre de PCR, para así evitar el intercambio de códigos de barra y la formación de quimeras entre los amplicones de las muestras mezcladas en cada librería. En la sección de ANEXOS se muestra la secuencia de los adaptadores Truseq de Illumina. En total se prepararon 9 librerías, de 8 muestras cada una, las cuales fueron secuenciadas en el departamento de biología de San Francisco State University en la plataforma de Illumina MiSeq, con el kit de reactivos v3.

Localidad	Especie	No. Muestras (n)	Elevación (m)	Latitud, Longitud (WGS84)
Estado de México				
1. Puerto Lengua de Vaca	<i>P. longicauda</i>	6	2744	19.43799, -100.17799
2. Puerto Lengua de Vaca	<i>P. longicauda</i>	1	2623	19.41804, -100.16151
3. Raíces	<i>P. robertsi</i>	7	3302	19.18742, -99.80638
4. Sultepec	<i>P. robertsi</i>	11	2850	19.01358, -99.90027
	<i>P. leprosa</i>	7		
5. Lagunas de Zempoala	<i>P. altamontana</i>	10	3099	19.0629, -99.33206
	<i>P. leprosa</i>	3		
	<i>A. cephalica</i>	2		
6. Lagunas de Zempoala	<i>P. leprosa</i>	6	2902	19.04676, -99.31806
	<i>A. cephalica</i>	7		
Veracruz				
7. Las Lajas	<i>P. melanomolga</i>	1	3120	19.59315, -97.09306
	<i>P. leprosa</i>	2		
	<i>A. cephalica</i>	1		
8. Las Vigas de Ramírez	<i>P. leprosa</i>	4	3052	19.58396, -97.0956
9. El Conejo	<i>P. melanomolga</i>	5	3475	19.52134, -97.15847
	<i>P. leprosa</i>	1		
10. El Conejo	<i>P. melanomolga</i>	2	3948	19.49913, -97.15369
Puebla				
11. Santa Cruz Texmalaquilla	<i>P. gadovii</i>	4	3561	18.97192, -97.28661
	<i>P. leprosa</i>	2		
12. Atzitzintla	<i>P. gadovii</i>	1	2775	18.9973, -97.21324
	<i>P. leprosa</i>	4		

Tabla 1. Datos generales de las 12 localidades muestreadas.

4.4 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas se unieron utilizando PEAR (Paired-End Read Merger) (Zhang *et al.*, 2014), con una puntuación de calidad mínima de Q25 y un p-value para la prueba estadística de 0.001. Las secuencias mayores a 520pb y menores a 400pb fueron descartadas. Las secuencias ya unidas, fueron analizadas mediante el pipeline Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME, v. 1.9.1) (Caporaso *et al.*, 2010). QIIME es un pipeline de código abierto para el análisis del microbioma a partir de datos de secuenciación en bruto, estos datos pueden provenir de la

plataforma Illumina o cualquier otra. A grandes rasgos, con QIIME se pueden tomar las secuencias en bruto, realizarles un filtrado de calidad y la demultiplexación, asignando así las secuencias de barcode a las muestras de las cuales se derivaron. Después, QIIME agrupa las secuencias en base a su similitud entre sí (umbral impuesto por el usuario) en unidades taxonómicas operacionales (OTUs por sus siglas en inglés).

Existen tres estrategias como QIIME realizar la selección de OTUs. La estrategia “de novo” no necesita una base de datos externa como referencia pero no puede escalarse a conjuntos de datos grandes y es muy tardada. Con la estrategia de “referencia cerrada”, las secuencias se alinean a una base de datos externa como puede ser Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>). Las ventajas de esta estrategia es que las OTUs se definen en base a una referencia pre-existente, por lo que normalmente hay asignaciones taxonómicas de alta calidad para cada OTU, es rápida y fácil de escalar a grandes conjuntos de datos. Su principal desventaja es que las secuencias que no coincidan con nada en las bases de datos son descartadas. Finalmente, la última estrategia de asignación de OTUs es la de “referencia abierta”, la cual es una combinación de las dos primeras, primero las secuencias se alinean a una base de datos externa, como en la estrategia de referencia cerrada, pero aquí las secuencias que no coincidan con la base de datos de referencia no son descartadas, sino que se agrupan con la estrategia de novo. La estrategia de referencia abierta tiene las ventajas de ambos protocolos, de novo y referencia cerrada (Rideout *et al.*, 2014).

Las secuencias se demultiplexaron por su barcode con un score de calidad de Q25 y se cortaron los barcodes y los adaptadores de Illumina de las secuencias (Caporaso *et al.*, 2010). La asignación de OTUs se realizó por el método de referencia abierta, usando como marco de referencia la base de datos de Greengenes (v13.8) (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>) con una similitud de OTUs del 97 %. Para estandarizar el esfuerzo de muestreo entre las diferentes muestras y evitar así sesgos derivados de la variación en la profundidad de secuenciación, se realizó una rarefacción a 7500 secuencias por muestra. Esta profundidad de secuenciación se utilizó en los posteriores análisis que incluyen la determinación de la diversidad alfa y beta. Se calcularon los siguientes indicadores de diversidad alfa: riqueza de OTUs, Chao1 y la diversidad filogenética del árbol completo. Chao1 es un estimador el cual calcula la verdadera

Nombre del primer	Secuencia del barcode	Secuencia del primer (5'-3')
515F1	CGTCAT	CCTACGGGNGGCWGCAG
806R1	CGTCAT	GACTACHVGGGTATCTAATCC
515F2	AGAGAG	CCTACGGGNGGCWGCAG
806R2	AGAGAG	GACTACHVGGGTATCTAATCC
515F3	CACTGT	CCTACGGGNGGCWGCAG
806R3	CACTGT	GACTACHVGGGTATCTAATCC
515F4	GTCTCA	CCTACGGGNGGCWGCAG
806R4	GTCTCA	GACTACHVGGGTATCTAATCC
515F5	TCGATC	CCTACGGGNGGCWGCAG
806R5	TCGATC	GACTACHVGGGTATCTAATCC
515F6	AGCATC	CCTACGGGNGGCWGCAG
806R6	AGCATC	GACTACHVGGGTATCTAATCC
515F7	GACACT	CCTACGGGNGGCWGCAG
806R7	GACACT	GACTACHVGGGTATCTAATCC
515F8	ACACAT	CCTACGGGNGGCWGCAG
806R8	ACACAT	GACTACHVGGGTATCTAATCC

Tabla 2. Secuencia de nucleótidos de los oligos utilizados para la amplificación del gen 16S.

diversidad de especies de una muestra. La idea detrás de este estimador es que si se está muestreando una comunidad, y todavía se están descubriendo especies raras (especies encontradas solo una vez), es probable que las especies más raras todavía no se encuentren, pero tan pronto como todas las especies se han recuperado al menos dos veces, es probable que no queden especies nuevas por encontrar (Chao, 1984). Los análisis de similitud de las comunidades bacterianas (diversidad beta) se realizaron con el algoritmo UniFrac el cual es una métrica de distancia utilizada para comparar comunidades biológicas. UniFrac incorpora información sobre la relación relativa de los miembros de la comunidad mediante la incorporación de distancias filogenéticas entre organismos observados en el cómputo (Lozupone *et al.*, 2011). Los patrones de diversidad beta se visualizaron usando un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS por sus siglas en inglés) (Clarke & Warwick, 2001).

4.5 Elaboración de matrices de distancia y pruebas de Mantel parcial

Para determinar los factores que influyen la composición del microbioma en la piel de las salamandras, se realizaron matrices de distancia de cuatro diferentes factores: climatológicos, geográficos, filogenéticos y la diversidad beta del microbioma.

4.5.1 Matriz climatológica

Inicialmente se tomaron las 19 variables bioclimáticas de la base de datos de WorldClim (<http://www.worldclim.org/>) (Hijmans *et al.*, 2005). Estas capas bioclimáticas fueron descargadas de WorldClim a una resolución de 30 arcos segundos (~1 km). Con ayuda del programa de código abierto QGIS (<http://qgis.osgeo.org/es/site/>) se obtuvo la información bioclimática de 102 localidades, las cuales incluyen los alrededores de los puntos muestreados en este trabajo y en donde se tienen reportes de la presencia de salamandras en la región del EVTVM según la base de datos VertNet (www.vertnet.org) y registros no publicados del laboratorio. Se escogieron estas localidades y no puntos al azar ya que se buscó que estos reflejaran las condiciones climáticas en las cuales podemos encontrar salamandras pleurodóntidas, como lo son las especies de enfoque de este trabajo. Con esta información bioclimática y mediante un análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés), se obtuvo la combinación de capas que explicaran la mayor variación de datos. En consecuencia, el set final de datos utilizados se compuso a partir de dos componentes principales (PC), los cuales explican un 97% de la variación total de las 19 capas bioclimáticas. El PC1 se compone principalmente de 5 capas: estacionalidad de la temperatura (Bio4), precipitación anual (Bio12), precipitación del mes más húmedo (Bio13), precipitación del trimestre más húmedo (Bio16) y precipitación del trimestre más cálido (Bio18), explicando un 78% de la variación y el PC2 el cual está compuesto principalmente de 3 capas: estacionalidad de la temperatura (Bio4), precipitación anual (Bio12), precipitación del trimestre más húmedo (Bio16), explicando un 19% de la variación. A partir de las capas compuestas por el PC1, se generó el marco de datos bioclimáticos pero solo de ocho de las 12 localidades muestreadas en este trabajo, ya que ciertas localidades estaban muy próximas y se tomaron como si fueran solo una. Las localidades combinadas fueron la 1 con 2, 5 con 6 y 9 con 10 (por su número de localidad en la **Tabla 1**). En los subsecuentes análisis se usaron solo estas ocho localidades, realizando las pruebas de Mantel parcial solo con las variables del PC1.

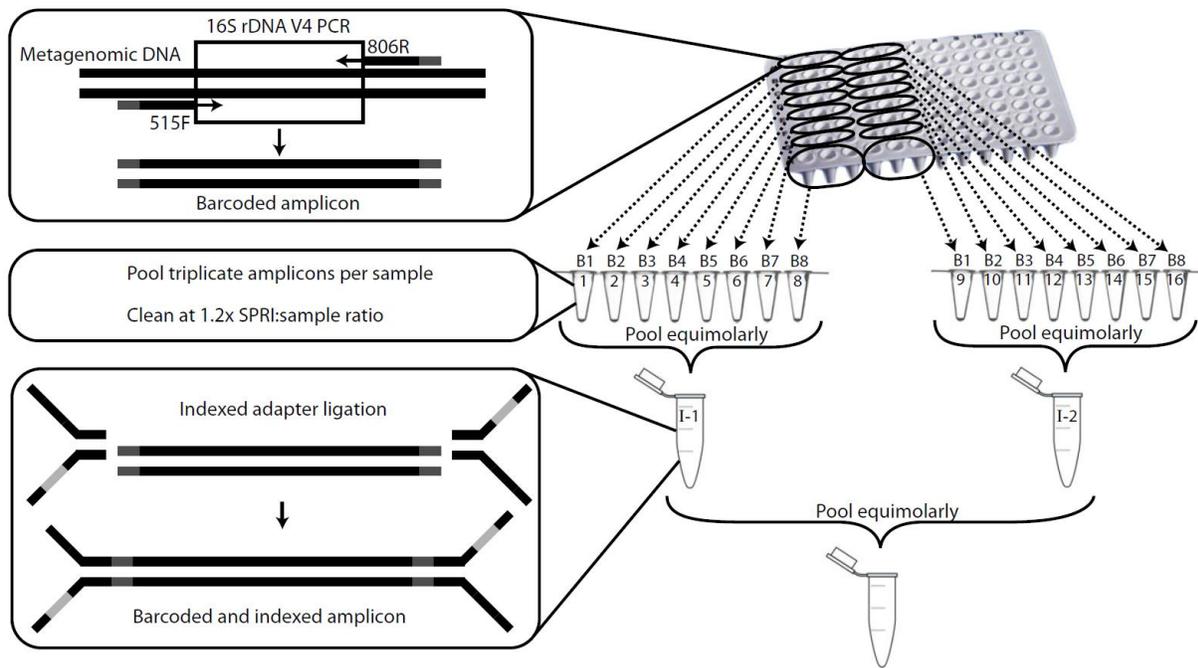


Figura 3. Etiquetado combinatorio y estrategia de combinación empleada en este trabajo para la preparación y secuenciación de librerías de Illumina, ejemplo para 16 muestras. Las barras grises oscuras indican los barcode en el final del 5' de los oligos, que son incorporados a los amplicones durante la PCR. Las barras de color gris claro indican los índices del adaptador TruSeq de Illumina que son unidos a los amplicones durante la ligación del adaptador. B# y I-# hacen referencia a las secuencias de los barcode e índices de Illumina, respectivamente, donde el # de tubo indica la identificación única de una muestra.

