



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE BIOLOGÍA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

EFFECTO DE ESTADIOS SUCESIONALES CONTRASTANTES DEL BOSQUE TROPICAL SECO SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA LLAMADA DE ANUNCIO DE *Smilisca baudinii* Y SU RELACIÓN CON LA FORMA DE LA CABEZA, LA DENSIDAD NEURONAL Y EL TAMAÑO DEL ÁREA PREÓPTICA HIPOTALÁMICA Y DE LA AMIGDALA MEDIAL

TESIS

QUE PRESENTA

RICARDO JOSUÉ PÉREZ HERNÁNDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. IRERI SUAZO ORTUÑO

Morelia, Michoacán, Febrero, 2017.



Agradecimientos

Hoy que tengo la oportunidad de ver los logros y las metas alcanzadas durante mi vida, debo reconocer que el camino no ha sido fácil, la dedicación constante y el saber han sido la tierra en la que hoy cosecho, pero los frutos que hoy brotan no son el legado único de la tierra que los nutre, el esfuerzo y apoyo de todos las personas que me han acompañado a lo largo del camino son el abono que llena de nutrientes la tierra en la que sembramos.

Por esto, agradezco Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado a través de la beca y el reconocimiento como estudiante de un programa del PNPC durante la duración del proyecto.

Al proyecto de CONACYT por financiar parte de las salidas de campo.

A SEP/CONACYT 2012, por el apoyo con el proyecto (179045) “Respuestas del socio-ecosistema del bosque tropical seco de la región de Chamela al Huracán Jova: un evento catastrófico infrecuente.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) por darme la formación académica como Maestro en Ciencias así como el apoyo para la participación en congresos.

Al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas de la UMSNH por la formación académica, el apoyo brindado para la asistencia a congresos y por la labor administrativa que facilito los tramites durante el periodo de la maestría.

A mi directora de tesis, Dra. Ileri Suazo Ortuño, quien ha dedicado su tiempo y conocimiento a encaminar el proyecto, también debo reconocer su gran apoyo en tiempos difíciles, que me ha enseñado que un verdadero científico no es el que más sabe, si no el curioso que ama el conocimiento, dedicado, crítico y honesto, capaz de escribir la verdad y compite por alcanzarla primero que nadie.

A mis sinodales, la Dra. Esperanza Meléndez, el M. C. Javier Alvarado, Dr. Jorge Schondube y Dr. Alejandro Salinas, que han aportado su conocimiento y tiempo para alcanzar el máximo potencial del proyecto, por que cada uno ha dejado parte de su esencia en mi formación.

A mis padres, Raquel Hernández y Ricardo Pérez, quienes me han mostrado que el camino al éxito aunque difícil de recorrer no es imposible, que la honestidad, humildad y dedicación son las herramientas para librar cualquier obstáculo y que cuando caiga siempre me podré levantar, sacudir el polvo y seguir adelante.

A mi hermano, Carlos Leví Pérez, quien me ha mostrado el valor de la lealtad y la competencia, quien siempre ha estado caminando a mi lado retándome a seguir y alcanzar mis metas.

Al Dr. Alejandro Salinas, un gran amigo y miembro sinodal del presente proyecto, por su apoyo en campo y en laboratorio, pero más aun por su amistad que me ha demostrado en las etapas difíciles, los consejos de vida que me ha dado siempre me acompañaran, me enseñó a reflexionar, hacer un examen de conciencia y que la auto crítica es un elemento básico en la labor científica.

A mis queridos compañeros de campo Yunuen, Jorge, Nataly, Barush y Ernesto, con los que pase momentos inolvidables llenos de alegría, gracias amigos, colegas y compañeros, ustedes me han mostrado que el trabajo en equipo es mejor y que el trabajo de un biólogo por pesado que sea siempre será placentero y que las diferencias de los miembros de un equipo son su fortaleza.

Finalmente a todas aquellas personas que de alguna manera han apoyado a la elaboración del presente proyecto, que gracias a su disposición hoy termina una parte importante en mi vida y formación académica, esto incluye a todos los que han formado parte de mi formación como persona y como Maestro en ciencias.

Contenido

Resumen	IX
Abstract.....	X
Introducción General.....	1
Literatura Citada	4
Capítulo I “Variación morfológica de la región cefálica de <i>S. baudinii</i> en estadios sucesionales contrastantes del Bosque Tropical Seco”	7
1.1. Introducción	7
1.2. Materiales y métodos	8
1.2.1. Área de estudio	8
1.2.2. Selección de los sitios de muestreo	9
1.2.3. Colecta de organismos.....	10
1.2.4. Obtención de imágenes	10
1.2.5. Procesamiento de imágenes.....	10
1.3. Resultados.....	13
1.4. Discusión.....	17
1.5. Conclusiones.....	19
1.6. Literatura Citada.....	19
Capítulo II “Variación de los núcleos cerebrales encargados de las vocalizaciones en <i>Smilisca baudinii</i> bajo estadios sucesionales contrastantes”	24
2.1. Introducción	24
2.2. Materiales y métodos	30
2.2.1 Tamaño y densidad neuronal	30
2.3. Resultados.....	33
2.3.1. Área Preóptica Hipotalámica (APO)	33
2.3.2 Núcleo Amigdalino Medial (AM)	34
2.4 Discusión	36
2.5 Conclusiones	36
2.6 Literatura Citada	37

Capítulo III “Estructura de la llamada de anuncio de la rana verde de árbol (Smilisca baudinni) en estadios sucesionales contrastantes y su relación con cambios morfológicos de la cabeza, la densidad neuronal y el tamaño del área Preóptica Hipotalámica y de la Amígdala Medial”	40
3.1. Introducción	40
3.2. Materiales y métodos	41
3.2.1 Colecta de organismos.....	41
3.2.2. Medidas Morfométricas	42
3.2.3. Descripción de la llamada de Anuncio de S. baudinii.....	42
3.2.4. Efecto del hábitat y la temporalidad sobre la estructura de la llamada de anuncio.....	44
3.2.5. Relación entre la estructura de la llamada de anuncio, la talla del cuerpo (LHC) y el tamaño de la región cefálica (TRC).....	44
3.2.6. Relación entre la estructura de la llamada de anuncio, el tamaño de los centros neurales y la densidad neuronal del APO y AM de S. baudinii	45
3.2.7. Relación entre la estructura de la llamada de anuncio, la morfometría corporal y cerebral de S. Baudinii.....	45
3.3. Resultados.....	46
3.3.1. Medidas Morfométricas	46
3.3.2. Descripción de la llamada de anuncio de S. baudinii	47
3.3.3. Efecto del hábitat y la temporalidad sobre la estructura de la llamada de anuncio.....	48
3.3.4. Relación entre la estructura de la llamada de anuncio, la talla del cuerpo (LHC) y el tamaño de la región cefálica (TRC).....	50
3.3.5. Relación entre la estructura de la llamada de anuncio, el tamaño de los centros neurales y la densidad neuronal del APO y AM de S. baudinii	53
3.3.6. Relación entre la estructura de la llamada de anuncio, la morfometría corporal y cerebral de S. baudinii	55
3.4. Discusión.....	56
3.5. Conclusiones	58
3.6. Literatura citada.....	59
Conclusión general	63

Figuras

Capítulo I “Variación morfológica de la región cefálica de *S. baudinii* en estadios sucesionales contrastantes del Bosque Tropical Seco”7

Figura 1. Ubicación geográfica de la Reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala (RBCHC).....9

Figura 2. Landmarks y semilandmarks ubicados en la región cefálica de *Smilisca baudinii*.....11

Figura 3. (a) Pgr y (b) LHC en mm de *S. baudinii* entre ambientes conservados y perturbados.....13

Figura 4. a) Superimposición de PROCUSTES que muestra la variación en la forma, entre los tratamientos, los círculos negros para el BM y las x azules para el PA. b) Gradilla de deformación que muestra la magnitud y dirección de la variación de cada marca establecida.....14

Figura 5. a) Análisis de función discriminante para la forma de la región cefálica de *S. Baudinii*, los círculos claros son para organismos de sitios con PA y los círculos negros son para los organismos del BM.....15

Figura 6. Tamaño de la región cefálica del BM y de los sitios con PA.....15

Figura 7. Análisis de regresión entre las coordenadas de forma y el tamaño de la región cefálica de *S. Baudinii*.....16

Capítulo II “Variación de los núcleos cerebrales encargados de las vocalizaciones en *Smilisca baudinii* bajo estadios sucesionales contrastantes”24

Figura 1. Regionalización cerebral de los núcleos asociados a las vocalizaciones en anuros, AC: Núcleo amigdalino central; MA: Amigdalino medio; LA: Amigdalino lateral; APO: Área pre-óptica hipotalámica TH: Tálamo y PB: Núcleo parabranchial.....28

Figura 2. Ruta sináptica de los centros neuronales que controlan el comportamiento vocal en anuros machos, CA: Núcleo amigdalino central, MA: Núcleo amigdalino medio, LA: Núcleo amigdalino lateral, APO: Área pre-óptica hipotalámica, PB: Núcleo parabranchial y IX & X: Neuronas motoras de los núcleos IX & X.....29

Figura 3. Imágenes tomadas del APO y AM con una resolución de 10x barra de escala de 50 μ ubicada en la esquina inferior derecha. a: Imagen del APO dentro del contorno negro y rodeando el tercer ventrículo. b: Imagen del AM dentro del contorno negro por debajo del ventrículo lateral derecho.....31

Figura 4. a) Imagen del APO b) imagen del AM ambas con gradillas de sorteo para cuantificar densidad neuronal de 400 x 600 μ a 10x.....32

Figura 5. a) Área total del APO donde se observa la diferencia en la varianza para cada condición y b) densidad de neuronas del APO por cada 50 μ^234

Figura 6. a) Área total del AM y b) densidad de neuronal del AM por cada 50 μ^235

Capítulo III “Estructura de la llamada de anuncio de la rana verde de árbol (*Smilisca baudinni*) en estadios sucesionales contrastantes y su relación con cambios morfológicos de la cabeza, la densidad neuronal y el tamaño del área Preóptica Hipotalámica y de la Amígdala Medial”40

Figura 1. Espectrograma de una grabación realizada para un individuo macho de *S. baudinii*. A) Grabación completa y sin depurar a una ventana de 45s, consta de varios elementos (múltiples intervenciones), en la parte superior en el eje “y” se puede observar la amplitud de onda a través del tiempo y en la parte inferior en el eje “y” se observa la frecuencia a través del tiempo. B) Espectrograma de una intervención completa, esta consta de varios cortes. C) Espectrograma de un corte, donde se puede observar la duración, frecuencia y amplitud.....43

Figura 2. ANOVA para las variables morfométricas. a) LHC (LHC), el BM presentó organismos de mayor talla; b) Tamaño de la región cefálica (TRC), los organismos más grandes pertenecen al BM; c) El BM del 2014 presentó los organismos más pesados; d) Factor de condición de Fulton (K), solo es diferente el BM del 2014 con el BM del 2015.....47

Figura 3. Representación de la amplitud de onda y espectrograma de frecuencia de la llamada de anuncio de *S. baudinii* a lo largo del tiempo dentro de una intervención en una ventana de 1.8 segundos.....48

Figura 4. ANOVA para las variables acústicas. a) $F\mu$, se registró baja frecuencia para el BM durante el periodo 2014; b) FD, es más alta en el periodo 2015; c) Tiempo, la llamada de anuncio de los organismos del 2014 fue de mayor duración que la de los organismos del PA del 2015; d) FF, fue mayor en el periodo 2014; e) FA, fue mayor en las zonas con PA del periodo 2015; f) Amplitud, fue mayor durante el periodo 2014.....49

Figura 5. Análisis de función discriminante donde se observa el agrupamiento de los organismos de acuerdo a la condición del hábitat en función de los valores dados para el canónico I y II del conjunto de variables acústicas, los círculos oscuros pertenecen al BM y los claros al PA.....50

Figura 6. Regresión lineal entre la $F\mu$ y la LHC de *S. baudinii*, los círculos oscuros pertenecen al BM y los círculos claros a los sitios con PA.....51

Figura 7. Regresión lineal entre la $F\mu$ y el tamaño de la región cefálica de *S. baudinii*, los círculos oscuros pertenecen al BM y los círculos claros a PA.....51

Figura 8. Regresión lineal entre la FA y la LHC de *S. baudinii*, los círculos oscuros pertenecen al BM y los círculos claros al PA.....52

Figura 9. Regresión lineal entre la FA y el tamaño de la región cefálica de *S. baudinii*, los círculos oscuros pertenecen al BM y los círculos claros al PA.....52

Figura 10. Análisis de función discriminante donde se observa el agrupamiento de los organismos de acuerdo a la condición del hábitat en función de los valores dados para el canónico I y II del conjunto de variables acústicas y morfométricas, los círculos oscuros pertenecen al BM y los claros al PA.....53

Figura 11. Regresión lineal entre el número de cortes por intervención y la densidad neuronal del AM de *S. baudinii*. Los círculos oscuros pertenecen al BM y los círculos claros al PA.....54

Figura 12. Análisis de función discriminante donde se observa el agrupamiento de los organismos de acuerdo al tratamiento en función de los valores dados para el canónico I y II del conjunto de variables acústicas y fisiológicas, los círculos oscuros pertenecen al BM y los claros al PA.....54

Figura 13. Análisis de función discriminante donde se observa el agrupamiento de los organismos de acuerdo a la condición del hábitat en función de los valores dados para el canónico I y II del conjunto de variables acústicas, morfométricas y cerebrales, los círculos oscuros pertenecen al BM y los claros al PA.....55

Cuadros

Capítulo I “Variación morfológica de la región cefálica de *S. baudinii* en estadios sucesionales contrastantes del Bosque Tropical Seco”.....7

Cuadro 1. Descripción y numeración de los puntos anatómicos (landmarks y semilandmarks) de la región cefálica de *S. baudinii*.....11

Capítulo II “Variación de los núcleos cerebrales encargados de las vocalizaciones en *Smilisca baudinii* bajo estadios sucesionales contrastantes”.....24

Cuadro 1. Promedios de tamaño de los núcleos y de la densidad neuronal, entre el BM y las zonas con PA. Den.AM= Densidad neuronal de la amígdala medial en $50\mu^2$, Den.APO= Densidad neuronal del área preóptica hipotalámica en 50μ33

Capítulo III “Estructura de la llamada de anuncio de la rana verde de árbol (*Smilisca baudinni*) en estadios sucesionales contrastantes y su relación con cambios morfológicos de la cabeza, la densidad neuronal y el tamaño del área Preóptica Hipotalámica y de la Amígdala Medial”.....40

Cuadro 1. Variables acústicas de la llamada de anuncio de *S. baudinii* y Comparación entre el BM y las zonas con PA.....48

Resumen

Sin duda la llamada de anuncio de los anuros es uno de los elementos más conspicuos que poseen, esta es empleada para la selección de pareja durante la época de reproducción así como en la competencia macho-macho. Esto hace que la llamada de anuncio sea un elemento determinante en la adecuación de los organismos y al mismo tiempo un blanco fácil de selección. Este atributo ha evolucionado bajo las condiciones naturales que presentan los bosques en los que habitan, por lo que modificaciones en el hábitat pueden reflejarse en la estructura de la llamada de anuncio. El presente estudio se enfocó en caracterizar la llamada de anuncio de la rana *Smilisca baudinii* bajo estadios sucesionales contrastantes del bosque tropical seco, y la relación entre la estructura de la llamada de anuncio con la morfología de la región cefálica, así como la morfometría corporal y cerebral de los individuos. Para ello se grabaron las vocalizaciones de un total de 33 organismos durante el periodo de Agosto-Septiembre del 2014 y Agosto-Septiembre 2015; 15 provenientes del bosque maduro (BM) y 18 de las zonas con perturbación antropogénica (PA). De los 33 individuos, 10 se utilizaron para la extracción y estudio de los centros cerebrales asociados a las vocalizaciones (área preóptica hipotalámica y núcleo amigdalino medial). Se obtuvieron variables corporales como peso (Pgr), longitud hocico cloaca (LHC) y tamaño de la región cefálica de los 33 individuos. De los cerebros de los 10 individuos se obtuvieron las variables cerebrales: tamaño y densidad neuronal del área preóptica hipotalámica y del núcleo amigdalino medial. Las variables acústicas evaluadas para los 33 individuos fueron: frecuencia dominante (FD), frecuencia media ($F\mu$), frecuencia de mayor amplitud (FA), frecuencia fundamental (FF), amplitud, tiempo y número de cortes por intervención. Se encontró que *S. baudinii* es una especie que presenta una llamada de anuncio simple de una sola nota que se repite constantemente con un promedio de 6.1 ± 1.66 pulsos por intervención y que dura 362.88 ± 79.3 ms, con una FD de 1.816 ± 0.879 kHz. Al comparar la estructura de la llamada de anuncio de *S. baudinii* entre los tratamientos mediante un análisis de función discriminante, se observan dos grupos claramente definidos, el del BM y el de las zonas con PA, con tan solo el 16.6% de organismos mal clasificados. La FA fue la variable que mejor explicó el agrupamiento, con una $P < 0.05$. Así mismo se observó que la LHC tuvo una asociación negativa con la $F\mu$ ($R^2 = -0.215$, $P < 0.05$) y la FA $R^2 = -(0.246$, $P < 0.05)$, decreciendo conforme aumenta la LHC. Estas mismas variables acústicas presentaron una tendencia similar con el tamaño de la región cefálica ($R^2 = -0.429$ y $R^2 = -0.196$, $P < 0.05$ respectivamente). Por otro lado, solo la densidad neuronal del núcleo amigdalino medial mostró una relación positiva con el número de pulsos por intervención ($R^2 = 0.449$, $P < 0.05$). Al comparar todas las variables acústicas, cerebrales y morfométricas de los individuos provenientes del BM con el de las zonas con PA mediante un análisis de función discriminantes, se observaron dos grupos claramente definidos, sin ningún organismo mal clasificado. La LHC seguida de la $F\mu$ fueron las variables más explicativas ($P < 0.05$). Con esto se puede concluir que la llamada de anuncio es un elemento complejo cuyo factor de variación está asociado a los atributos morfológicos de los organismos por tipo de hábitat. Individuos del BM fueron de mayor talla y Pgr con llamadas de anuncio de baja frecuencia y alta intensidad en comparación con los individuos de las zonas con PA.

Palabras clave: Llamada de anuncio, Anuros, Bioacústica, perturbación, Bosque tropical seco.

Abstract

Undoubtedly the call of advertisement of the anurans is one of the most conspicuous elements they possess, this is used for the selection of couple during the breeding season as well as in the male-male competition. This makes the advertisement call a determining factor in the adequacy of the organisms and at the same time an easy target for selection. This attribute has evolved under the natural conditions of the forests in which they inhabit, so that modifications in the habitat can be reflected in the structure of the advertisement call. The present study focused on characterizing the advertisement call of the *Smilisca baudinii* frog under contrasting successional stages of the dry tropical forest, and the relationship between the structure of the advertisement call and the morphology of the cephalic region, as well as the body morphometry and Of individuals. For this purpose, the vocalizations of a total of 33 agencies were recorded during the period August-September 2014 and August-September 2015; 15 from mature forest (WB) and 18 from areas with anthropogenic disturbance (PA). Of the 33 individuals, 10 were used for the extraction and study of the brain centers associated with vocalizations (preoptic hypothalamic area and medial tonsillar nucleus). Body variables such as weight (Pgr), cloaca snout length (LHC) and cephalic region size of the 33 individuals were obtained. From the brains of the 10 individuals we obtained the brain variables: neuronal size and density of the hypothalamic preoptic area and the medial tonsillar nucleus. The acoustic variables evaluated for the 33 subjects were: dominant frequency (FD), mean frequency (F_{μ}), higher amplitude frequency (FF), fundamental frequency (FF), amplitude, time and number of cuts per intervention. It was found that *S. baudinii* is a species that presents a simple announcement call of a single note that is constantly repeated with an average of 6.1 ± 1.66 pulses per intervention and that lasts 362.88 ± 79.3 ms, with an FD of $1,816 \pm 0.879$ kHz . When comparing the structure of the ad call of *S. baudinii* between the treatments by means of a discriminant function analysis, two clearly defined groups are observed, the WB and the areas with PA, with only 16.6% of bad organisms Classified. The AF was the variable that best explained the grouping, with a $P < 0.05$. It was also observed that the LHC had a negative association with the F_{μ} ($R^2 = -0.215$, $P < 0.05$) and the FA $R^2 = - (0.246$, $P < 0.05)$, decreasing with increasing LHC. These same acoustic variables presented a similar tendency with the size of the cephalic region ($R^2 = -0.429$ and $R^2 = -0.196$, $P < 0.05$ respectively). On the other hand, only the neuronal density of the medial tonsillar nucleus showed a positive relation with the number of pulses per intervention ($R^2 = 0.449$, $P < 0.05$). When comparing all the acoustic, cerebral and morphometric variables of the individuals coming from the WB with those of the BP zones through a discriminant function analysis, two clearly defined groups were observed, without any organism that was not classified. LHC followed by F_{μ} were the most explanatory variables ($P < 0.05$). With this we can conclude that the advertisement call is a complex element whose variation factor is associated to the morphological attributes of organisms by habitat type. WB individuals were of larger size and Pgr with low frequency and high intensity ad calls compared to individuals in areas with BP.

Key words:Advertisement call, Anurans, Bioacoustics, Perturbation, Dry tropical forest.