4.5.2 Matriz geográfica

Utilizando el programa QGIS y la latitud y longitud de las 8 localidades muestreadas (Tabla 1), se obtuvo la información de la distancia geográfica entre las diferentes localidades y a partir de este marco de datos se formó la matriz geográfica. Se usó una proyección cónica equidistante de América del Norte para calcular la distancia entre sitios en metros.

4.5.3 Matriz de distancia genética

Se extrajo ADN a partir de hígado de 25 individuos colectados en este trabajo. Con los oligos MVZ15 y MVZ16 se amplificó una región del gen mitocondrial citocromo b de aproximadamente 780 pb. Estos oligos fueron diseñados para emparejar secuencias de salamandras del género *Ensatina* pero también amplifican el ADN de otros anfibios (Jackman et al., 1997). La secuencia de los amplicones se obtuvo mediante secuenciación Sanger, la cual se realizó en el departamento de servicios genómicos de la Unidad de Genómica Avanzada,

Cinvestav Irapuato. Las secuencias obtenidas se alinearon con el software Geneious v8.1.7 (<http://www.geneious.com/>) con el método de alineamiento MUSCLE v3.8.31.4 (Edgar, 2004). El cálculo de la matriz de distancia entre ellas se llevó a cabo en el software Arlequin (Excoffier & Lischer 2010). Las secuencias de los individuos, se agruparon en 12 poblaciones según la especie y localidad de muestreo del individuo como se muestra en la

Tabla 3. Se calculó la distancia promedia entre pares de individuos de dos poblaciones/especies (average pairwise distance) usando el modelo de distancia TN93 (Tamura & Nei 1993).

4.5.4 Matriz de diversidad beta del microbioma

Mediante el script `core_diversity_analyses.py`, el cual está incluido en el pipeline QIIME (Caporaso *et al.*, 2010), se calculó la diversidad beta del microbioma de la piel de las diferentes salamandras. La distancia métrica utilizada por este script es UniFrac, tanto ponderado (weighted) como no ponderado (unweighted). La distancia UniFrac es una medida de la diversidad beta que utiliza la información filogenética para comparar muestras ambientales. La distancia métrica UniFrac, junto con técnicas estadísticas multivariantes estándar, incluyendo análisis de coordenadas principales (PCoA), sirven para identificar que tan diferentes son las comunidades microbianas entre sí (Lozupone & Knight 2005).

Este script genera ambas matrices de distancia. La UniFrac weighted (medición cuantitativa) es ideal para revelar las diferencias de la comunidad que se deben a cambios en la abundancia relativa de las especies microbianas (por ejemplo, cuando un determinado conjunto de especies florece, debido a una fuente de nutriente limitante y se vuelve abundante). Mientras que UniFrac unweighted (medición cualitativa) son más informativas cuando las comunidades difieren primordialmente por la diversidad de sus especies microbianas (Lozupone & Knight 2005). Ya que cada una de estas dos matrices nos da información distinta de la diversidad beta del microbioma, se utilizaron ambas matrices en los posteriores análisis.

Una vez que contábamos con estas 5 matrices de distancia, se compararon entre sí mediante el uso de la prueba estadística de Mantel parcial (Legendre & Fortin, 1989; Mantel, 1967), en el entorno estadístico R versión 3.3.1 (R Development Core Team, 2016) con el paquete `ecodist` (Dissimilarity-based functions for ecological analysis) (Goslee & Urban 2007). Las pruebas

Población	Especie	Localidad
longA (4)	<i>P. longicauda</i>	Puerto lengua de vaca
robB (3)	<i>P. robertsi</i>	Raices
robC (1)	<i>P. robertsi</i>	Sultepec
altD (3)	<i>P. altamontana</i>	Lagunas de Zempoala
melf (1)	<i>P. melanomolga</i>	El Conejo
gadG (2)	<i>P. gadovii</i>	Santa Cruz Texmalaquilla
gadH (1)	<i>P. gadovii</i>	Atzitzintla
lepC (1)	<i>P. leprosa</i>	Sultepec
lepD (3)	<i>P. leprosa</i>	Lagunas de Zempoala
lepE (2)	<i>P. leprosa</i>	Las Lajas
lepG (1)	<i>P. leprosa</i>	Santa Cruz Texmalaquilla
lepH (3)	<i>P. leprosa</i>	Atzitzintla

Tabla 3. Especies y localidades de muestreo de los 25 individuos utilizados para generar la matriz de distancia genética. Entre paréntesis se muestra el número de individuos de cada población.

realizadas fue entre la diversidad beta de los microorganismos de la piel de las salamandras (tanto la medición weighted como unweighted), en contra de la matrices de distancia climatológica, distancia genética y geográfica. A grandes rasgos, la prueba de Mantel parcial, al igual que la prueba Mantel, se puede utilizar para calcular correlaciones entre posiciones correspondientes en una matriz de distancia. Sin embargo, la prueba de Mantel parcial corrige la influencia de otro conjunto de variables almacenadas en una (o múltiples) matriz diferente.

5. RESULTADOS

5.1 Colecta y amplificación de muestras de microbioma

Se tomó la muestra del microbioma de la piel de 80 salamandras, con un promedio de nueve muestras por especie, a excepción de *P. leprosa*, de la cual se tomaron 27. De este conjunto se logró amplificar el gen 16S de 71 muestras, las cuales incluyen cinco muestras de *Pseudoeurycea longicauda*, nueve de *P. robertsi*, ocho de *P. altamontana*, seis de *P. melanomolga*, siete de *P. gadovii*, 26 de *P. leprosa*, siete de *Aquiloerycea cephalica* y tres controles negativos (**Tabla 4**). En el **Anexo 1** se pueden observar las muestras de microbioma amplificadas y su concentración de ADN después de la purificación de productos, así como las muestras que componen cada librería. Las secuencias provenientes de las muestras del microbioma de la especie *A. cephalica*, se descartaron en los análisis de diversidad beta, ya que no son parte de las especies de enfoque de este estudio.

5.2 Análisis de secuencias

En total se obtuvieron 8,517,972 secuencias pareadas con una longitud promedio de 250 pb a partir de la secuenciación de Illumina Miseq. Al unir estas secuencias mediante PEAR, 3,633,188 secuencias se descartaron ya que no superaron los estándares de calidad impuestos al momento de la unión. Las secuencias restantes fueron 4,884,784 con una longitud promedio de 475 pb. Después de la demultiplexación de secuencias y eliminar el barcode de las secuencias, restaron 4,048,474 secuencias con una longitud promedio de 466 pb lo cual corresponde al amplicon de 16S sin barcode ni adaptador de Illumina. El promedio de secuencias por muestra fue de 50,605 siendo el máximo obtenido de 197,142. Las muestras etiquetadas con el barcode 5 (TCGATC) obtuvieron un número de secuencias muy bajo, menor a 983, lo que indica que hubo un problema en este barcode en específico. Este error impidió la correcta asignación de las secuencias etiquetadas con este barcode, por lo que se descartaron estas secuencias de los análisis de diversidad alfa y beta. Para evitar sesgos derivados de esta variación en la profundidad de secuenciación entre las muestras, se utilizó una rarefacción a 7,500 secuencias por muestra en todos los análisis de diversidad subsecuentes. El número de muestras amplificadas por especie,

Especie	Numero de muestras amplificadas	Numero de muestras usadas en los análisis de diversidad		Numero totales de secuencias pareadas
		Alfa	Beta	
<i>P. leprosa</i>	26	16	13	786,165
<i>P. melanomolga</i>	6	4	3	661,361
<i>P. gadovii</i>	7	5	5	371,997
<i>P. altamontana</i>	8	7	7	339,504
<i>P. robertsi</i>	9	6	6	328,136
<i>P. longicauda</i>	5	3	3	86,524
<i>A. cephalica</i>	7	6	0	476,115
Control negativo	3	0	0	1,878
TOTAL	71	47	37	3,051,680

Tabla 4. Numero de muestras amplificadas por especie, y utilizadas en los análisis de diversidad alfa y beta, después de una rarefacción a 7,500 secuencias por muestras. En la tabla se muestra el número de secuencias pareadas totales por especie, antes de la rarefacción a 7,500 secuencias por muestra.

así como las muestras utilizadas en los análisis de diversidad alfa y beta se muestran en la **Tabla 4**.

5.3 Diversidad taxonómica

Para evaluar si 7,500 secuencias representan el total de riqueza de OTUs en este estudio, se calcularon curvas de rarefacción de los OTUs observados por especie (**Figura 4**). Ninguno de los grupos de muestras alcanzó la asíntota, lo que indica que el número de OTUs observados aumentara si se incrementa el número de secuencias por muestra. Las 4,048,474 secuencias identificadas por un barcode se asignaron a un total de 25,901 OTUs, definidos por un 97% de similitud, con un promedio de 480 OTUs por muestra. La asignación taxonómica de los OTUs obtenidos se realizó con el método Uclust con una similitud del 97%, con referencia la base de datos Greengenes. Las secuencias se clasificaron en 28 clases diferentes, predominando las Gammaproteobacteria, con una abundancia relativa entre todas las muestras del 40.2%, seguido

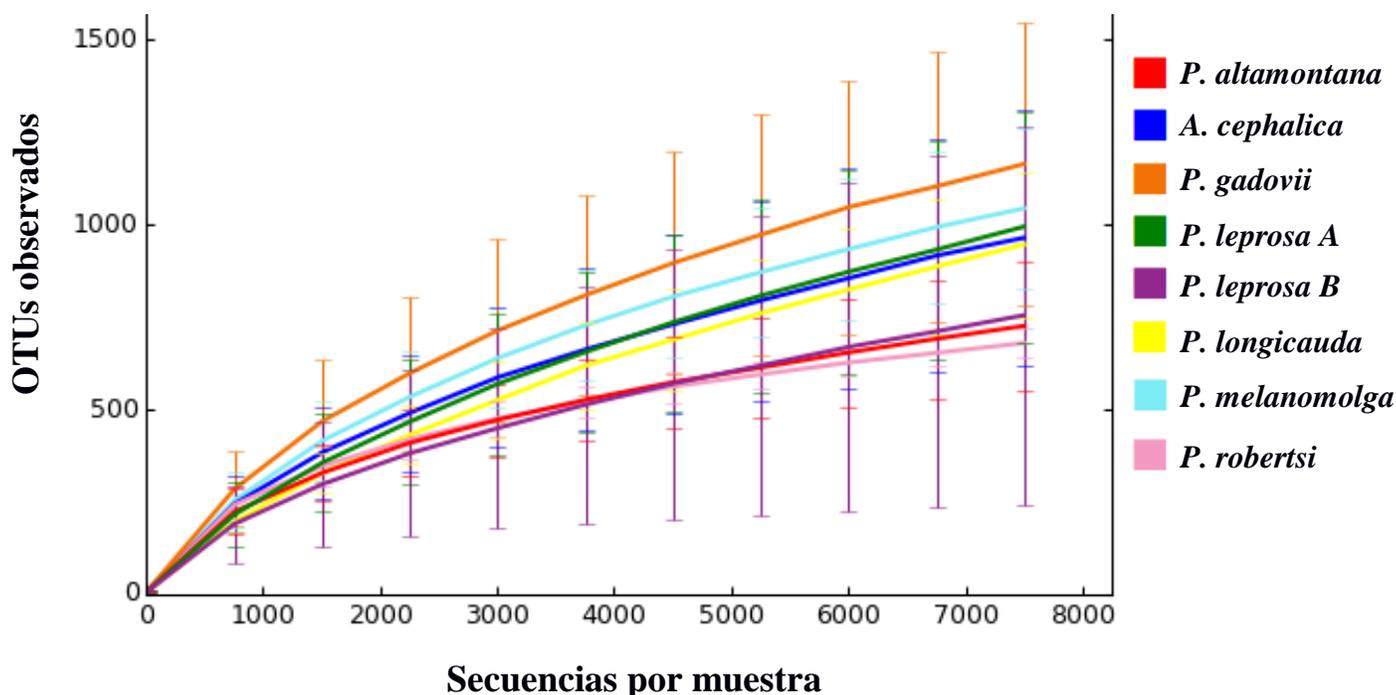


Figura 4. Curvas de rarefacción de OTUs observados a una profundidad de 7,500 secuencias por muestra. Los individuos se agruparon por especie. *P. leprosa A* indica los individuos muestreados en Puebla y Veracruz (clado Veracruz), mientras que *P. leprosa B* indica los individuos muestreados en el Estado de México (clado Edo. México).

por las Actinobacteria con un 12.5% y Chlamydiae con un 12.2%. Se encontró Chlamydiae en todas las muestras, en la mayoría en una proporción menor al 3.5%. Sin embargo, se detectó una gran proporción de Chlamydiae en 3 individuos de la especie *P. leprosa* SMR2585 (96%), SMR2507 (86%), SMR2537 (93%) y un individuo de la especie *P. melanomolga*, SMR2544 (68%) Se colectaron estos cuatro individuos en diferentes localidades. Estos cuatro individuos se descartaron en los análisis de diversidad beta, ya que no es necesario un análisis para saber que la composición del microbioma de estas muestras es diferente a las demás. En la **Figura 5** se muestra la abundancia relativa taxonómica de las bacterias asociadas a la piel de las salamandras a nivel de clase y en la **Figura 6** a nivel de familia.