Introducción General

Múltiples factores intervienen en la supervivencia y adecuación de los organismos, uno de los principales es el estado de conservación del hábitat en el que se encuentran, ya que este es el que proporciona los recursos necesarios para su supervivencia y desarrollo (Pough et al., 1977; Urbina-Cardona y Reynoso, 2011). Dentro de los trabajos más comunes para evaluar el efecto de la perturbación antropogénica sobre las especies animales se encuentran aquellos que describen cambios en la estructura de las comunidades o en los atributos funcionales de las especies (Vallan, 2002; Suazo-Ortuño et al., 2007; Suazo-Ortuño, 2009; Wanger et al., 2009; Orea-Gadea, 2010; Hayes, et al., 2010). Otros trabajos han abordado este tema desde la perspectiva de los atributos individuales, es decir, desde la respuesta fisiológica o morfológica de los individuos (Bucio, 2012). En este sentido la tolerancia de las especies a la perturbación antrópica del hábitat está dada por la capacidad que tienen los individuos de enfrentar cambios en el ambiente mediante diferentes estrategias, ya sea a través de modificaciones morfológicas (plasticidad fenotípica) o fisiológicas (remodelar su fisiología interna) para compensar cambios en el ambiente. Esta capacidad se define como la capacidad de un gen de expresar un fenotipo diferente que responde a las condiciones externas del ambiente (Carabio, 2011). La plasticidad fenotípica está ampliamente distribuida en la naturaleza, tiene múltiples manifestaciones y puede conferir resiliencia a las especies para enfrentar la perturbación del hábitat (Seebacher et al., 2015).

Los anfibios y en particular los anuros tienen la capacidad de responder rápidamente a cualquier cambio en el hábitat, incluyendo aquellos ocasionados por las perturbaciones humanas (Carabio, 2011), por ejemplo, en el caso de la rana pico de pato (*D. spatulata*) se han reportado cambios en la forma de la cabeza en respuesta a la sucesión secundaria del bosque (Orozco, 2012). En la actualidad la intensidad y la velocidad en la que las actividades humanas han transformado los ecosistemas, han puesto en riesgo a las especies de anfibios, perdiendo no solo su gran diversidad, sino que al mismo tiempo el papel que juegan en los ecosistemas (Lavilla, 2001; Bosch, 2007). Por lo que aquellos trabajos que pretendan conservar y mantener especies deberán enfocarse en

mantener y proteger los procesos que regulan las poblaciones naturales, principalmente la reproducción. En el caso particular de los anuros, la reproducción se presenta estacionalmente, coincidiendo generalmente con la época de lluvias. Esta se da de forma grupal y en ella las vocalizaciones emitidas por los machos juegan el papel principal, debido a que estas no solo le permiten a la hembra identificar la ubicación del macho, sino que también le permiten identificar a miembros de su especie, así como evaluar cual es el mejor macho del coro (Salthe y Mechan, 1974; Augusto et al., 2008). Dichas vocalizaciones han evolucionado para transmitirse bajo condiciones naturales, sin embargo, actualmente estas condiciones son cada vez más escasas y es común encontrar grupos de anuros emitiendo vocalizaciones en grandes claros antropizados. Esto puede tener consecuencias directas sobre la llamada de anuncio durante el cortejo y en consecuencia sobre el éxito reproductivo (Tomaszycki y Adkins-Regan, 2005; Augusto, 2007).

En el caso específico de los anuros, se ha observado que aquellos individuos que se desarrollan en hábitats con estadios tempranos de sucesión presentan niveles más bajos en el índice de condición corporal, en comparación con aquellos que se desarrollan en hábitats con estadios de sucesión tardía o en vegetación primaria (Pérez, 2013), lo que puede tener efectos directos en la adecuación de los mismos, en particular con la búsqueda de pareja y la emisión de vocalizaciones, ya que de acuerdo con estudios previos, las vocalizaciones de varios grupos de anuros están directamente relacionadas con el tamaño de los individuos, de tal manera que individuos grandes emiten vocalizaciones graves y los individuos pequeños emiten vocalizaciones agudas (Gindras et al., 2012). Así mismo, de acuerdo a experimentos previos las hembras tienen preferencia por machos de mayor talla con cantos de baja frecuencia (Ryan, 1980) Por otro lado, estudios recientes proponen que los individuos tienen la capacidad de responder de diferente forma (por ejemplo, fisiológicamente) a los cambios en el hábitat. Los organismos reciben señales físicas y químicas del medio que los rodea, estos tomarán y procesarán dichas señales mediante el sistema nervioso, el cual se encargará de traducir la información de las señales externas en señales neuroendocrinas que regulan los cambios en la fisiología y morfología del individuo (Ball, 1993) dando como resultado un gran número de

respuestas asociadas a los cambios en el ambiente. En el caso de la rana pico de pato (*Diaglena spatulata*), especie simpátrica de la rana verde de árbol (*Smilisca baudinii*), se ha documentado que existen cambios en el tamaño de las regiones cerebrales, particularmente del área preóptica hipotalámica (APO) y el núcleo amigdalino medial (AM), como respuesta a las condiciones del ambiente y en consecuencia pudieran tener efecto sobre las vocalizaciones y el éxito reproductivo (Bucio, 2012). Así mismo se ha reportado que la morfometría geométrica de la región cefálica de la rana *Diaglena spatulata* cambia de acuerdo al grado de perturbación del hábitat (Orozco, 2012). Por lo que se espera que este cambio en respuesta a la perturbación se refleje también en la estructura de las vocalizaciones al ser comparadas entre diferentes grados de perturbación. De tal forma que el presente estudio pretende establecer como modelo de estudio a la rana verde de árbol *Smilisca baudini* para evaluar si las vocalizaciones son estructuralmente diferentes bajo diferentes condiciones del ambiente (sitios perturbados vs sitios conservados) y éstas vocalización tienen relación con la densidad neuronal y el tamaño de los núcleos cerebrales de las áreas APO y AM, así como con la morfometría craneal.

Literatura Citada

- Augusto, S. R. 2007. Influencia da heterogeneidade ambiental na diversidade de, uso de hábitat e bioacústica de anuros de área aberta no noroeste paulista. Tesis de Maestría. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista. 94 pp.
- Augusto, S. R., I. A. Martins, D. D. C. Rossa-Feres. 2008. Bioacústica e sítio de vocalização em taxocenoses de anuros de área aberta no noroeste paulista. *Biota Neotropica* 8 (3): 123-134.
- Ball, G. F. 1993. The neural integration of environmental information by seasonally breeding birds. *American Zoology* 33: 185–199.
- Bosh J. 2007. Declive de los anfibios. *El ecologista* 54: 46-48.
- Bucio, P. F. E. 2012. Variaciones morfológicas del área preóptica hipotalámica y de la amígdala medial en la rana macho de la especie *Diaglena spatulata*, y su relación con la sucesión secundaria del bosque tropical seco en la región de Cuixmala-Chamela, Jalisco. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 39 pp.
- Carabio, F. M. M. 2011. Plasticidad fenotípica inducida por competencia en larvas de *Hypsiboas pulchellus*. Informe de pasantía. Facultad de ciencias. Universidad de la República. 27pp.
- Gindras, B., M. Boeckle, C. T. Herbst y W. T. Fitch. 2012. Call acoustics reflect body size across four clades of anuran. *Journal of Zoology* 289 (2): 143-150.
- Hayes T. B., P. Falso, S. Gallipea y M. Stice. 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *The Journal of Experimental Biology* 213: 921-933
- Lavilla E. O. 2001. Amenazas, declinaciones poblacionales y extinciones en anfibios argentinos. *Cuadernos de herpetología* 15 (1): 59-82.

- Orea-Gadea, J. 2010. Efecto de plantaciones mixtas sobre la diversidad herpetofaunística en selva baja caducifolia de Sierra de Huautla, Morelos. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Morelos, México. 45pp.
- Orozco, R. J. D. 2012. Morfometría geométrica de la región cefálica de la rana pico de pato (*Diaglena spatulata*) en diferentes estadios sucesionales del bosque tropical seco en la Región de Chamela-Cuixmala, Jalisco, México. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 43pp.
- Pérez, H. R. J. 2013. Efecto de diferentes grados de perturbación en la comunidad de anfibios del municipio de Lázaro Cárdenas, Michoacán. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 48pp.
- Pough, F. H., M. M. Stewart y R. G. Thomas. 1977. Physiological basis of habitat partitioning in Jamaican *Eleutherodactylus*. *Oecologia* 27: 285-293.
- Ryan, M. J. 1980. Female mate choice in a neotropical frog. *Science* 209 (4455): 523-525.
- Salthe, S. N. y J. S. Mechan. 1974. Reproductive and courtship patterns. In: B. Lofts (Ed.), *Physiology of the Amphibia*. Academic Press, New York: 310-522.
- Seebacher, F., C. R. White, y C. E. Franklin. 2015. Physiological plasticity increases resilience of ectothermic animals to climate change. *Nature Climate Change* 5 (1): 61-66.
- Suazo-Ortuño, I., J. Alvarado-Díaz, E. Raya-Lemus y M. Martínez-Ramos. 2007. Diet of the marbled toad (*Bufo marmoratus*) in conserved and disturbed tropical dry forest. *The Southwestern Naturalist* 52 (2): 305-309.
- Suazo-Ortuño, I. 2009. Efecto de la conversión del bosque tropical caducifolio a mosaicos agrícolas sobre ensamblajes herpetofaunísticos. Tesis Doctoral.

Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Tomaszycki, M. L., y Adkins-Regan, E. 2005. Experimental alteration of male song quality and output affects female mate choice and pair bond formation in zebra finches. *Animal Behaviour*, 70(4): 785-794.

Urbina-Cardona, J. N. y V. H. Reynoso. 2011. Descripción y modelado del microhábitat de los anfibios y reptiles que habitan la selva alta perennifolia de los Tuxtlas. In: V. H. Reynoso. y R. I. Coates (Eds), Avances y perspectivas en la investigación de los Bosques Tropicales y sus alrededores: la región de Los Tuxtlas. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 355-384.

Vallan D. 2002. Effects of Anthropogenic Environmental Changes on Amphibian Diversity in the Rain Forests of Eastern Madagascar. *Journal of Tropical Ecology* 18 (5): 725-742.

Wanger, T. C., A. Saro, D. T. Iskandar, B. W. Brook, N. S. So- Dhi, Y. Clough y T. Tscharntke. 2009. Conservation value of cacao agroforestry for amphibians and reptiles in South-East Asia: combining correlative models with follow-up field experiments. *Journal of Applied Ecology* 46: 823-832.

Capítulo I “Variación morfológica de la región cefálica de *S. baudinii* en estadios sucesionales contrastantes del Bosque Tropical Seco”

1.1. Introducción

Diversos estudios enfocados a explicar lo que ocurre dentro de las poblaciones animales concuerdan en que el ambiente es un factor determinante, ya que este es el que provee los recursos necesarios (alimento, espacio, refugio, etc.) a los individuos durante su desarrollo (Carabio, 2011). Por lo que se espera, que aquellos individuos presentes en ambientes con altos grados de perturbación tengan un desarrollo diferente, asociado a las condiciones particulares de cada sitio (Palacio y Rodríguez, 2007). Diversos estudios han demostrado que la variación en la calidad del hábitat se refleja directamente en los atributos morfológicos de distintas especies (Castellano y Giacoma, 2000; Gómez-Hoyos y González-Maya, 2014). Encontrándose normalmente individuos de mayor talla en las zonas favorables.

Para el caso de los anfibios se ha documentado que la perturbación del hábitat modifica el tipo y la calidad de recursos (Cortés-Gómez et al., 2013). En consecuencia, esta variación en la disponibilidad y calidad de los recursos podría tener un efecto sobre las poblaciones, en particular sobre su morfología (Orozco, 2012). Recientemente se ha demostrado que las poblaciones de anfibios de sitios perturbados son morfométricamente distintos a los de sitios conservados, con cabezas más redondeadas en los sitios conservados (Orozco, 2012; Gómez-Hoyos y González-Maya, 2014), sin embargo estos resultados no han demostrado ser definitivos, ya que existe muy poca información previa que sustente estos resultados.

En este sentido, la morfometría geométrica que tradicionalmente se ha empleado para identificar taxonómicamente a las especies con base en caracteres poco variables, se ha convertido en una herramienta que ayuda a cuantificar dicha variación en términos de forma y tamaño, permitiendo comparar las poblaciones provenientes de diferentes hábitats (Baraquet et al., 2012). Éste método ha permitido asociar la forma de regiones corporales con el tipo de hábitat, por lo que para el caso particular de los anfibios puede ser una

herramienta eficiente, que refleje el efecto de las condiciones del hábitat en donde se desarrollan los individuos. Para la región de Chamela, Jalisco, se ha documentado a partir del uso de la morfometría geométrica que la forma de la región cefálica de la rana arborícola *D. spatulata* tiende a formas triangulares en hábitats perturbados, mientras que en hábitats más conservados la tendencia es hacia formas circulares (Orozco, 2012). Por lo que podría esperarse que especies simpátricas y filogenéticamente relacionadas respondan de manera similar a la perturbación del hábitat. El presente estudio tiene como objetivo evaluar mediante el uso de la morfometría geométrica si la rana verde de árbol *S. baudinii* también presenta variación morfológica de la región cefálica asociada a la perturbación antropogénica del hábitat.

1.2. Materiales y métodos

1.2.1. Área de estudio

El presente trabajo se llevó a cabo dentro y fuera de la Reserva de la Biosfera de Chamela-Cuixmala en el municipio de la Huerta, Jalisco. La reserva se ubica al suroeste del estado en los 19°30' N y 105°03' O (Fig. 1) y tiene una superficie aproximada de 13,142 hectáreas, rodeada por ejidos dedicados principalmente a actividades agrícolas (INE, 2014). Presenta una altitud que varía de los 0 msnm hasta los 500 msnm (DOF, 1994; Ceballos et al., 1999). La región presenta un clima tropical, cálido sub-húmedo de menor humedad, con una marcada estacionalidad. La época de secas se presenta en los meses de noviembre a junio, con algunas lluvias ligeras o fuertes en diciembre y enero, y la época de lluvias durante los meses de julio a octubre. La precipitación promedio anual oscila entre 748 mm en la región Chamela y 782 mm en la región Cuixmala, la temperatura promedio anual es de 24.9° C con una mínima promedio de 22.4°C y máxima promedio de 27.3°C (Ceballos et al., 1999). La vegetación cercana a la costa está compuesta por manglar, manzanillera, vegetación riparia, carrizal, vegetación acuática, vegetación de dunas costeras y pastizales, el resto por selva baja caducifolia y en menor proporción selva mediana subperenifolia (DOF, 1994; Ceballos et al., 1999). Siendo estos últimos los componentes principales de la reserva.

Dentro de la reserva se han registrado un gran número de taxa. De estos 444 especies son vertebrados terrestres y 110 de vertebrados acuáticos (Orozco, 2012). Para el caso específico de la herpetofauna, se han registrado 19 especies de anfibios y 65 de reptiles, las cuales pertenecen a 12 géneros, 5 familias de anfibios y 56 géneros y 22 familias de reptiles, lo que corresponde al 8.4% de la herpetofauna mexicana y al 19% de las 444 especies de vertebrados registrados para la zona (Flores Villela, 1991; Smith y Smith, 1993; Ramírez Bautista, 1994; García y Ceballos 1994; García y Valtierra, 1996a; Garcia y Valtierra, 1996b). Las principales actividades que se realizan en la zona de influencia de la reserva, son la agricultura y ganadería, además de aquellas destinadas al turismo (García y Ceballos, 1994). Dentro de las actividades agrícolas se cultivan diversas frutas y legumbres como papaya, plátano, mango, sandía, melón, calabaza, maíz, coco, sorgo, cebolla, chile y frijol (Ceballos et al., 1999).



Figura1. Ubicación geográfica de la Reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala (RBCHC).

1.2.2. Selección de los sitios de muestreo

El estudio se llevó a cabo en la selva baja caducifolia de la región de Chamela, Jalisco en sitios ubicados dentro y fuera de la Reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala. Fuera de la reserva se seleccionaron tres sitios con

perturbación antropogénica (PA) y tres sitios dentro de la Reserva en el bosque maduro (BM).

1.2.3. Colecta de organismos

Para el muestreo de los organismos se realizaron recorridos nocturnos durante la temporada de lluvias, de agosto a septiembre del 2014 y de agosto a septiembre del 2015. El muestreo se realizó mediante el método de búsqueda intensiva por encuentro visual en cada una de las tres replicas correspondientes a cada tratamiento, hasta tener una muestra mínima de 15 organismos por tratamiento.

Únicamente se muestrearon y recolectaron machos adultos que se encontraron vocalizando. Cada vez que un organismo fue localizado, éste se capturó, fotografió, se pesó con una báscula analítica digital y se midió con un vernier digital con una precisión de 0.02 mm.

1.2.4. Obtención de imágenes

A cada individuo capturado se le tomó una fotografía digital de alta resolución que sirvió de base para los análisis morfométricos. La obtención de imágenes se realizó con una cámara de alta resolución marca Panasonic®, modelo Lumix FZ-40 de 14.1 mega pixeles, la cual fue colocada sobre un soporte universal evitando así errores causados por el movimiento. Además todas las fotografías fueron tomadas a la misma altura sobre una hoja de papel milimétrico y con una etiqueta que incluyó el número de individuo y el sitio de colecta.

1.2.5. Procesamiento de imágenes

De acuerdo con el método propuesto por Orozco (2012), las fotografías se procesaron con el programa MakeFan (Sheets, 2001), el cual permite colocar líneas radiales a intervalos de espacio igual sobre la fotografía.

Una vez que las fotografías fueron procesadas, se colocó un abanico sobre la región cefálica. Las imágenes se almacenaron en carpetas como archivo tps mediante el programa tpsUTIL, las cuales se cargaron en el programa tpsDig (Rohlf, 2010), donde se llevó a cabo la colocación de los puntos anatómicos y se

determinaron los puntos homólogos de la región cefálica de *S. baudinii* (Cuadro 1, Fig. 2).

Cuadro 1. Descripción y numeración de los puntos anatómicos (landmarks y semilandmarks) de la región cefálica de *S. baudinii*.

Número de landmark	Descripción
1	Landmark localizado entre las narinas en la región supra labial de la cabeza.
2,8	Landmarks ubicados sobre las narinas.
6,12	Landmarks localizados sobre la región óptica posterior.
7,13	Landmarks sobre la región timpánica anterior
3,4,5,9,10,11	Semilandmarks sobre la curvatura de la cabeza en la región supra labial

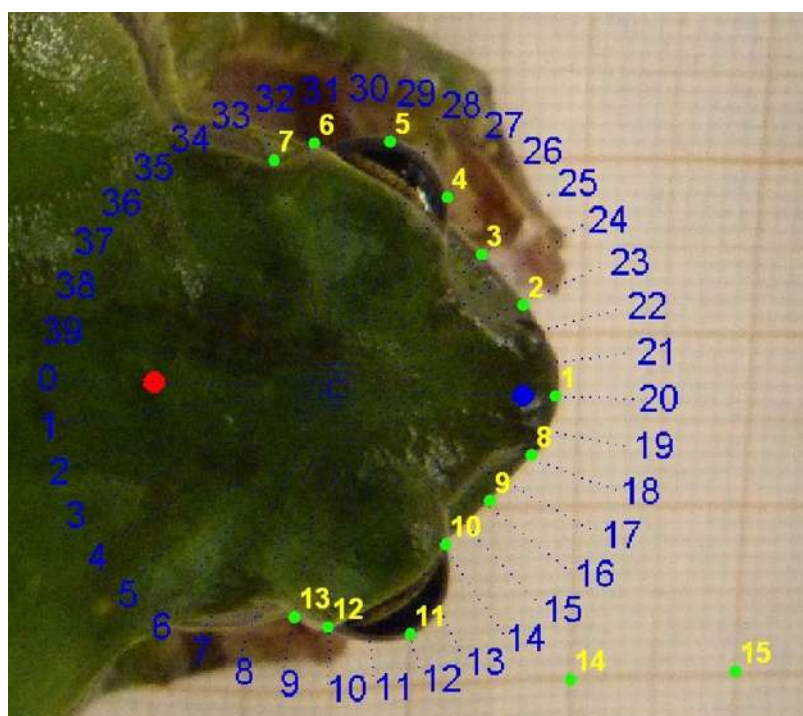


Figura 2. Landmarks y semilandmarks ubicados en la región cefálica de *Smilisca baudini*.

Después de determinar los puntos homólogos, estos, se alinearon con el método de superposición de Procrustes, el cual consiste en otorgar un valor cartesiano a cada punto para la determinación de landmarks y semilandmarks. Este análisis se basa en un enfoque multivariado que permite analizar las configuraciones geométricas mediante la suma de mínimos cuadrados. Para el

análisis de la variación morfológica de la región cefálica se realizaron gradillas de deformación por tipo de hábitat. Posteriormente con las coordenadas geométricas dadas por la superimposición de procustes para cada individuo, se aplicó un análisis de función discriminante mediante el paquete estadístico JMP 9.01 (SAS Institute 2010), el cual permite clasificar la variación formando grupos (BM y PA) se comparó la forma de la región cefálica para ambas poblaciones (Menéndez y Pérez, 2011; Orozco, 2012). Para evaluar si la forma de la región cefálica de *S. baudinii* está asociada al tamaño se realizó una regresión múltiple entre las coordenadas de forma y de tamaño de la región cefálica de *S. baudinii* (JMP 90.01; SAS Institute 2010). Para probar diferencias en la longitud hocico cloaca (LHC), peso (Pgr) y tamaño de la región cefálica (TRC) medido con el método de superposición de Procustes se utilizaron pruebas de t de studens para muestras pareadas con el paquete estadístico JMP 9.01 (SAS Institute, 2010a).

1.3. Resultados

Se obtuvo una muestra de 33 organismos fotografiados, 15 del BM y 18 de zonas con PA. Se observó que tanto en el Pgr como en la LHC los individuos de zonas con PA y del BM fueron diferentes. El Pgr promedio de los individuos del BM=16.3090±3.48771gr y el Pgr promedio de los individuos de zonas con PA=13.9412±2.91742gr ($p=0.0241$; Fig.3a) y la LHC promedio del BM= 62.40±3.86mm y PA= 59.23± 3.39mm ($p= 0.0103$; Fig. 3b). No se observaron diferencias entre los individuos del BM y los sitios con PA en la forma de la región cefálica de acuerdo con la Superimposición de Procrustes (Fig. 4a), aunque las gradillas de deformación mostraron que los landmarks con mayor variación son los que se encuentran ubicados en las narinas (Fig. 4b).