En la **Figura 7** se muestran las curvas de rarefacción a 7,500 secuencias por muestra del estimador Chao1, el cual estima la verdadera diversidad de especies de una muestra (cuantas especies nuevas quedan por encontrar). Los valores más altos de Chao1 se observaron en las muestras provenientes de *P. leprosa* y *P. gadovii* colectadas en Veracruz. Las curvas de rarefacción de estas muestras no alcanzan la asíntota, lo que indica que aún hay especies raras por

Clase de bacteria	Abundancia relativa entre todas las muestras (%)
Gammaproteobacteria	40.2
Actinobacteria	12.5
Chlamydiae	12.2
Alphaproteobacteria	9.2
Bacilli	3.6
Betaproteobacteria	3.4
Sin clasificar	2.0
Bacteroidia	1.4
Acidobacteriia	1.3
Sphingobacteriia	1.2
Clostridia	1.1
Planctomycetia	1.1
Flavobacteria	1.0
Saprospirae	0.8
Spartobacteria	0.8
Rubrobacteria	0.6
Thermoleophilia	0.6
Cytophagia	0.6
Phycisphaerae	0.6
Deltaproteobacteria	0.6
Solibacteres	0.5
Acidimicrobiia	0.5
Chloracidobacteria	0.3
Gemmatimonadetes	0.3
Armatimonadia	0.2
Verrucomicrobiae	0.2
Chthonomonadetes	0.2
Fimbriimonadia	0.1

Tabla 5. Abundancia relativa de bacterias en la piel de las salamandras a nivel de clase.

descubrir. Las muestras con los valores más bajos de Chao1 pertenecieron a las especies colectadas en el Edo. de México (*P. leprosa*, *P. altamontana* y *P. robertsi*), siendo esta última en donde se observaron los niveles más bajos de Chao1.

Se usaron curvas de rarefacción alfa, a 7,500 secuencias por muestra, del índice de diversidad filogenética de Faith (phylogenetic diversity, o PD por sus siglas en inglés), para estimar el total del largo de las ramas del árbol filogenético que une a todas las especies en una muestra. Esto nos sirve para calcular la riqueza de especies bacterias presentes en la piel de las distintas especies de salamandras muestreadas (**Figura 8**). Primero, se puede observar que las curvas de rarefacción no alcanzan la asíntota a un nivel de 7,500 secuencias por muestra, ya que siguen creciendo aunque muy lentamente, indicando que se muestreó gran parte la diversidad bacteriana de la piel de las salamandras. Segundo, los valores de PD indican que existe una variabilidad en la diversidad filogenética de especies bacterianas de las diferentes especies de salamandras. Las muestras de microbioma provenientes de las especies de salamandras de Puebla y Veracruz (clado Veracruz) mostraron un valor mayor de PD. Inclusive, las *P. leprosas* de Veracruz, mostraron valores más altos de PD que las *P. leprosas* muestreadas en el Edo. de México (**Figura 8**). La especie *P. gadovii* obtuvo el valor más alto de PD, mientras que el valor más bajo de PD se observó en la especie *P. robertsi*.

Se usó la métrica UniFrac para calcular las diferencias de las comunidades bacterianas de la piel de salamandras (diversidad beta). Estas diferencias se visualizaron mediante un escalamiento multidimensional no métrico (Non-metric Multidimensional Scaling, NMDS por sus siglas en inglés; **Figura 9**). Los individuos de la especie *P. robertsi* tienden a agruparse en la misma parte del gráfico (centro del gráfico), indicando que poseen un ensamblaje bacteriano similar. Este mismo patrón se observa con los individuos de la especie *P. leprosa*, sin embargo se forman dos grupos: en la parte superior derecha del gráfico se agrupan los individuos de *P. leprosa* muestreados en Veracruz (puntos en rojo), mientras que en la parte central se agrupan las *P. leprosas* del Edo. de México. Los individuos de la especie *P. gadovii* se esparcen por todo el gráfico, indicando que la composición bacteriana de la piel de estos individuos es la más variada. En general la mayoría de los individuos del clado Edo. de México se agrupan en la parte central inferior del gráfico, mientras que los individuos del clado Veracruz en la parte superior.

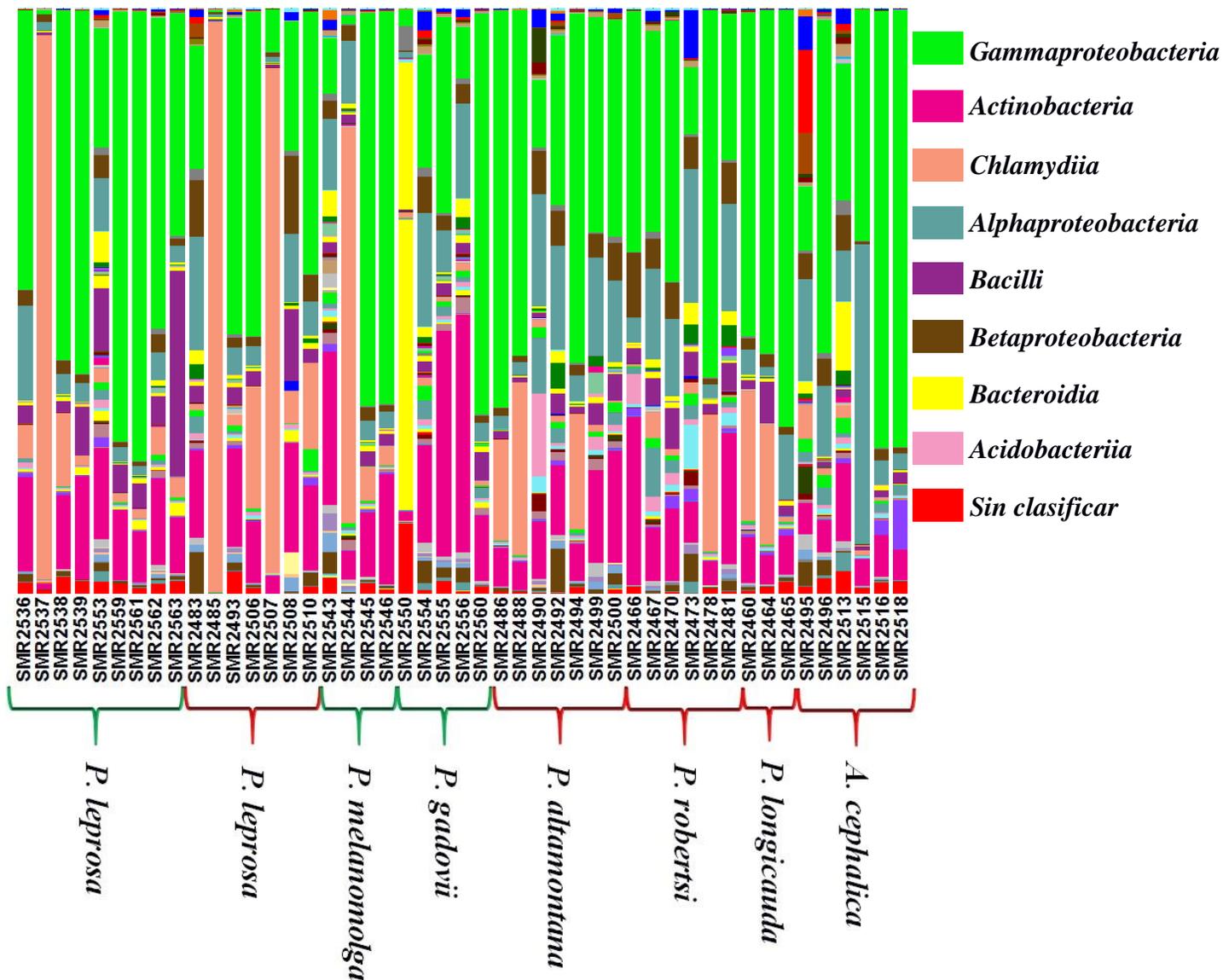


Figura 5. Abundancia relativa taxonómica de las bacterias asociadas a la piel de salamandras a nivel de clase. Cada columna representa la composición bacteriana de un individuo diferente. Los individuos se ordenaron por especie y clado al que pertenecen. Las especies pertenecientes al clado Veracruz se identifican por el corchete verde, mientras que las especies del clado Edo, México por el corchete rojo. Cada clase de bacteria se representa con un color. En la parte derecha de la figura se indica el color de las ocho clases de bacterias más abundantes, incluyendo el color representando las bacterias sin clasificar.

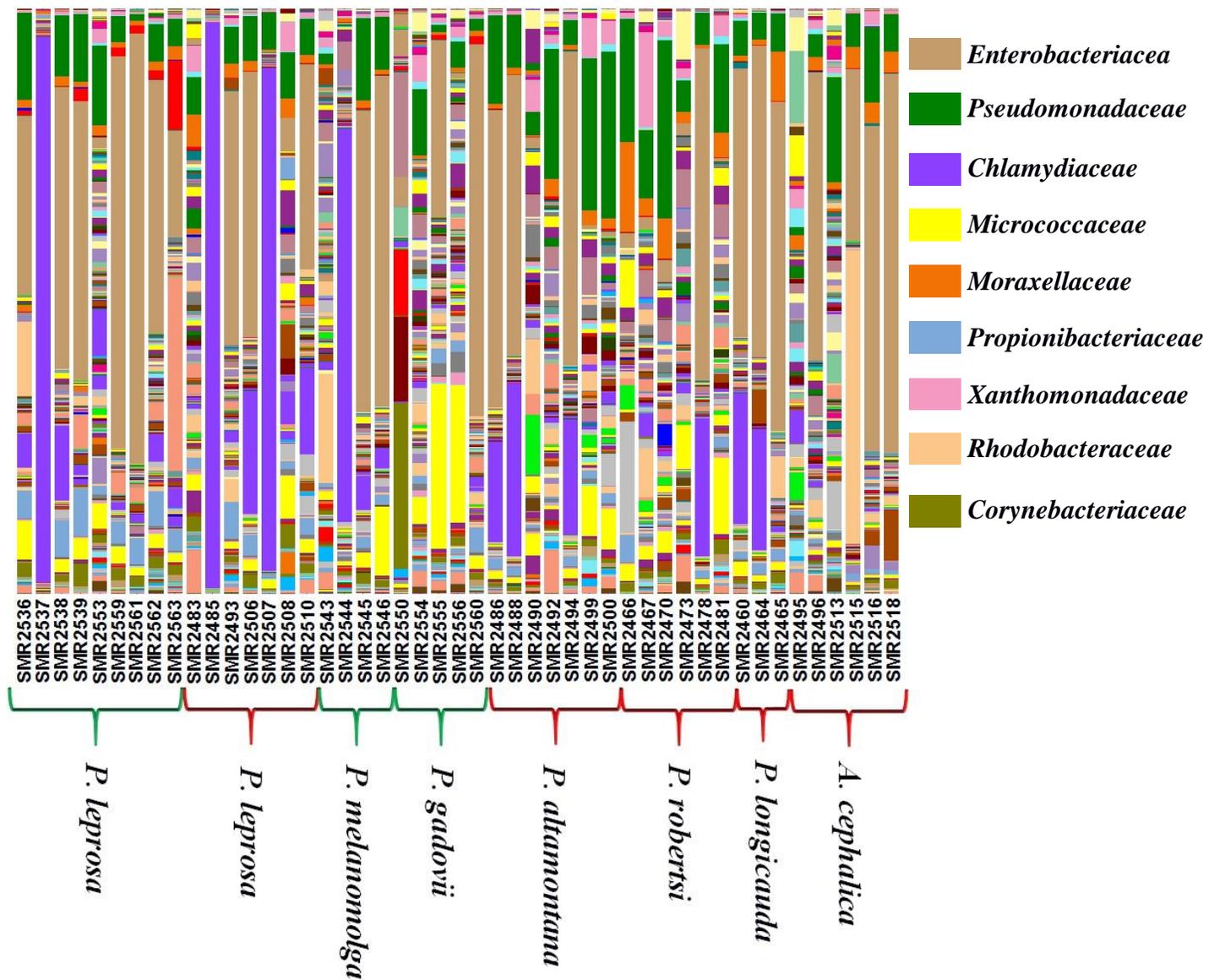


Figura 6. Abundancia relativa taxonómica de las bacterias asociadas a la piel de salamandras a nivel de familia. Cada columna representa la composición bacteriana de un individuo diferente. Los individuos se ordenaron por especie y clado al que pertenecen. Las especies pertenecientes al clado Veracruz se identifican por el corchete verde, mientras que las especies del clado Edo, México por el corchete rojo. Cada clase de bacteria se representa con un color. En la parte derecha de la figura se indica el color de las nueve familias de bacterias más abundantes.