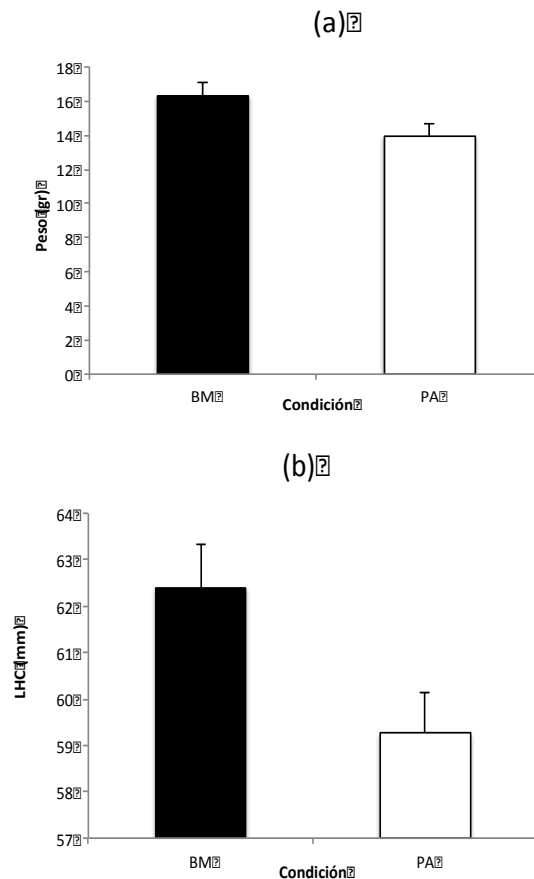


Figura 3. (a) Pgr y (b) LHC en mm de *S. baudinii* entre ambientes conservados y perturbados.

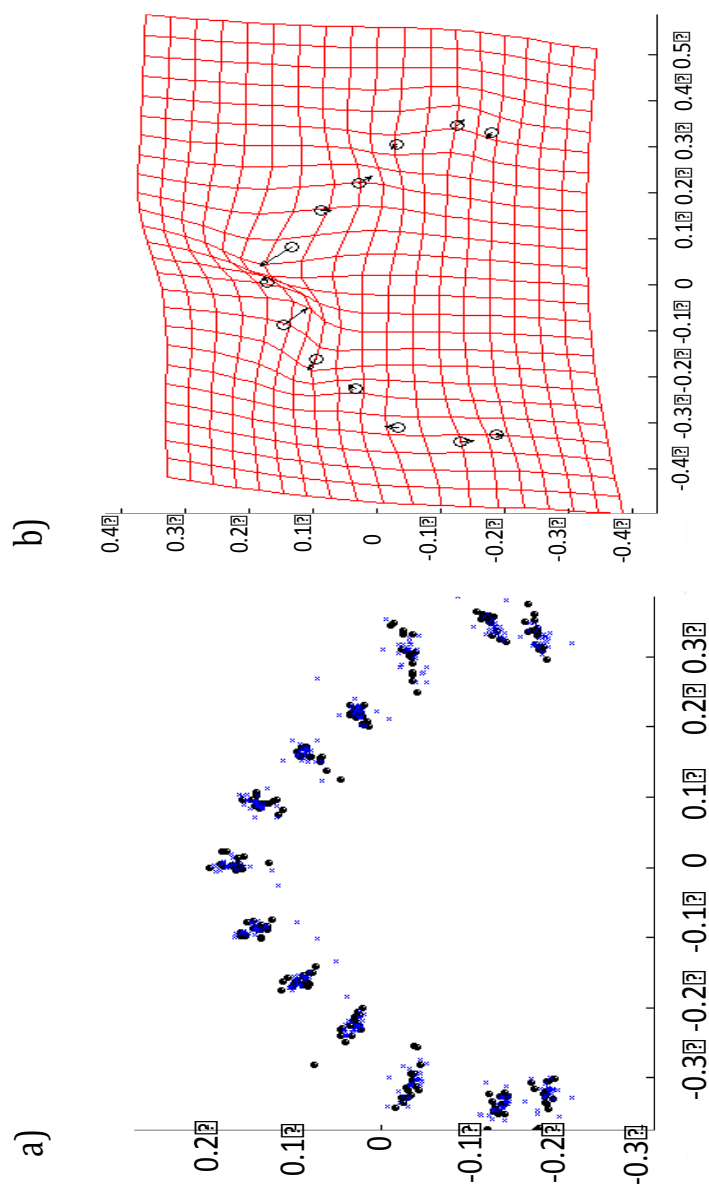


Figura 4. a) Superimposición de PROCUSTES que muestra la variación en la forma, entre los tratamientos, los círculos negros para el BM y las x azules para el PA. b) Gradilla de deformación que muestra la magnitud y dirección de la variación de cada marca establecida.

El análisis de función discriminante mostró una diferencia marginal en la forma de la región cefálica entre los individuos de sitios con PA y los individuos del BM ($p= 0.0536$; Fig. 5). Sin embargo el tamaño de la región cefálica de *S. baudinii* si mostró diferencias significativas al ser comparada entre los dos tratamientos $BM=27.94 \pm 3.4$ y $PA=24.75 \pm 2.02$ ($p=0.0011$; Fig. 6).

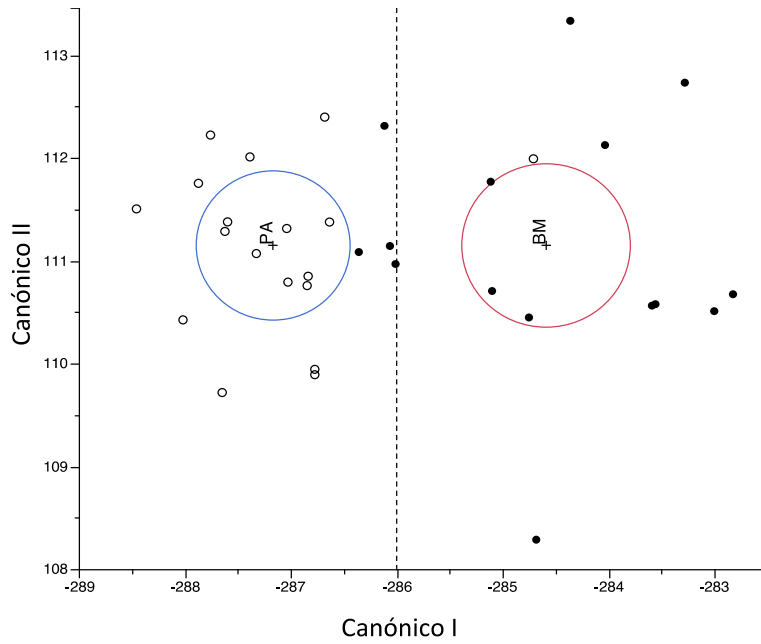


Figura 5. a) Análisis de función discriminante para la forma de la región cefálica de *S. baudinii*, los círculos claros son para organismos de sitios con PA y los círculos negros son para los organismos del BM.

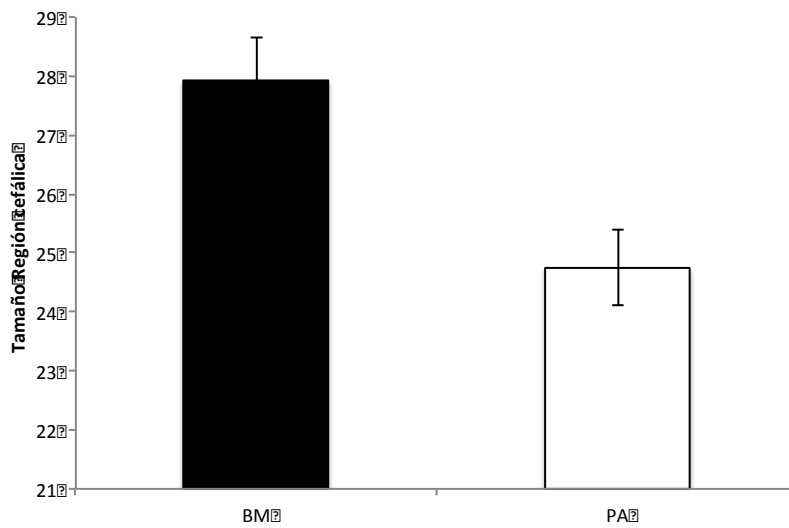


Figura 6. Tamaño de la región cefálica del BM y de los sitios con PA

El análisis de regresión lineal entre el tamaño y la forma de la región cefálica de *S. baudinii* mostró una relación negativa dando una $R^2=0.166845$ con una $p= 0.0183$ que responde a la siguiente ecuación: Forma= $-0.3024 - 0.0048673*TRC$ (Fig. 7).

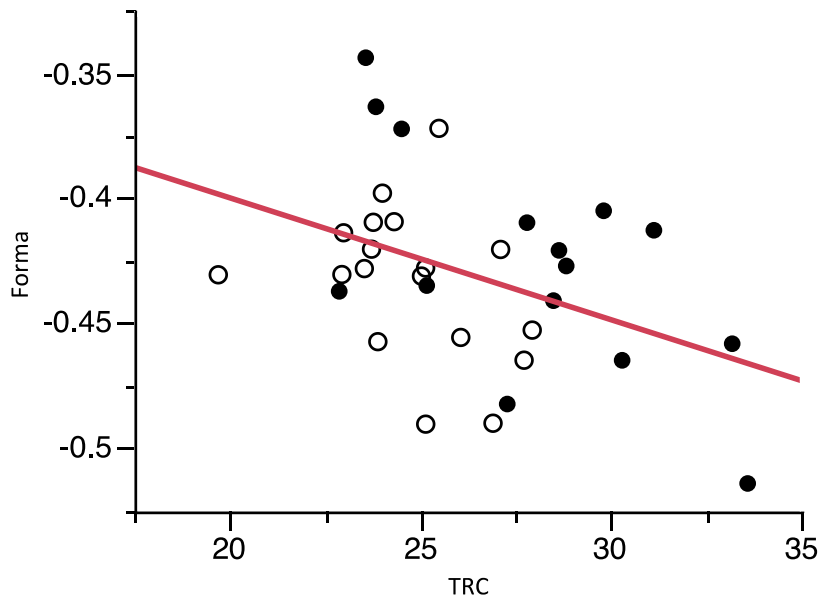


Figura 7. Análisis de regresión entre las coordenadas de forma y el tamaño de la región cefálica de *S. Baudinii*.