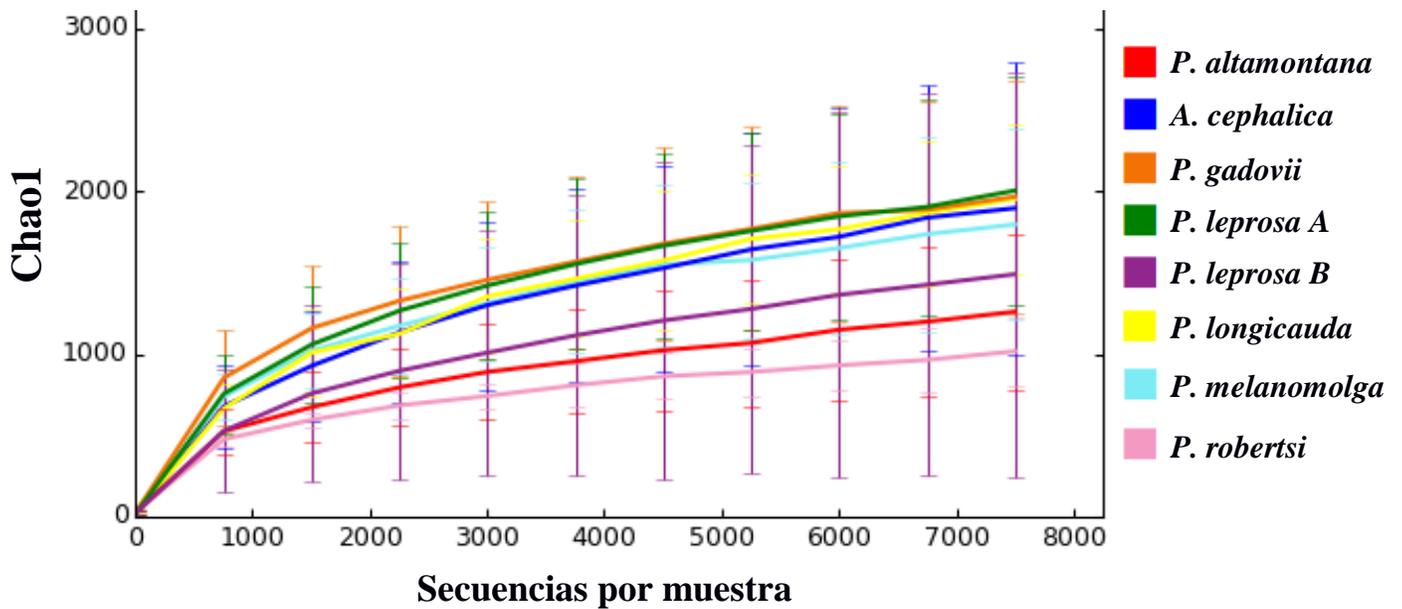


Figura 7. Curvas de rarefacción del estimador Chao1 a una profundidad de 7,500 secuencias por muestra. Los individuos se agruparon por especie. *P. leprosa A* indica los individuos muestreados en Puebla y Veracruz (clado Veracruz), mientras que *P. leprosa B* indica los individuos muestreados en el Estado de México (clado Edo. de México).

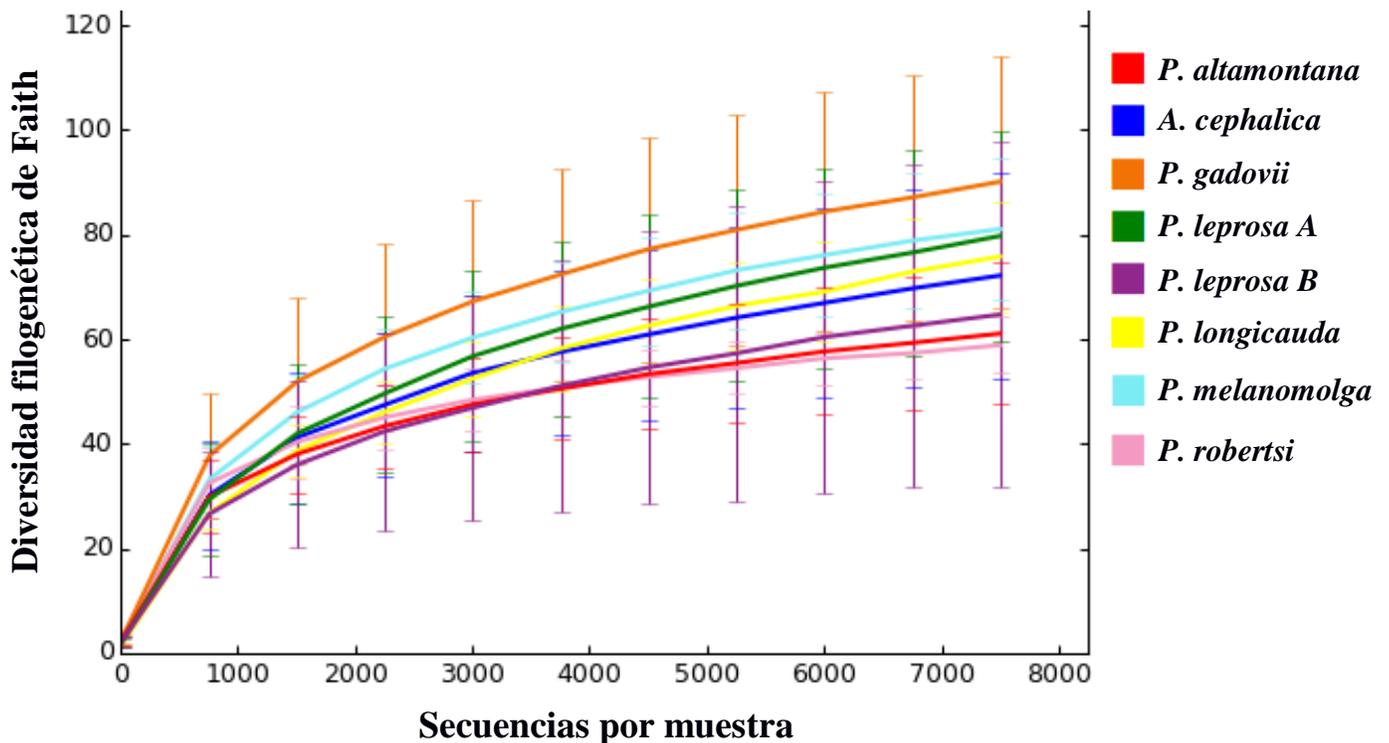


Figura 8. Curvas de rarefacción de la diversidad filogenética de Faith a una profundidad de 7,500 secuencias por muestra. Los individuos se agruparon por especie. *P. leprosa A* indica los individuos muestreados en Puebla y Veracruz (clado Veracruz), mientras que *P. leprosa B* indica los individuos muestreados en el Estado de México (clado Edo. de México).

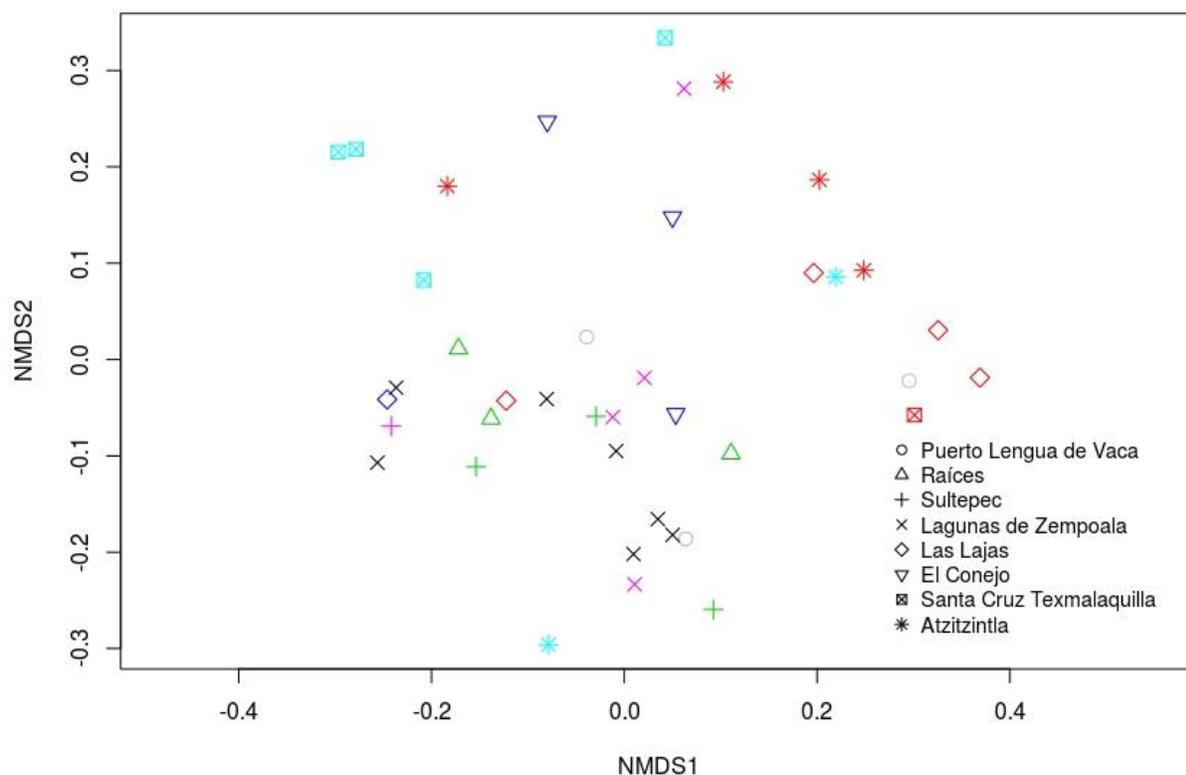


Figura 9. Escalamiento multidimensional no métrico (Non-metric Multidimensional Scaling, NMDS por sus siglas en inglés) de la distancia UniFrac unweighted de las comunidades bacterianas de la piel de salamandras. Cada punto en la figura representa un individuo diferente. El color del punto indica la especie del individuo (*P. altamontana* = negro, *P. longicauda* = gris, *P. robertsi* = verde, *P. melanomolga* = azul, *P. gadovii* = cian, *P. leprosa* Edo. de México = morado y *P. leprosa* Veracruz = rojo). La figura del punto indica la localidad de donde fue muestreado cada individuo (parte inferior derecha de la figura). Los símbolos más cercanos representan muestras con ensamblajes bacterianos más similares. Estrés a 4D = 0.10.

5.4 Pruebas de Mantel parcial

Se realizaron pruebas de Mantel y Mantel parcial para distinguir los efectos que los factores climatológicos, geográficos (distancia entre localidades) y filogenéticos (distancia genética) tienen sobre la composición del microbioma de la piel de las salamandras. En la **Tabla 6** se muestran las correlaciones obtenidas entre las diferentes matrices. No se observó una correlación significativa al comparar la matriz de distancia de la diversidad beta ponderada (**micrW**) contra las matrices de distancia filogenética (**cytb**), climatológica (**clim**) y geográfica (**geo**). Sin embargo al comparar la matriz de distancia de la diversidad beta no ponderada (**micrU**) contra **cytb**, se observó una correlación significativa del $r=0.14$. Esta correlación se mantiene igual si se toma en cuenta el efecto de **clim**, pero disminuye a $r=0.098$ si se toma en cuenta el efecto de **geo**. La correlación más elevada fue de $r=0.242$ y se observó al comparar **micrU** contra **geo**, esta

Matrices comparadas	Mantel r	Valor p
micrW ~ cytb	-0.026	0.677
micrW ~ clim	0.019	0.371
micrW ~ geo	0.029	0.193
micrU ~ cytb	0.140	0.002
micrU ~ cytb + clim	0.140	0.008
micrU ~ cytb + geo	0.098	0.025
micrU ~ clim	0.004	0.445
micrU ~ geo	0.242	0.001
micrU ~ geo + clim	0.232	0.001
micrU ~ geo + cytb	0.210	0.001

Tabla 6. Pruebas de Mantel parcial entre las cinco matrices de distancia (md) realizadas en este trabajo. **clim** = md climatologica, **cytb** = md genética, **geo** = md geográfica, **micrW** = md de la diversidad beta ponderada (weighted) y **micrU** = md de la diversidad beta no ponderada (unweighted).

correlación se mantiene muy similar si se toma en cuenta el efecto de **clim** y **cytb**, $r=0.232$ y $r=0.210$ respectivamente.

6. DISCUSIÓN

Todos los animales son hospedadores de microorganismos simbióticos; como resultado de estas asociaciones ancestrales, los animales dependen de los microorganismos para desarrollar en ellos muchas de las funciones críticas para la vida, como es la digestión y la resistencia a enfermedades (Wenzel *et al.*, 2002; Rosenberg *et al.*, 2007). Distintos estudios revelan cómo el microbioma intestinal ha coevolucionado junto con los animales, lo que complementa su biología en formas que son benéficas tanto para los microorganismos como para su hospedero animal (Bäckhed *et al.*, 2005; Muegge *et al.*, 2011). Así entonces, es posible que la piel de los anfibios también haya evolucionado junto con los microorganismos que hospeda, por lo que se esperaría que las distintas especies de salamandras muestreadas en este estudio tuvieran una composición del microbioma ligeramente diferente entre sí.

En este estudio encontré que las comunidades bacterianas de la piel de las salamandras tienden a agruparse primeramente por la localidad donde fueron muestreados los individuos y después por su historia filogenética, como se observa en la ordenación de NMDS (**Figura 9**). Este resultado coincide con lo obtenido en las pruebas de Mantel parcial en donde se observa una correlación significativa del $r=0.24$ al comparar la diferencia en la composición del microbioma no ponderada (diversidad beta unweighted) contra la distancia geográfica de las localidades muestreadas y solo una correlación del $r=0.14$ al comparar la diferencia en la composición del microbioma contra la historia filogenética (**Tabla 6**). Esto indica que la localidad donde fue muestreado el individuo tiene un efecto sobre la composición del microbioma de la piel, pero que no podemos descartar el efecto que tiene la historia filogenética del individuo sobre la composición del microbioma. Este efecto en la composición del microbioma causado por la localidad donde fue muestreado el individuo, no se debe a las características macroclimáticas de la localidad, ya que las variables climáticas (a una escala de $\sim 1\text{km}^2$) no explican mucha de la diferencia entre los microbiomas ($r=0.004$ Tabla 6). Por lo que las diferencias en la composición del microbioma podrían deberse a características particulares de la localidad, las cuales no se tomaron en consideración en este estudio. Estas características pueden ser la vegetación típica de la localidad, el microclima, el tipo de suelo e inclusive el lugar en donde se encontraba la salamandra antes de ser colectada; ya sea debajo de troncos y su corteza o debajo de piedras. Un ejemplo de esto se observa en el trabajo realizado por Fitzpatrick y Allison (2014) en el cual

evaluaron la especificidad de bacterias asociadas a la piel de la salamandra terrestre *Plethodon jordani*, en comparación con las bacterias encontradas en las superficies de sus entornos inmediatos (troncos y piedras), de donde se colectó la salamandra. Ellos encontraron que a pesar que la composición del microbioma de la piel de las salamandras era significativamente diferente a las bacterias del entorno inmediato, la abundancia relativa se correlacionaba fuertemente. Por lo tanto, aunque las comunidades bacterias de la piel de salamandra son estadísticamente diferentes de aquellas en superficies inanimadas (troncos y piedras), no son totalmente distintas (Fitzpatrick & Allison, 2014).

En otros estudios realizados en anfibios (McKenzie *et al.*, 2012; Walke *et al.*, 2014), se observan patrones distintos en comparación a nuestro estudio. En los trabajos de McKenzie *et al.* y Walke *et al.* previamente mencionados, las comunidades bacterianas de la piel de los distintos anfibios se agrupan según la especie del individuo, seguido por un efecto de la localidad de donde fueron muestreados. Aquí, se observa un efecto filogenético más fuerte que en nuestro estudio en lo que se refiere a la composición del microbioma de la piel de los anfibios. Esto se debe a que las especies de anfibios que ellos usan en sus estudios son filogenéticamente menos relacionadas que las especies de salamandras utilizadas en nuestro estudio. Ellos comparan la composición del microbioma de la piel entre ranas y salamandras, y entre ranas de diferentes familias, mientras que en nuestro estudio la comparación se hace entre especies hermanas de salamandras de un solo género (**Figura 1**). Así entonces, al usar especies menos relacionadas entre sí (y morfológicamente más diferentes), esto provocaría que la señal filogenética fuera más fuerte.

Para determinar los factores que influyen la composición del microbioma en la piel de las salamandras, se realizaron matrices de distancia de cuatro diferentes factores: climatológicos, geográficos, filogenéticos y la diversidad beta del microbioma y se llevaron a cabo pruebas de Mantel parcial para ver la correlación entre cada una de estas matrices mientras se controla el efecto de una tercer variable. No se observó una correlación significativa al comparar la matriz de distancia de la diversidad beta weighted contra las matrices de distancia filogenética, climatológica y geográfica. Sin embargo al comparar la matriz de distancia de la diversidad beta unweighted contra la matriz de distancia filogenética, se observó una correlación débil, pero significativa del $r=0.14$, esta correlación disminuye a un $r=0.098$, pero sigue siendo significativa cuando se toma en cuenta el efecto de la distancia geográfica entre las localidades. Ya que solo se

observó una correlación al comparar la diversidad beta unweighted y no con la weighted, esto indica que las diferencias en la composición del microbioma en la piel de las salamandras de este estudio están dadas por la presencia de especies raras y no por la abundancia de los individuos de estas especies bacterianas diferentes. Como se mencionó anteriormente, el efecto filogenético en cuanto a la composición del microbioma en mi estudio es relativamente débil, esto es debido a la poca profundidad en la escala filogenética de nuestro estudio. Nuevamente se realizó una correlación entre la matriz de diversidad beta unweighted contra la matriz de distancia filogenética y tomando en cuenta el efecto del espacio geográfico entre las localidades, pero retirando del set de datos a los individuos de *P. leprosa*, la cual es la especie más alejada filogenéticamente de nuestro estudio (**Figura 1**). Se realizó esto con el fin de reducir aún más la profundidad de la escala filogenética de nuestro estudio. Se observó que la correlación fue mucho menor, solo del $r=0.042$, la cual no era significativa. Así entonces al disminuir aún más la profundidad de la escala filogenética, la señal que tiene la filogenia sobre la composición del microbioma disminuye. Estos resultados indican el nivel filogenético mínimo al cual podemos observar cambios en la composición del microbioma debido a la historia filogenética de los individuos hospedadores, al menos en estas especies de anfibios. Estos resultados son de suma importancia ya que nos pueden servir para diseñar futuros estudios en donde se tome en cuenta el efecto filogenético sobre la composición del microbioma.

Estas diferencias en la composición del microbioma explicadas por la historia filogenética entre las distintas especies de este estudio, pueden ser causadas por aspectos tanto físicos como aspectos del comportamiento particulares de cada especie de salamandra. Uno de los aspectos físicos que pueden estar determinando la composición del microbioma son los péptidos de la piel exudados por la salamandra. Es sabido que los anfibios son capaces de exudar péptidos antimicrobianos, los cuales pueden inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos, mientras que favorecen el crecimiento de otros. Además, estos péptidos antimicrobianos son diferentes según la especie del anfibio (Simmaco *et al.*, 1998; Rinaldi, 2002), por lo que las especies de salamandras muestreadas en este estudio podrían estar generando sus propios péptidos característicos de cada especie, lo cual modificaría la composición del microbioma de su piel. Otro factor que tiene una influencia en la composición del microbioma del hospedero es el contacto frecuente con inóculos potenciales del ambiente, como se observó en un estudio realizado por Fierre *et al.* (2008). En este estudio determinaron la composición del microbioma

de la palma de las manos de 51 personas adultas. Observaron que la composición bacteriana de la mano dominante (aquella usada con más frecuencia) y no dominante del mismo individuo fue significativamente diferente. Así entonces, las especies de salamandras que tengan más actividad en la superficie y por ende que su piel este en mayor contacto con inóculos potenciales del ambiente (hojarasca, rocas, troncos, etc), pueden tener una composición del microbioma diferente a aquellas especies con poca actividad en la superficie.

Si queremos elucidar con una mayor certidumbre si estos factores físicos y de comportamiento tienen una influencia significativa en la composición del microbioma, son necesarios otros estudios referentes a estos temas, como es la caracterización de los péptidos de la piel de estas especies de salamandras para así conocer su efecto en la composición del microbioma. Así mismo, también se requerirían estudios acerca del comportamiento de las distintas especies de este estudio y de las comunidades bacterianas del ambiente. Es importante conocer acerca de las bacterias del ambiente para poder inferir el cómo es que estas bacterias están modificando la composición bacteriana de la piel de las salamandras. En mi estudio observamos que los individuos de la especie *P. leprosa*, la cual es de amplia distribución, tuvieron una composición del microbioma distinta según si provenían del Estado de México o de Puebla-Veracruz. Inclusive las especies microendémicas mostraron diferencias en cuanto a la diversidad de bacterias en su piel, siendo los individuos colectados en los estados de Veracruz y Puebla aquellos que tendieron a tener más riqueza de especies bacterianas en su piel (**figura 8**).

A la fecha no se han reportado estudios acerca de la composición del microbioma de la piel de salamandras u otro anfibio en México. Sin embargo, las comunidades bacterianas detectadas en este estudio concuerdan con aquellas encontradas en estudios realizados con anfibios de América del Norte (McKenzie *et al.*, 2012; Walke *et al.*, 2014), Centroamérica (Belden *et al.*, 2015) y Asia (Sabino-Pinto *et al.*, 2016). Las bacterias que predominaron en la piel de las salamandras muestreadas en este estudio, fueron las Proteobacterias, Actinobacteria y Chlamydiae.

Es común encontrar Chlamydiae asociada a la piel de los anfibios de poblaciones silvestres como en cautiverio (Wilcke *et al.*, 1983; Blumer *et al.*, 2007; Fitzpatrick & Allison 2014), pero en la mayoría de los casos es en cantidades relativas bajas. En el presente estudio se detectó una gran composición de Chlamydia (de 68 a 96%) en la piel de cuatro individuos. Estos individuos se

colectaron en diferentes localidades, donde los demás individuos no tenían niveles tan altos de Chlamydia. Por eso, creemos que esta gran cantidad de Chlamydia es debido al hospedador en sí y no al hecho que existiera un brote de Chlamydia en las localidades donde se colectó el individuo. La cantidad relativa de Chlamydia entre todas las muestras fue del 12.2%, pero este valor está sesgado debido a los cuatro individuos que poseen una gran cantidad de Chlamydia en su piel. Al eliminar del set de datos estos cuatro individuos, la cantidad relativa de Chlamydia disminuye a un 7.0%.

Existen ciertas especies del género *Chlamydomphila*, específicamente *C. psittaci* y *C. pneumoniae*, que causan la enfermedad clamidiosis, la cual puede llegar a ser mortal (Martel *et al.*, 2012). Mediante los análisis de QIIME realizados en este estudio, no es posible identificar la especie de la bacteria, sin embargo ninguno de los individuos con Chlamydia en su piel, incluyendo a los cuatro individuos con grandes cantidades de Chlamydia, mostraron síntomas de la enfermedad clamidiosis, los cuales son: anorexia, letargia, edema y una marcha notablemente alterada (Martel *et al.*, 2012). Por supuesto, aunque no presenten esta enfermedad, es posible que los cuatro individuos con grandes cantidades de Chlamydia sean susceptibles a otras enfermedades de la piel causadas por microorganismos, como es la quitridiomycosis. La diversidad microbiana de la piel de estos cuatro individuos es muy baja, por lo que es probable que la diversidad de metabolitos producidos por estas bacterias, no sean suficientes para combatir enfermedades como la quitridiomycosis.

La enfermedad quitridiomycosis es causada por el hongo microscópico *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), la cual solo afecta a los anfibios, puede ser mortal y ha diezmando en gran medida distintas poblaciones de anfibios. Se han reportado géneros de bacterias que son capaces de inhibir el crecimiento del hongo patógeno Bd *in vitro*, como lo son: *Jantibacterium*, *Lysobacter*, *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Acitenobacter*, *Streptomyces*, *Chitinophaga* (Harris *et al.*, 2006; Loudon *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2014). Ya que se detectaron todos estos géneros de bacterias en la piel de las salamandras muestreadas en este estudio, hipotetizamos que las distintas poblaciones muestreadas podrían tener la posibilidad de resistir la infección de quitridiomycosis ante un posible brote del hongo patógeno Bd. Sin embargo, hay que tomar en consideración que hasta ahora solo se han hecho estudios *in vivo* con los géneros de bacteria

Jantinobacterium y *Lysobacter*, por lo que aún no se ha comprobado que los demás géneros de bacterias encontrados en este estudio sean capaces de inhibir el crecimiento del Bd en vivo.