1.4. Discusión

La forma de los organismos ha resultado ser un buen parámetro para evaluar el efecto del estrés ambiental al que se enfrentan durante su desarrollo (Cano, 2011; Orozco, 2012; Rodríguez *et al.*, 2013). Se ha documentado que cuando las poblaciones se enfrentan a condiciones desfavorables del ambiente puede ocurrir variación en la forma de la cabeza de los individuos (Gonzalez *et al.*, 2011; Lazick *et al.*, 2015; Sholts *et al.*, 2015). La cabeza está involucrada en múltiples y relevantes actividades ecológicas y sociales como la alimentación, cortejo, defensa del territorio y uso de hábitat (Kalionsopoulou *et al.*, 2012) por lo que es un blanco fácil de selección (Lazić *et al.*, 2015). En el caso de la rana *S. baudin* los resultados de este estudio mostraron que existe una diferencia marginal en la forma de la cabeza entre los individuos del BM y los individuos de los sitios con PA. Esta diferencia marginal se debe a un individuo de los sitios con PA que presenta características similares a los del BM, ya que al excluirlo del análisis de función discriminante se observan diferencias significativas y dos grupos bien definidos ($P=0.0017$). Por lo que nuestros resultados concuerdan en parte, con lo reportado por Orozco (2012) para la misma región de Chamela, Jalisco, quien al evaluar el efecto de los estadios sucesionales del Bosque Tropical Seco (BTS), encontró que las hembras de *Diaglena spatulata* presentaron variación morfológica en la región cefálica entre los estadios sucesionales del BTS, con un mayor ensanchamiento hacia la región posterior de la cabeza (implicando un tamaño mayor de la cabeza), conforme se avanzó en los años de abandono del bosque. Este mismo patrón se observó en el presente estudio, ya que los individuos de *S. baudini* también presentaron cabezas más redondas y grandes en el BM. De acuerdo con el mismo autor, la variación en la forma y tamaño de la cabeza puede ser resultado de la plasticidad fenotípica de las especies. Por ejemplo se ha reportado un alto grado de plasticidad fenotípica en larvas de anfibios expuestas a diferentes gradientes de coberturas de dosel (Buskirk, 2009). Además de presentar cabezas más grandes y redondas en el BM, los individuos de *S. baudinii* también presentaron mayor tamaño y peso que los individuos de sitios con PA. De acuerdo con Lazick *et al.* (2015) conforme los individuos se vuelven más grandes, su forma cambia de acuerdo con ciertas reglas alométricas, por lo que factores ambientales como la

temperatura o nutrición, pueden directamente afectar el crecimiento, causando alteraciones en las trayectorias alométricas que pueden manifestarse en la relación entre tamaño y forma, lo cual podría servir como una medida de inestabilidad en el desarrollo (Pfennig, 1990; Álvarez y Nicieza, 2002). Se ha reportado que la calidad y disponibilidad de los recursos varía entre zonas conservadas y zonas perturbadas, y que en etapas larvarias esta variación es un factor determinante en la talla a la que se metamorfosean los anuros (Pfennig, 1990). Debido a que los organismos de los sitios con PA fueron de menor tamaño y peso que los del BM podría ser que estas diferencias se deban a la variación en la calidad y disponibilidad de recursos que hay entre los dos tratamientos. En este sentido, una explicación probable de las diferencias observadas en la talla y peso de los organismos entre los tratamientos, es que el volumen de las charcas y la velocidad de desecación alteren el tiempo a la metamorfosis y en consecuencia la talla y peso de los metamorfos (Pacheco y García, 2014; Fan *et al.*, 2014), ya que el desarrollo de los anfibios en áreas con estacionalidad marcada está directamente relacionado al ciclo hidrológico de la región, siendo la estacionalidad de los cuerpos de agua un factor determinante (cuerpos de agua de larga temporalidad vs cuerpos de agua de corta temporalidad), por lo que aquellos organismos que nacen en charcas de corta temporalidad tenderán a desarrollarse en menor tiempo y con menor tamaño (Denver *et al.*, 1998; Kiesecker y Skelly, 2001). Por lo que, en el caso de los cuerpos de agua de los sitios con PA que están expuestos a una mayor incidencia de luz solar podrían evaporarse más rápidamente, reduciéndose a mayor velocidad el volumen y el tamaño de las charcas, comprometiendo en consecuencia, el tamaño de las larvas a cambio de la supervivencia y teniendo como resultado una metamorfosis prematura y organismos de menor talla (Maciel y Junca, 2009; Montealegre, 2013). Los cambios observados tanto a nivel de peso y talla de los organismos, así como en la forma y tamaño de la cabeza entre los individuos de los sitios con PA y los sitios de BM resultan interesantes ya que podrían estar indicando que la plasticidad fenotípica que presenta esta especie puede estar favoreciendo su presencia en los sitios perturbados, ya que estudios previos en la misma zona de estudio la reportan como una especie con mayor abundancia en los sitios perturbados que en el BM (Suazo-Ortuño *et al.* 2018, Suazo-Ortuño *et al.* 2015).

1.5. Conclusiones

Los organismos de mayor talla y peso se encontraron en el BM, así como los que presentaron cabezas más grandes y redondeadas. Las diferencias al comparar la LHC, el Pgr y el tamaño de la región cefálica de *S. baudinii* entre las zonas de BM y las zonas con PA pueden ser un reflejo de la diferencia en la calidad del hábitat entre los dos tratamientos. Al excluir del análisis el organismo perteneciente a las zonas con PA que presenta atributos característicos del BM, la morfometría craneal para la especie de estudio resultó ser un buen indicador de la condición del hábitat, mostrando dos poblaciones morfológicas bien definidas y con pocos organismos mal clasificados. Adicionalmente la relación que se encontró entre el tamaño de la región cefálica y la forma de la cabeza sugiere que la forma de esta región está también influenciada por el tamaño.

1.6. Literatura Citada

- Baraquet, M., P. R. Grenat, N. E. Salas y A. L. Martino. 2012. Variación morfométrica y geográfica entre poblaciones de *Hypsiboas cordobae* (Anura: Hylidae) en Argentina. *Research Journal of the Costa Rican Distance Education University* 4(2): 147-155.
- Buskirk, J. V. 2009. Natural variation in morphology of larval amphibians: Phenotypic plasticity in nature?. *Ecological Monographs* 79(4): 681-705.
- Calle, D. A., M. L. Quiñones, H. F. Erazo y N. Jaramillo. 2008. Discriminación por morfometría geométrica de once especies de Anopheles (*Nyssorhynchus*) presentes en Colombia. *Biomedica* 28: 371-385.
- Cano-Otalvaro, J. 2011. Caracterización morfométrica de *Anadara tuberculosa* y *A. similis* en la costa pacífica colombiana. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad del Valle. 99pp.
- Carabio F. M. M. 2011. Plasticidad fenotípica inducida por competencia en larvas de *Hypsiboas pulchellus*. Informe de pasantía. Facultad de ciencias. Universidad de la República. 27pp.
- Castellano, S. y C. Giacoma. 2000. Morphometric and advertisement call geographic variation in polyploid green toads. *Biological Journal of the Linnean Society* 70: 341-360.

- Ceballos G, Székely A, García A, Rodríguez P, Noguera F. 1999. Programa de manejo de la Reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala. México DF (México): Instituto Nacional de Ecología SEMARNAP 142pp.
- Cortés-Gómez, M. A, F. Castro-Herrera y J. N. Urbina-Cardona. 2013. Small changes in vegetation structure create great changes in amphibian ensembles in the Colombian Pacific rainforest. *Tropical Conservation Science* 6 (6): 749-769.
- Denver, R. J., N. Mirhadi y M. Phillips. 1998. Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis: response of *Scaphiopus hammondi* tadpoles to habitat desiccation. *Ecology* 79(6): 1859-1872.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 1994. Decreto por el que se declara área natural protegida con carácter de reserva de la biosfera, la región conocida como Chamela-Cuixmala, ubicada en el municipio de La Huerta, Jalisco. *Gaceta Ecológica* 6: 56-64.
- Flores-Villela, O. 1991. Análisis de la distribución de la herpetofauna de México. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de México. 269p.
- García, F. J. y E. Sánchez-González. 2013. Morfometría geométrica craneal en tres especies de roedores arborícolas neotropicales (Rodentia: Cricetidae: *Rhipidomys*) en Venezuela. *Therya*. 4(1): 157-178.
- García, A y G. Ceballos. 1994. Guía de campo de los anfibios y reptiles de la costa de Jalisco, México. Instituto de biología. Universidad Nacional Autónoma de México 184pp
- García, A y M. Valtierra-Azotla. 1996a. *Ficimia publia* (Blotched Hooknose Snake). *Herpetological Review*. 27: 88p.
- García, A y M. Valtierra-Azotla. 1996b. *Sibon annuliferus* (Western Snail-eating Snake). *Herpetological Review*. 27: 89p.
- Gómez-Hoyos, D. A. y J. F. González-Maya. 2014. Condición corporal de machos de *Oophaga pumilio* (Anura: Dendrobatidae) en relación con elementos del hábitat en la Estación Biológica La Selva, Sarapiquí, Costa Rica. *Revista Biodiversidad Neotropical* 4(1): 16-20.
- Gonzalez, P. N., E. E. Oyhenart y B. Hallgrímsson. 2011. Effects of environmental perturbations during postnatal development on the

- phenotypic integration of the skull. *Journal of Experimental Zoology* 316B(8): 547-561.
- Kaliontzopoulou, A., D. C. Adams, A. van der Meijden, A. Perera, y M. A. Carretero. 2012. Relationships between head morphology, bite performance and ecology in two species of *Podarcis* wall lizards. *Evolutionary Ecology* 26(4): 825-845.
- Kiesecker, J. M. y D. K. Skelly. 2001. Effects of disease and pond drying on gray tree frog growth, development, and survival. *Ecology* 82(7): 1956-1963.
- Lazić, M. M., M. A. Carretero, J. Crnobrnja-Isailović y A. Kaliontzopoulou. 2015. Effects of environmental disturbance on phenotypic variation: an integrated assessment of canalization, developmental stability, modularity, and allometry in lizard head shape. *The American Naturalist* 185(1), 44-58.
- Fan, X. L., Z. H. Lin y J. Wei. 2014. Effects of hydroperiod duration on developmental plasticity in tiger frog (*Hoplobatrachus chinensis*) tadpoles. *Zoological Research* 35 (2): 124-131.
- Maciel T. A. y F. Junca. 2009. Effects of temperature and volume of water on the growth and development of tadpoles of *Pleurodema diplolister* and *Rhinella granulosa* (Amphibia: Anura). *Zoologia* 26 (3): 413-418.
- Montealegre-Delgado, X. K., K. Avendaño-Casadiago y M. H. Bernal. 2013. Efecto del tamaño del hábitat en la supervivencia, desarrollo y crecimiento en renacuajos de *Engystomops pustulosus* (Anura: Leiuperidae) y *Rhinella humboldti* (Anura: Bufonidae). *Papéis Avulsos de Zoologia* 53(23): 309-314.
- Orozco, R. J. D. 2012. Morfometría geométrica de la región cefálica de la rana pico de pato (*Diaglena spatulata*) en diferentes estadios sucesionales del bosque tropical seco en la Región de Chamela-Cuixmala, Jalisco, México. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 43pp.
- Pacheco-Flores, V. y M. Ramírez-Pinilla. 2014. Ecología reproductiva de *Geobatrachus walkeri* (Anura: Scaphiophryninae). *Biología tropical* 62 (1): 183-199.

- Palacio López, Kattia y N. Rodríguez-López. 2008. Plasticidad fenotípica en *Lippia alba* (Verbenaceae) en respuesta a la disponibilidad hídrica en dos ambientes lumínicos. *Acta Biológica Colombiana* 13 (1): 187-189.
- Pelegrín E., I. Fraga, S. Álvarez, J. Galindo y J. Barbarito. 2004. Efecto de diferentes niveles de proteína en la dieta de renacuajos de Rana Toro (*Rana catesbeiana*). *Comunicación Científica CIVA*: 557-565.
- Pfennig, D. 1990. The adaptive significance of an environmentally-cued developmental switch in an anuran tadpole. *Oecologia* 85(1): 101-107.
- Ramírez-Bautista, A. 1994. Manual y claves ilustradas de los anfibios y reptiles de la región de Chamela, Jalisco México. Cuaderno 23 Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México 127pp.
- Rodríguez-Prieto, A. 2013. Filogenia, morfometría y especiación de dos topillos ibéricos: *Microtus duodecimcostatus* y *Microtus lusitanicus*. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. 181pp.
- Rohlf, F. J. 2010. tpsDig, versión 2.15©. Department of Ecology and Evolution. State University of New York at Stony Brook. NY 11749-5245.
- SAS Institute. 2010. JMP Modeling and Multivariate Methods, versión 9.01©. SAS Institute.
- Sheets, H. D. 2001. Software IMP© (Integrated Morphometric Package) Department of Physics. Canisius Collage. Bufalo, NY, 1408. Department of Geology. State University of New York atnBufalo, NY 14260.
- Sholts, S. B., J. Esteban, M. Herlin, M. Viluksela y H. Håkansson. 2015. Craniofacial form is altered by chronic adult exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in Han/Wistar and Long–Evans rats with different aryl hydrocarbon receptor (AhR) structures. *Toxicology Reports* 2: 472-481.
- Suazo-Ortuño, I., J. Alvarado-Díaz y M. Martínez-Ramos. 2008. Effects of conversion of dry tropical forest to agricultural mosaico n herpetofaunal assemblages. *Conservation Biology* 22 (2): 362-374.
- Suazo-Ortuño, I., J. Alvarado-Díaz, E. Mendoza, L. López-Toledo, N. Lara-Uribe, C. Márquez-Camargo, J. G. Paz-Gutiérrez y J. D. Rangel-Orozco. 2015. High resilience of herpetofaunal communities in a human-modified tropical dry

forest landscape in western Mexico. *Tropical Conservation Science* 8 (2): 396-423.

Capítulo II “Variación de los núcleos cerebrales encargados de las vocalizaciones en *Smilisca baudinii* bajo estadios sucesionales contrastantes”

2.1. Introducción

Todos los individuos de una comunidad, independientemente de la especie a la que pertenezcan, están siempre en contacto con el medio en el que habitan, este, no solo les proporciona el espacio físico en donde llevar a cabo sus ciclos vitales, sino que también involucra las interacciones con otras especies, lo que les permite completar su ciclo de vida (Gómez, 2012). Por lo que se considera, que el hábitat ejerce una fuerte influencia sobre los individuos. Los cuales reciben las señales externas del medio, las interpretan y responden a ellas (Carabio, 2011; Gómez, 2012). Una vez que los individuos han tomado las señales del medio, estos, a través del sistema endocrino y mediante señales neuronales y químicas, las interpretan y traducen, posteriormente responden a dicha señal (González-Morán, 2005).

En el caso de los anfibios, particularmente la rana pico de pato (*D. spatulata*), se ha demostrado que existe una fuerte relación entre la condición del hábitat y la densidad y tamaño de las células presentes en el área preóptica hipotalámica y la amigdalina medial, regiones cerebrales asociadas a la emisión de vocalizaciones (Bucio, 2012). Al estar estos centros neurales fuertemente asociados a la maduración sexual y al comportamiento reproductivo (Prieto-Gómez y Velázquez-Paniagua, 2002), cambios en el núcleo amigdalino medial y el área preóptica hipotalámica pueden tener efectos directos sobre la adecuación de los individuos ya que dichos cambios podrían permitir que aquellos organismos con centros neurales de mayor tamaño o con mayor densidad neuronal, presenten conductas reproductivas más complejas.

Durante varias décadas se pensaba que el cerebro únicamente sufría cambios durante su desarrollo, sin embargo las investigaciones recientes han demostrado la plasticidad neuronal del cerebro como un hecho presente durante todo el ciclo de vida de los organismos, siendo, cualquier experiencia o conocimiento nuevo adquirido causante de nuevas conexiones neuronales

(sinapsis neuronal) (Bisazza *et al.*, 1998; Kolb *et al.*, 2003). Por lo que algunos factores de estrés, como pueden ser cambios en el ambiente social o físico, cambios en la dieta o inclusive el aumento de depredadores pueden tener efectos en la sinapsis neuronal; por lo que el cerebro y aun mas las conexiones neuronales, se encuentran siempre en función de los cambios de los factores externos, en este sentido no solo la sinapsis se podría verse afectada, sino que también el comportamiento de los organismos puede cambiar (Bisazza *et al.*, 1998; Kolb *et al.*, 2003; Moreno y Gonzáles, 2006).

Uno de los principales núcleos cerebrales encargado de traducir las señales del medio externo y que exhibe un alto grado de plasticidad, es el complejo amigdalino (CA), ubicado en los lóbulos temporales, el cual forma parte del sistema límbico (Roden *et al.*, 2005; Moreno y González, 2007). A este complejo también se le conoce como el centro de las emociones y del aprendizaje y su importancia no solo recae en que es el encargado de traducir las señales del medio recibidas por el organismo, sino que además de esto también se encarga de modificar el comportamiento del organismo en función de dichas señales (Prieto y Velázquez, 2002). Sin embargo, al ser un sistema complejo, este está conformado por varios núcleos, los cuales son estructural y funcionalmente diferentes entre sí (Roden *et al.*, 2005). Para el caso de los anfibios, particularmente los anuros, este complejo se divide en tres núcleos (Fig. 2), siendo en comparación con otros tetrápodos actuales, uno de los complejos estructuralmente más simples. Los núcleos que conforman el CA en orden desde una vista antero-posterior, de acuerdo con la nomenclatura dada por Roden *et al.* (2005) y Moreno y González (2006) son el Núcleo Amigdalino Central (AC) que es el codificador de la información proveniente del resto de los núcleos amigdalinos, los cuales en suma modulan el comportamiento de los organismos (Fig. 1A); el Núcleo Amigdalino Medio (MA) que está fuertemente conectado con el hipotálamo, particularmente a los núcleos encargados del comportamiento reproductivo y defensivo (Fig. 1B); y el Núcleo Amigdalino Lateral (LA) que es el mejor sensor de la información proveniente del AC y AM, asociado al comportamiento emocional de los organismos (Fig. 1B).

Por otro lado no solo el CA funge como regulador del comportamiento reproductivo, ya que debido a que este comportamiento para el grupo de los anuros, está determinado durante la época reproductiva y se da típicamente mediante la emisión de vocalizaciones por parte de los machos, todos aquellos núcleos cerebrales que participen en la ruta sináptica de las vocalizaciones estarán forzosamente involucrados en el comportamiento reproductivo de los machos (Prieto y Velázquez, 2002; Domínguez *et al.*, 2015). En este sentido, además del CA, existen otros cuatro núcleos asociados al comportamiento vocal en anuros (Fig. 2) y estos son: a) Área Pre-óptica Hipotalámica (APO) que es una región cerebral localizada entre el Tectum óptico, el Núcleo Itsmo y la Formación Reticular (Urano, 1984; Roden *et al.*, 2005) (Fig. 1B). Para muchas especies de vertebrados esta región está fuertemente asociada al comportamiento sexual, en el caso de los anfibios está directamente asociada al comportamiento vocal de los machos durante la época de reproducción y la elección de pareja. Se ha demostrado que esta región cerebral es particularmente sensible al aumento de la testosterona, hormona secretada principalmente por los machos durante la etapa reproductiva, lo que provoca las llamadas de cortejo y la competencia vocal entre los machos, a través de la sobre excitación de la sinapsis neuronal que comienza en la parte anterior del APO (Prieto y Velázquez, 2002; Domínguez *et al.*, 2015); b) Tálamo, región cerebral interpuesta entre el tallo cerebral y los hemisferios cerebrales, separada del hipotálamo por el surco tálamico (Roden *et al.*, 2005) (Fig. 1 C y D). Asociada a la regulación del ciclo circadiano y la maduración sexual (Neary y Wilczynski, 1977; Sherman y Guillery, 2001; Sherman, 2005; Roden *et al.*, 2005); c) Núcleo Para-Branquial (PB), que forma parte del sistema nervioso autónomo, encargado de las funciones involuntarias de los organismos, asociado con la actividad respiratoria (Paxinos *et al.*, 2012), este núcleo cerebral puede presentar hipoplasia neuronal (bajo número de neuronas) por dos razones, desarrollo anormal prenatal del núcleo o por muerte neuronal ocasionada por factores de estrés, de presentar hipoplasia en este núcleo el organismo tendrá deficiencias respiratorias, para los anuros el canto depende directamente de la cantidad de aire que pueda inhalar un macho, un macho con deficiencias respiratorias, tendrá deficiencias vocales (Lavezzi *et al.*, 2004; Gillooly y Ophir, 2010). Este núcleo se divide en dos regiones importantes, el núcleo para-branquial lateral y núcleo

para-branquial medial, ambas regiones reciben, traducen y envían las señales que controlan la actividad respiratoria. Ubicado entre el tectum óptico, el Núcleo istmo y la formación reticular (Roden *et al.*, 2005; De la Torre , 2006) (Fig. 1E) y d) las Neuronas motoras de los núcleos IX y X que son centros medulares que accionan y controlan los músculos faríngeos y laríngeos, en anuros asociados a la emisión de vocalizaciones y activados principalmente por aumentos de testosterona, hormona reguladora de la madurez sexual, estos centros son en realidad nervios ubicados en la medula espinal del tallo cerebral y representan la etapa final de los relevos sinápticos en la emisión de vocalizaciones (Kelley, 1980) (fig. 2).

Debido a que en un estudio previo realizado en la misma región de Chamela, Jalisco se evaluaron el Núcleo Amigdalino Medio (MA) y el Área Pre-óptica Hipotalámica (APO) de la rana *Diaglena spatulata* para evaluar la relación entre la densidad y tamaño de las células presentes en estas dos regiones y a que tanto el MA como el APO están asociadas con el comportamiento sexual y en el caso de los anfibios el APO está directamente asociada con el comportamiento vocal de los machos. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la variación de los núcleos cerebrales encargados de las vocalizaciones en la rana *Smilisca baudinii* entre sitios con perturbación antrópica del hábitat y sitios conservados del Bosque Tropical Seco.