Estas bacterias antifúngicas se encontraron en todas las localidades y especies de salamandras muestreadas, a excepción de *Chitinophaga* y *Lysobacter* las cuales fueron las menos comunes, con solo un 0.01% de abundancia relativa. El género *Acitenobacter* se encontró en todos los 47 individuos muestreados en este estudio, pero en una abundancia relativa pequeña, solo del 1.9%, este porcentaje corresponde a la abundancia promedio de los 47 individuos muestreados. Mientras que el género *Pseudomonas*, se encontró en 44 individuos, pero en una abundancia relativa alta, del 7.6%, siendo el tercer género más abundante de bacterias. La abundancia de estas bacterias antifúngicas, no está ligada a la especie o localidad donde fue colectada la salamandra. Uno de los factores al cual podría estar ligada la abundancia de estas bacterias antifúngicas es el grado de infección por el hongo Bd, como se demuestra en el trabajo de Muletz *et al.*, 2012. En este estudio realizaron bioaumentación con la bacteria antifúngica *Jantinobacterium lividum* con el fin de saber si esta bacteria podría inhibir el crecimiento de Bd en la especie de salamandra *Plethodon cinereus*. Ellos observaron que los individuos infectados con Bd, tenían mayor cantidad de la bacteria antifúngica *Jantinobacterium lividum* que aquellas salamandras las cuales no estaban infectadas por Bd.

Como se mencionó anteriormente, el hecho de que las salamandras de nuestro estudio tengan ciertos géneros de bacterias capaces de inhibir al hongo Bd en vitro, esto no es garantía que puedan inhibir su crecimiento en vivo. Por lo que se requeriría aislar estos géneros de bacterias antifúngicas y realizar estudios de bioaumentación con estas bacterias y las especies de salamandras muestreadas en este estudio, así como comprobar que estos géneros pueden producir metabolitos en contra del Bd, los cuales se saben que son de suma importancia en la protección de los hospedadores en contra de esta patógeno fúngico (Brucker *et al.*, 2008a, b). Otro punto a tomar en consideración es que la composición bacteriana de la piel de los anfibios, no es el único factor involucrado en la resistencia a la infección del Bd. Los péptidos de la piel exudado por el anfibio, sus costumbres, y la respuesta del sistema inmune del anfibio, como es la producción de antígenos en la piel, los cuales se transportan al bazo en donde ocurre una respuesta inmune que involucra a las células T y B (Robert & Ohta, 2009), son otros factores que contribuyen a la resistencia de la enfermedad quitridiomycosis. Por lo que más estudios referentes a este tema son

necesarios para asegurar que las poblaciones de salamandras muestreadas en este estudio son capaces de sobrevivir a una infección de Bd. Aunque no es de nuestro conocimiento si es que las salamandras de nuestro estudio tienen algún grado de infección de Bd, se tomó un frotis de la piel de la salamandra para realizar futuras pruebas de infección por Bd. El frotis se tomó de la parte ventral de la salamandra, ya que es la parte del cuerpo del anfibio en donde se observan con mayor grado la infección de Bd (Boyle et al., 2004). Es de importancia el considerar el estado de infección por Bd ya que al ser un hongo que se aloja en la piel del anfibio, la presencia de este patógeno podría estar afectando la composición del microbioma de la piel de las salamandras.

En resumen en este estudio se detectaron bacterias, las cuales se han reportado que son capaces de inhibir el crecimiento del Bd en salamandras de los estados de México, Puebla y Veracruz. Por supuesto la sola información de la presencia de estas bacterias reportadas como antifúngicas, no es suficiente para asegurar que las poblaciones de salamandras de este estudio sean capaces de sobrevivir a un brote del hongo patógeno Bd. Esta información marca una pauta para posibles trabajos de bioaumentación con estos géneros antifúngicos de bacterias, para así intentar mitigar el efecto negativo que podría tener el Bd en las poblaciones de salamandras en México. Además, podemos decir que el hecho de que ciertos individuos estén totalmente poblados por algún género de bacteria, el cual puede ser patógeno como es la *Chlamydia*, no significa que el individuo este enfermo, ya que nunca observamos síntomas aparentes de clamidiosis en ninguna de las salamandras con grandes cantidades de *Chlamydia* en su piel.

Por último, observamos que la historia filogenética tiene un efecto sobre la composición microbiana de la piel de las salamandras, pero que el factor que tuvo una mayor influencia sobre la composición del microbioma fue la distancia geográfica de los puntos de muestreo. Estos resultados fueron contrarios a lo que habíamos hipotetizado, pero esto se debe a que la escala filogenética que usamos en nuestro estudio es muy poca profunda, por lo que el efecto filogenético sobre la composición del microbioma es pequeño. Ya que ahora es de nuestro conocimiento la escala filogenética mínima a la cual se pueden encontrar diferencias en la composición del microbioma entre individuos de distintas especies, al menos en nuestro modelo de estudio, estos resultados son de importancia para diseñar futuros proyectos de microbioma los cuales tomen en consideración el aspecto filogenético.

7. CONCLUSIONES

- La historia filogenética del hospedador afecta la composición del microbioma, incluso después de tomar en cuenta la distancia geográfica entre los sitios de colecta.
- Las diferencias en la composición del microbioma son pequeñas pero la escala filogenética de este estudio es muy poco profunda.
- Las diferencias encontradas en la composición del microbioma se debieron a la presencia de especies bacterianas raras.
- Se necesitan más estudios para conocer el motivo y los efectos de la dominancia de la bacteria *Chlamydia* en el microbioma de la piel de algunos individuos.

8. BIBLIOGRAFIA

Anthony, C. D., J. A. Wicknick, et al. (1997). "Social interactions in two sympatric salamanders: effectiveness of a highly aggressive strategy." Behaviour **134**(1/2): 71-88.

Austin, R. M. (2000). Cutaneous microbial flora and antibiosis in plethodon ventralis. The biology of Plethodontid salamanders. R. C. Bruce, R. G. Jaeger and L. D. Houck. Boston, MA, Springer US: 451-462.

Bäckhed, F., R. E. Ley, et al. (2005). "Host-bacterial mutualism in the human intestine." Science **307**(5717): 1915-1920.

Blaser, M. J., Y. Chen, et al. (2008). "Does Helicobacter pylori protect against asthma and allergy?" Gut **57**(5): 561-567.

Bletz, M. C., A. H. Loudon, et al. (2013). "Mitigating amphibian chytridiomycosis with bioaugmentation: characteristics of effective probiotics and strategies for their selection and use." Ecology Letters **16**(6): 807-820.

Briggs, J. L. (1987). "Breeding Biology of the Cascade frog, Rana cascadae, with comparisons to R. aurora and R. pretiosa." Copeia **1987**(1): 241-245.

Bryson Jr, R. W. and B. R. Riddle (2012). "Tracing the origins of widespread highland species: a case of neogene diversification across the Mexican sierras in an endemic lizard." Biological Journal of the Linnean Society **105**(2): 382-394.

Bryson, R. W., R. W. Murphy, et al. (2011). "Evolutionary drivers of phylogeographical diversity in the highlands of Mexico: a case study of the Crotalus triseriatus species group of montane rattlesnakes." Journal of Biogeography **38**(4): 697-710.

Bystrykh, L. V. (2012). "Generalized DNA barcode design based on Hamming codes." PLoS ONE **7**(5): e36852.

Campbell, C. R., J. Voyles, et al. (2012). "Frog skin epithelium: electrolyte transport and chytridiomycosis." The international journal of biochemistry & cell biology **44**(3): 431-434.

Caporaso, J. G., J. Kuczynski, et al. (2010). "QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data." Nat Meth **7**(5): 335-336.

Caporaso, J. G., C. L. Lauber, et al. (2011). "Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(Suppl 1): 4516-4522.

Cole, J. R., Q. Wang, et al. (2009). "The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis." Nucleic Acids Research **37**(Database issue): D141-D145.

Costello, E. K., C. L. Lauber, et al. (2009). "Bacterial community variation in human body habitats across space and time." Science **326**(5960): 1694-1697.

Chakravorty, S., D. Helb, et al. (2007). "A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria." Journal of microbiological methods **69**(2): 330-339.

Chao, A. (1984). "Nonparametric estimation of the number of classes in a population." Scandinavian Journal of statistics: 265-270.

Davidson, E. W., M. Parris, et al. (2003). "Pathogenicity and transmission of chytridiomycosis in tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*)." Copeia **2003**(3): 601-607.

DeSantis, T. Z., P. Hugenholtz, et al. (2006). "Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB." Applied and Environmental Microbiology **72**(7): 5069-5072.

Duellman, W. E. a. L. T. (1994). "Biology of amphibians." Baltimore: The Johns Hopkins University Press: 670.

Easson, C. G. and R. W. Thacker (2014). "Phylogenetic signal in the community structure of host-specific microbiomes of tropical marine sponges." Frontiers in Microbiology **5**(532).

Eckburg, P. B., E. M. Bik, et al. (2005). "Diversity of the human intestinal microbial flora." Science **308**(5728): 1635-1638.

Edgar, R. C. (2004). "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput." Nucleic Acids Research **32**(5): 1792-1797.

Erwin, P. M., S. López-Legentil, et al. (2012). "A specific mix of generalists: bacterial symbionts in Mediterranean *Ircinia* spp." FEMS Microbiology Ecology **79**(3): 619-637.

Excoffier, L. and H. E. L. Lischer (2010). "Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows." Molecular Ecology Resources **10**(3): 564-567.

Ferrari, L., T. Orozco-Esquivel, et al. (2012). "The dynamic history of the Trans-Mexican Volcanic Belt and the Mexico subduction zone." Tectonophysics **522–523**: 122-149.

Fitzpatrick, B. M. and A. L. Allison (2014). "Similarity and differentiation between bacteria associated with skin of salamanders (*Plethodon jordani*) and free-living assemblages." FEMS Microbiology Ecology **88**(3): 482-494.

Gao, W., D. Navaroli, et al. (2013). "Microbe observation and cultivation array (MOCA) for cultivating and analyzing environmental microbiota." Microbiome **1**(1): 1-8.

Gómez-Tuena, A., C. H. Langmuir, et al. (2007). "Geochemical evidence for slab melting in the Trans-Mexican Volcanic Belt." Journal of Petrology **48**(3): 537-562.

Goslee, S. C. and D. L. Urban (2007). "The ecodist package for dissimilarity-based analysis of Ecological Data." 2007 **22**(7): 19.

Guarner, F. and J.-R. Malagelada (2003). "Gut flora in health and disease." The Lancet **361**(9356): 512-519.

Hanselmann, R., A. Rodríguez, et al. (2004). "Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in Venezuela." Biological Conservation **120**(1): 115-119.

Harris, R. N., R. M. Brucker, et al. (2009). "Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus." ISME J **3**(7): 818-824.

Hartman, A. L., S. Riddle, et al. (2010). "Introducing W.A.T.E.R.S.: a Workflow for the Alignment, Taxonomy, and Ecology of Ribosomal Sequences." BMC Bioinformatics **11**(1): 1-14.

Hijmans, R. J., S. E. Cameron, et al. (2005). "Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas." International Journal of Climatology **25**(15): 1965-1978.

Houck, L. D. and P. A. Verrell (1993). "Studies of courtship behavior in plethodontid salamanders: A review." Herpetologica **49**(2): 175-184.

Jackman, T., J. B. Losos, et al. (1997). Phylogenetic studies of convergent adaptive radiation in Caribbean Anolis lizards. Molecular Evolution and Adaptive Radiation. T. Givnish and K. Systma. Cambridge, Cambridge University Press: 535-557.

Janson, E. M., J. O. Stireman, et al. (2008). "Phytophagous insect-microbe mutualisms and adaptive evolutionary diversification." Evolution **62**(5): 997-1012.

Kim, O.-S., Y.-J. Cho, et al. (2012). "Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **62**(3): 716-721.

Kuczynski, J., C. L. Lauber, et al. (2012). "Experimental and analytical tools for studying the human microbiome." Nat Rev Genet **13**(1): 47-58.

Kueneman, J. G., L. W. Parfrey, et al. (2014). "The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages." Molecular Ecology **23**(6): 1238-1250.

Kusters, J. G., A. H. M. van Vliet, et al. (2006). "Pathogenesis of Helicobacter pylori Infection." Clinical Microbiology Reviews **19**(3): 449-490.

LeBlanc, J. G., J. E. Laiño, et al. (2011). "B-Group vitamin production by lactic acid bacteria – current knowledge and potential applications." Journal of Applied Microbiology **111**(6): 1297-1309.

Lederberg, M. A. (2001). "Ome sweet 'omics - A genealogical treasury of words genealogical Treasury of Words." Scientist **15**(7): 8.

Legendre, P. and M. Fortin. 1989. Spatial pattern and ecological analysis. *Vegetatio* 80:107-138.

Legendre, P. L., L. (1998). "Numerical ecology. Second english edition." Developments in Environmental Modelling: 20.

Longcore, J. E., A. P. Pessier, et al. (1999). "Batrachochytrium dendrobatidis gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians." Mycologia **91**(2): 219-227.

Lozupone, C. and R. Knight (2005). "UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities." Applied and Environmental Microbiology **71**(12): 8228-8235.

Lozupone, C., M. E. Lladser, et al. (2011). "UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison." The ISME Journal **5**(2): 169.

Mantel, N. (1967). "The detection of disease clustering and a generalized regression Approach." Cancer Research **27**(2 Part 1): 209-220.

McKenzie, V. J., R. M. Bowers, et al. (2012). "Co-habiting amphibian species harbor unique skin bacterial communities in wild populations." The ISME Journal **6**(3): 588-596.

Morgan, X. C. and C. Huttenhower (2012). "Chapter 12: Human microbiome analysis." PLoS Comput Biol **8**(12): e1002808.

Morris, E. K., T. Caruso, et al. (2014). "Choosing and using diversity indices: insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories." Ecology and Evolution **4**(18): 3514-3524.

Nicholson, J. K., E. Holmes, et al. (2012). "Host-gut microbiota metabolic interactions." Science **336**(6086): 1262-1267.

Oliver, K. M., A. H. Smith, et al. (2014). "Defensive symbiosis in the real world – advancing ecological studies of heritable, protective bacteria in aphids and beyond." Functional Ecology **28**(2): 341-355.

Parra-Olea, G., J. C. Windfield, et al. (2012). "Isolation in habitat refugia promotes rapid diversification in a montane tropical salamander." Journal of Biogeography **39**(2): 353-370.

Petranka, J. W. (1998). "Salamanders of the United States and Canada [Washington and London]." Smithsonian Institution Press.

Quast, C., E. Pruesse, et al. (2013). "The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools." Nucleic Acids Research **41**(Database issue): D590-D596.

Rideout, J. R., Y. He, et al. (2014). "Subsampled open-reference clustering creates consistent, comprehensive OTU definitions and scales to billions of sequences." PeerJ **2**: e545.

Rovito, S. M., G. Parra-Olea, et al. (2015). "Diversification and biogeographical history of Neotropical plethodontid salamanders." Zoological Journal of the Linnean Society **175**(1): 167-188.

Russell, J. A., N. Dubilier, et al. (2014). "Nature's microbiome: introduction." Molecular Ecology **23**(6): 1225-1237.

Schloss, P. D., S. L. Westcott, et al. (2009). "Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities."

Shannon, C. E. (1948). "A mathematical theory of communication." Bell System Technical Journal **27**(3): 379-423.

Skerratt, L. F., L. Berger, et al. (2007). "Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs." EcoHealth **4**(2): 125-134.

Sokal, PHA and Sneath, RR (1963), Principles of numerical taxonomy, San Francisco: W.H. Freeman.

Tamura, K. and M. Nei (1993). "Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees." Molecular Biology and Evolution **10**(3): 512-526.

Tilley, S. G. and J. Bernardo (1993). "Life history evolution in Plethodontid salamanders." Herpetologica **49**(2): 154-163.

Torsvik, V., F. L. Daae, et al. (1998). "Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments." Journal of Biotechnology **64**(1): 53-62.

Vo, A. T. E. and J. A. Jedlicka (2014). "Protocols for metagenomic DNA extraction and Illumina amplicon library preparation for faecal and swab samples." Molecular Ecology Resources **14**(6): 1183-1197.

Voyles, J., S. Young, et al. (2009). "Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines." Science **326**(5952): 582-585.

Wake, D. B. (1966). "Comparative osteology and evolution of the lungless salamanders, family Plethodontidae." Acad. Sci **4**: 1-111

Wake, D. B. (1987). "Adaptive radiation of salamanders in middle american cloud forests." Annals of the Missouri Botanical Garden **74**(2): 242-264.

Wake, D. B. (2012). "Taxonomy of salamanders of the family Plethodontidae (Amphibia: Caudata)." Zootaxa(3484): 75-82.

Wake, D. B., and J. A. Campbell (2001). "An aquatic plethodontid salamander from Oaxaca, Mexico." Herpetologica **57**: 509-514.

Wake, D. B., and J. F. Lynch (1976). "The distribution, ecology, and evolutionary history of plethodontid salamanders in tropical America." Sci. Bull **25**: 1-65.

Wake, D. B., and J. Hanken (1996). "Direct development in the lungless salamanders: what are the consequences for developmental biology, evolution and phylogenesis?" Int. J. Dev. Biol **40**: 859-869.

Walke, J. B., M. H. Becker, et al. (2014). "Amphibian skin may select for rare environmental microbes." ISME J **8**(11): 2207-2217.

World of Biology. McGrath, Kimberley A., ed. The Gale Group, Farmington Hills, MI: 1999

Zhang, J., K. Kobert, et al. (2014). "PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End read merger." Bioinformatics **30**(5): 614-620.

9. ANEXOS

Extracción de ADN

1. Al tubo PowerBead (provisto), añadir 0.25 gramos de muestra de suelo.
2. Realizar un vortex suave para mezclar.
3. Checar solución C1 antes de su uso. Si la solución C1 esta precipitada, calentar la solución a 60 °C hasta disolver.
4. Añadir 60 µl de solución C1 e invertir varias veces o realizar vortex brevemente.
5. Asegurar los tubos PowerBead horizontalmente usando el adaptador para vortex MO BIO Adapter tube holder (MO BIO Catalog # 13000-V1-24) o asegurar los tubos horizontalmente a una almohadilla de vortex plana con cinta. Realizar vortex a máxima velocidad por 10 minutos. Nota: si está usando el adaptador para vortex de 24 lugares para más de 12 muestras, incrementar el tiempo de vortex 5 – 10 minutos.
6. Asegurarse de que los tubos PowerBead roten libremente en la centrifuga sin fricción. Centrifugar los tubos a 10,000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente. PRECAUCION: Asegurarse de no exceder los 10,000 g o los tubos podrían romperse.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de colecta de 2 ml (provisto). Nota: Esperé un volumen de sobrenadante de 400 a 500 µl. El sobrenadante aún puede contener algunas partículas de suelo.
8. Añadir 250 µl de solución C2 y realizar vortex por 5 segundos. Incubar a 4 °C por 5 minutos.
9. Centrifugar los tubos a temperatura ambiente por 1 minuto a 10,000 x g.
10. Evitando el sedimento transferir hasta, pero no más, de 600 µl de sobrenadante a un tubo limpio de colecta de 2 ml (provisto).
11. Añadir 200 µl de solución C3 y realizar vortex breve. Incubar a 4°C por 5 minutos.
12. Centrifugar los tubos a temperatura ambiente por 1 minuto a 10,000 x g.
13. Evitando el sedimento, transferir hasta, pero no más, de 750 µl de sobrenadante a un tubo limpio de colecta de 2 ml (provisto).
14. Agitar para mezclar la solución C4 antes de usar. Añadir 1200 µl de solución C4 al sobrenadante y realizar vortex por 5 segundos.

15. Cargar aproximadamente 675 μ l a un filtro giratorio (provisto) y centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente. Desechar el filtrado y añadir nuevamente 675 μ l de sobrenadante al filtro giratorio y centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente. Cargar el sobrenadante restante al filtro giratorio y centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente. Nota: Un total de tres cargas por cada muestra procesada es necesario.
16. Añadir 500 μ l de solución C5 y centrifugar a temperatura ambiente por 30 segundos a 10,000 x g.
17. Descartar el filtrado.
18. Centrifugar nuevamente a temperatura ambiente por 1 minuto a 10,000 g x g.
19. Cuidadosamente poner los filtros giratorios en un tubo limpio de colecta de 2 ml (provisto). Evitar cualquier salpicadura de la solución C5 en el filtro giratorio.
20. Añadir 100 μ l de solución C6 al centro de la membrana blanca del filtro. Alternativamente, Agua estéril libre de ADN grado PCR puede usarse para la elución en este paso.
21. Centrifugar a temperatura ambiente por 30 segundos a 10,000x g.
22. Descartar el filtro giratorio. El ADN en el tubo ahora está listo para cualquier aplicación posterior. No más pasos son requeridos.

Preparación de librerías

Limpieza de amplicones con perlas SPRI

1. Realizar PCRs por triplicado y hacer un pool de 25 μ l por muestra (total 75 μ l).
2. Preparar una solución fresca de etanol al 80 % en un tubo Falcón de 50 ml.
3. Resuspender la solución de perlas SPRI en un tubo Falcón. Alicuotar el volumen requerido de la solución de perlas SPRI en un tubo Falcón y dejar reposar a temperatura ambiente por 30 minutos.
4. Alicuotar un volumen de 1.2 x de solución de perlas SPRI (solución de perlas a la proporción del volumen de muestra) por cada muestra.
5. Realizar vortex a 2000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar los tubos brevemente (2 segundos). Dejar reposar por 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Precipitar las perlas en un rack magnético por 3 minutos (o hasta que la solución se torne transparente).

7. Aspirar el sobrenadante (solución transparente) del tubo y descartarlo. Tratar de no tocar las perlas magnéticas.
8. Añadir 200 μ l de etanol al 80%. Incubar por 30 segundos.
9. Descartar el sobrenadante.
10. Añadir 200 μ l de etanol al 80%. Incubar por 30 segundos.
11. Descartar el sobrenadante. Remover las trazas de etanol con puntas de micropipeta.
12. Secar al aire por 10 minutos.
13. Remover los tubos del rack magnético y añadir 31 μ l de Tris-HCl 10 mM pH 8.
14. Realizar vortex por 1 minuto a 2000 rpm. Centrifugar los tubos brevemente (2 segundos) y dejar incubar por 2 minutos a temperatura ambiente.
15. Colocar los tubos en el rack magnético por 1 minuto o hasta que se precipiten totalmente las perlas magnéticas.
16. Transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 2 ml y almacenar a -20°C .

Pool amplicon into libraries

1. Cuantificar cada muestra mediante Qubit con ayuda de Qubit dsDNA High Sensitivity Assay PONER DATOS DEL KIT.
2. Formar las librerías a partir de las muestras ya purificadas en una concentración equimolar y de tal manera que cada librería contenga muestras con un barcode único.
3. De ser necesario repetir la limpieza con perlas SPRI para estandarizar el volumen de cada librería a 30 μ l en Tris-HCl 10 mM, pH 8.

End repair

1. Etiquetar tubos de 0.6 ml para la mezcla maestra.
2. Agitar todos los reactivos antes de su uso.
3. Por cada librería a preparar, en un tubo etiquetado de 0.6 ml, mezclar los siguientes componentes:

Reactivo	Volumen
Templado de ADN	30 μ l
10X End repair reaction buffer	10 μ l
End repair enzyme mix	5 μ l
Agua libre de nucleasas	55 μ l
Volumen total	100 μ l

4. Agitar brevemente la mezcla maestra.
5. Alicuotar 15 μ l de mezcla maestra en cada librería.
6. Agitar brevemente cada librería.
7. Incubar en una centrifuga fría por 30 minutos a 20 °C.

Limpieza con perlas SPRI

1. Añadir 300 μ l (3x) de solución de perlas SPRI a temperatura ambiente.
2. Realizar vortex a 2000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar por 2 segundos y dejar reposar por otros 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Colocar las librerías en el rack magnético por 3 minutos o hasta que las perlas se precipiten. Mientras tanto dejar que el buffer de de reacción A-tal se descongele en hielo.
4. Descartar el sobrenadante.
5. Añadir 400 μ l de etanol fresco al 80%. Incubar por 30 segundos.
6. Descartar el sobrenadante.
7. Añadir 400 μ l de etanol fresco al 80%. Incubar por 30 segundos.
8. Descartar el sobrenadante.
9. Dejar secar al aire por 10 minutos. Mientras tanto dejar temperar la solución de PEG/NaCl a temperatura ambiente.
10. Añadir 42 μ l de Triss.HCl 10 mM a pH 8.
11. Realizar vortex por 1 minuto a 2000 rpm. Incubar por otros 2 minutos a temperatura ambiente.

dA-Tail

1. Etiquetar tubos de 0.6 ml para la mezcla maestra.
2. Agitar todos los reactivos antes de su uso.
3. Por cada librería a preparar, en un tubo etiquetado de 0.6 ml, mezclar los siguientes componentes:

Reactivo	Volumen
ADN de terminación reparada	42 µl
Buffer de reacción NEBNext dA-Tailing (10X)	5 µl
Fragmento Klenow (3' - 5' exo)	3 µl
Volumen total	50 µl

4. Agitar brevemente la mezcla maestra.
5. Añadir 8 µl de mezcla maestra a cada librería.
6. Agitar brevemente cada librería.
7. Incubar por 30 minutos a 37 °C.

Limpieza con perlas SPRI

1. Añadir 110 µl (2.2x) de solución PEG/NaCl a cada librería.
2. Realizar vortex a 2000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar por 2 segundos y dejar reposar por otros 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Colocar las librerías en el rack magnético por 3 minutos o hasta que las perlas se precipiten. Mientras tanto dejar que el buffer de ligasa T4 DNA, el PEG-4000 y la mezcla adaptador de oligo se descongelen en hielo.
4. Descartar el sobrenadante.
5. Añadir 400 µl de etanol fresco al 80%. Incubar por 30 segundos.
6. Descartar el sobrenadante.
7. Añadir 400 µl de etanol fresco al 80%. Incubar por 30 segundos.
8. Descartar el sobrenadante.
9. Dejar secar al aire por 10 minutos.
10. Añadir 29.3 µl de Triss.HCl 10 mM a pH 8.

11. Realizar vortex por 1 minuto a 2000 rpm. Incubar por otros 2 minutos a temperatura ambiente.

Ligación del adaptador

1. Etiquetar tubos de 0.6 ml para la mezcla maestra.
2. Este procedimiento usa una tasa de 10:1 molar de adaptador por inserto de ADN.
3. Preparar la siguiente mezcla de reacción en hielo siguiendo este orden. Si se presenta un precipitado blanco en el buffer de ligasa T4 DNA después de descongelar, calentar el buffer a 37 °C y realizar vortex hasta disolver el precipitado. Ya que el PEG es altamente viscoso, realizar vortex a la mezcla maestra antes de añadir la ligasa T4 DNA y mezclar gentilmente después de eso.

Reactivo	Volumen	Concentración final
Muestra de ADN	29,3 µl	
Buffer ligasa T4 DNA, 10X	4 µl	1X
PEG-4000, 50%	4 µl	5%
Mezcla adaptador de oligo, 15 µM	[x µl]	10:1 molar de adaptador por inserto de ADN
ADN ligasa, 5U/ µl	1 µl	0.125 U/ µl
Agua libre de nucleasas	[x µl]	
Volumen total	40 µl	

4. Agitar brevemente la mezcla maestra.
5. Añadir 9 µl de mezcla maestra a cada librería.
6. Agitar brevemente cada librería.
7. Incubar por 30 minutos a 22 °C en una centrifuga fria.

Limpieza con perlas Sera-Mag

1. Añadir 10 µl de Triss-HCl 10 mM a pH 8 a cada librería.
2. Añadir 45 µl (0.9) de solución PEG/NaCl a cada librería.

3. Realizar vortex a 2000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar por 2 segundos y dejar reposar por otros 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Colocar las librerías en el rack magnético por 3 minutos o hasta que las perlas se precipiten. Mientras tanto dejar que el buffer de ligasa T4 DNA, el PEG-4000 y la mezcla adaptador de oligo se descongelen en hielo.
5. Descartar el sobrenadante.
6. Añadir 400 µl de etanol fresco al 80%. Incubar por 30 segundos.
7. Descartar el sobrenadante.
8. Añadir 400 µl de etanol fresco al 80%. Incubar por 30 segundos.
9. Descartar el sobrenadante.
10. Dejar secar al aire por 10 minutos.
11. Añadir 30 µl de Triss HCl 10 mM a pH 8.
12. Realizar vortex por 1 minuto a 2000 rpm. Incubar por otros 2 minutos a temperatura ambiente.
13. Colocar las librerías en el rack magnético por 4 minutos o hasta que las perlas se precipiten.
14. Transferir 29 µl de cada librería a un tubo nuevo de 0.6 ml previamente etiquetado. Almacenar a -20 °C.

Solución de perlas SPRI (Sera-mag)

1. Usar puntas con filtro estériles. Solución de perlas Sera-Mag:

Reactivo	Masa	Volumen
PEG-8000 (SIGMA 89510-250G)	9 g	8.30 ml
5 M NaCl	-	10 ml
1 M Tris-HCl, pH 8.0	-	500 µl
0.5 M EDTA, pH 8.0	-	100 µl
H2O Milli-Q esteril		30.1 ml
Tween-20 (100 %)		27.5 µl
Perlas lavadas Sera-Mag (ThermoScientific, 24152105050250)		1 ml
Total		50 ml

2. Añadir 9 g de PEG-8000 a un tubo Falcón de 50 ml.
3. Al polvo añadir NaCl, Tris-HCl, EDTA y el agua Milli-Q .
4. Agitar el tubo Falcón hasta disolver el PEG.
5. Añadir Tween-20 y mezclar apropiadamente.
6. Agitar la suspensión de perlas SeraMag hasta que no existan sedimentos visibles.
7. Transferir 1 ml de la suspensión de perlas a un tubo Eppendorf de 2 ml, precipitar las perlas en un rack magnético (MARCA DE RACK MAGNETICO) por 3 minutos o hasta que la suspensión se torne transparente. Remover el buffer de almacenamiento y lavar las perlas dos veces con 1 ml de Triss-EDTA (remover el tubo del rack magnético y realizar vortex). Resuspender las perlas en 1 ml de Triss-EDTA.
8. Añadir la suspensión de perlas lavadas a un tubo Falcón y mezclar inmediatamente. Envolver completamente el tubo en papel aluminio y almacenar a 4 °C.

Solución de PEG/NaCl

1. Usar puntas con filtro estériles. Solución de perlas Sera-Mag:

Reactivo	Masa	Volumen
PEG-8000 (SIGMA 89510-250G)	4.5 g	4.15 ml
5 M NaCl	-	5 ml
1 M Tris-HCl, pH 8.0	-	250 µl
0.5 M EDTA, pH 8.0	-	50 µl
H2O Milli-Q esteril		15.05 ml
Tween-20 (100 %)		13.75 µl
Perlas lavadas Sera-Mag (ThermoScientific, 24152105050250)		500 µl
Total		25 ml

2. Añadir 4.5 g de PEG-8000 a un tubo Falcón de 50 ml.
3. Al polvo añadir NaCl, Tris-HCl, EDTA y el agua Milli-Q .
4. Agitar el tubo Falcón hasta disolver el PEG.
5. Añadir Tween-20 y mezclar apropiadamente.
6. Añadir 500 µl de Triss-EDTA.
7. Mezclar bien. Envolver el tubo Falcón en papel aluminio y almacenar a 4 °C.

Adaptador	TruSeq	Secuencia del adaptador (5'-3')
AD01		GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC <u>ATCACG</u> ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
AD02		GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC <u>CGATGT</u> ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
AD03		GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA <u>CTTAGGC</u> ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
AD04		GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA <u>CTGACCA</u> ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
AD06		GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC <u>GCCAAT</u> ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
AD07		GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC <u>CAGATC</u> ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
AD08		GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC <u>ACTTGA</u> ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
AD09		GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA <u>CTAGCTT</u> ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
AD10		GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA <u>CTAGCTT</u> ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG

Tabla de Muestras de microbioma amplificadas y su concentración de ADN, cuantificadas con fluorímetro Qubit® 3.0, después de la purificación de productos así como las muestras que componen cada librería.

Id. muestra	Especie	Concentración de ADN en ng/μl	Librería
SMR2465	<i>P. longicauda</i>	6.7	1
SMR2493	<i>P. leprosa</i>	8.1	1
SMR2510	<i>P. leprosa</i>	8.9	1
SMR2508	<i>P. leprosa</i>	2.8	1
SMR2511	<i>P. leprosa</i>	13.5	1
SMR2490	<i>P. altamontana</i>	6.9	1
SMR2532	<i>P. melanomolga</i>	21.1	1
SMR2536	<i>P. leprosa</i>	11.2	1
SMR2496	<i>A. cephalica</i>	5.9	2
SMR2543	<i>P. melanomolga</i>	12.1	2
SMR2460	<i>P. longicauda</i>	11.5	2
SMR2467	<i>P. robertsi</i>	5.1	2
SMR2461	<i>P. longicauda</i>	14.3	2
SMR2509	<i>P. leprosa</i>	8.7	2
SMR2533	<i>P. leprosa</i>	18.8	2
SMR2539	<i>P. leprosa</i>	7.5	2
SMR2498	<i>C. orculus</i>	12.4	3
SMR2513	<i>P. cephalica</i>	8.2	3
SMR2464	<i>P. longicauda</i>	11.1	3
SMR2470	<i>P. robertsi</i>	3.4	3
SMR2463	<i>P. longicauda</i>	10.6	3
SMR2522	<i>P. leprosa</i>	9.8	3
SMR2536	<i>P. leprosa</i>	11.2	3
SMR2555	<i>P. gadovii</i>	7.2	3
SMR2516	<i>P. cephalica</i>	6.8	4
SMR2466	<i>P. robertsi</i>	13	4
SMR2478	<i>P. robertsi</i>	5.6	4
SMR2473	<i>P. robertsi</i>	4.8	4
SMR2469	<i>P. robertsi</i>	7.8	4
SMR2523	<i>P. leprosa</i>	10	4
SMR2537	<i>P. leprosa</i>	11.9	4
SMR2559	<i>P. leprosa</i>	3.4	4
SMR2518	<i>P. cephalica</i>	3.5	5
SMR2481	<i>P. robertsi</i>	9.6	5
SMR2486	<i>P. altamontana</i>	4.7	5
SMR2483	<i>P. leprosa</i>	4.1	5
SMR2471	<i>P. robertsi</i>	5.5	5

SMR2528	<i>P. leprosa</i>	14.4	5
SMR2544	<i>P. melanomolga</i>	6	5
SMR2560	<i>P. gadovii</i>	4.7	5
SMR2521	<i>C. orculus</i>	9	6
SMR2499	<i>P. altamontana</i>	10	6
SMR2488	<i>P. altamontana</i>	8.6	6
SMR2485	<i>P. leprosa</i>	11.3	6
SMR2474	<i>P. robertsi</i>	14.8	6
SMR2545	<i>P. melanomolga</i>	12.5	6
SMR2549	<i>P. gadovii</i>	11.1	6
SMR2561	<i>P. leprosa</i>	4.4	6
SMR2515	<i>P. cephalica</i>	7.5	7
SMR2500	<i>P. altamontana</i>	10.2	7
SMR2494	<i>P. altamontana</i>	9.7	7
SMR2489	<i>P. altamontana</i>	6.2	7
SMR2479	<i>P. leprosa</i>	21.8	7
SMR2495	<i>P. cephalica</i>	8.1	7
SMR2550	<i>P. gadovii</i>	13.4	7
SMR2562	<i>P. leprosa</i>	11.2	7
Ctrl-neg		-2.1	8
SMR2507	<i>P. leprosa</i>	19.1	8
SMR2506	<i>P. leprosa</i>	21.6	8
SMR2492	<i>P. altamontana</i>	8.3	8
SMR2484	<i>P. leprosa</i>	13.2	8
SMR2546	<i>P. melanomolga</i>	11.3	8
SMR2557	<i>P. gadovii</i>	12.4	8
SMR2563	<i>P. leprosa</i>	7.5	8
SMR2545	<i>P. melanomolga</i>	12.5	9
SMR2538	<i>P. leprosa</i>	15.1	9
SMR2543	<i>P. melanomolga</i>	13.9	9
SMR2554	<i>P. gadovii</i>	9	9
SMR2553	<i>P. leprosa</i>	13.5	9
SMR2556	<i>P. gadovii</i>	10.4	9
Ctrl-Perote		0.8	9
SMR2534	<i>P. leprosa</i>	6.6	10
SMR2542	<i>P. melanomolga</i>	7.2	10
SMR2512	<i>P. cephalica</i>	5.9	10
SMR2546	<i>P. melanomolga</i>	11.3	10
SMR2558	<i>P. leprosa</i>	6.7	10
SMR2489	<i>P. altamontana</i>	6.2	10
SMR2554	<i>P. gadovii</i>	9	10
Ctrl-Orizaba		1.1	10