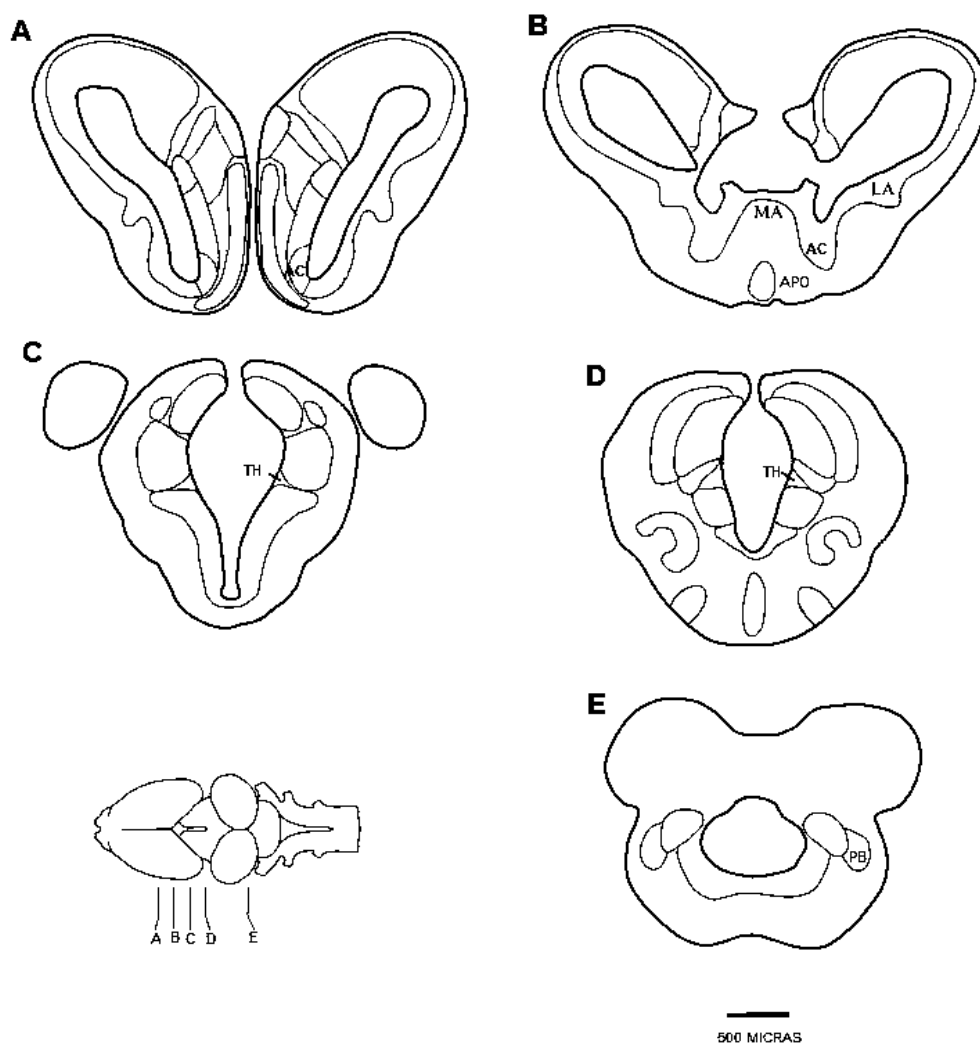


Figura 1. Regionalización cerebral de los núcleos asociados a las vocalizaciones en anuros, AC: Núcleo amigdalino central; MA: Amigdalino medio; LA: Amigdalino lateral; APO: Área pre-óptica hipotalámica TH: Tálamo y PB: Núcleo para-branquial.

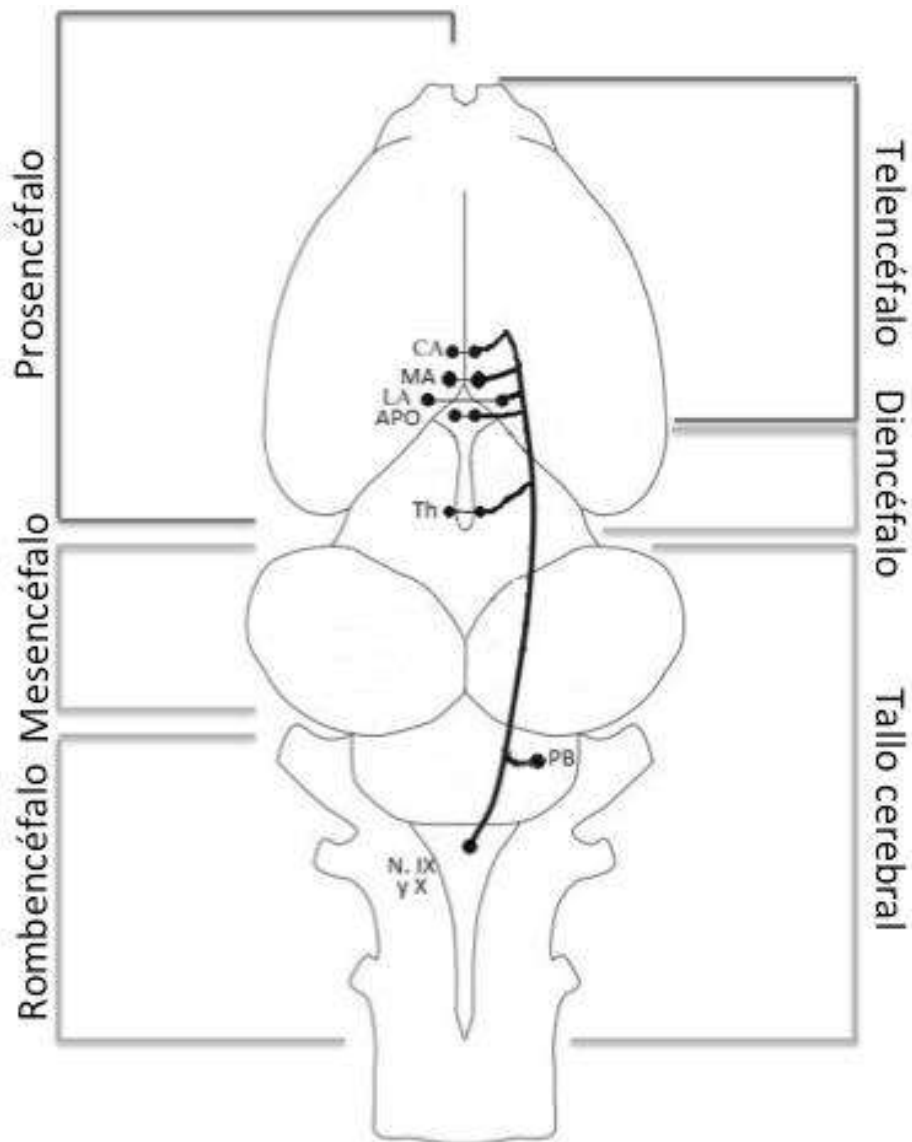


Figura 2. Ruta sináptica de los centros neuronales que controlan el comportamiento vocal en anuros machos, CA: Núcleo amigdalino central, MA: Núcleo amigdalino medio, LA: Núcleo amigdalino lateral, APO: Área pre-óptica hipotalámica, PB: Núcleo parabrancial y IX & X: Neuronas motoras de los núcleos IX & X.

2.2. Materiales y métodos

Para evaluar el efecto del hábitat sobre el desarrollo de las células de los núcleos cerebrales encargados de las vocalizaciones en anuros, se realizó una salida durante la época de lluvias, de Agosto a Septiembre de 2014. Posteriormente se recolectaron 5 ejemplares de *S. baudinii* para el BM y 5 para el área con PA. Los ejemplares recolectados fueron pesados, medidos y sacrificados en laboratorio, posteriormente se les realizó una incisión sagital en el cráneo y se colocaron en frascos de plástico que contenían una solución amortiguada de paraformaldehído (4%). Los cerebros de cada individuo fueron disecados pesados, medidos y transferidos a una solución amortiguada de sacarosa (30%), para posteriormente ser congelados en tissue-tek a -25°C.

Una vez congelados, los cerebros fueron cortados obteniendo rebanadas de 30µm, cada rebanada fue colocada sobre porta objetos recubiertos de gelatina y teñida con violeta de cresiol durante 10 minutos. Posteriormente estas fueron deshidratadas en una serie ascendente de etanol, aclaradas y montadas en Cytoseal 60 para poder ser observadas y fotografiadas mediante el uso de un microscopio de campo claro (Leica DM3000) y la cámara digital Leica DFC310FX. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa ImageJ (Kizic y Borovac, 2001), con el que se comparó la densidad de neuronas del núcleo amigdalino medial (AM) y del área preóptica hipotalámica (APO) (Principales núcleos cerebrales encargados de las vocalizaciones en anuros), así como el tamaño de ambos núcleos.

2.2.1 Tamaño y densidad neuronal

Una vez caracterizadas las regiones cerebrales donde se localizan los núcleos AM y APO se numeró cada uno de los cortes realizados para cada individuo de ambas regiones, posteriormente mediante un sorteo aleatorio se seleccionó un corte por individuo por núcleo. Cada corte fue fotografiado a una resolución de 4x para medir el tamaño del núcleo y de 10x para cuantificar la densidad neuronal, tomando en cuenta tanto el hemisferio derecho como el izquierdo.

APO: Núcleo fácilmente distinguible, ubicado en el telencéfalo (Fig. 2), se encuentra rodeando el tercer ventrículo de forma ovalada muy alargada y en posición vertical (Fig. 1A)

AM: Núcleo localizado entre los ventrículos laterales y el tercer ventrículo, tiene una forma elíptica casi redonda fácil de observar y diferenciar (Fig. 1B)

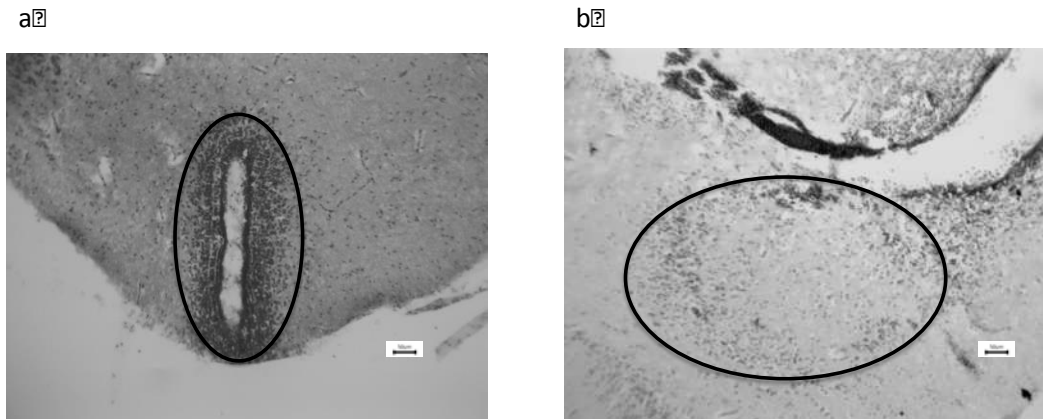


Figura 3. Imágenes tomadas del APO y AM con una resolución de 10x barra de escala de 50 μ ubicada en la esquina inferior derecha. a: Imagen del APO dentro del contorno negro y rodeando el tercer ventrículo. b: Imagen del AM dentro del contorno negro por debajo del ventrículo lateral derecho.

Una vez seleccionados los cortes para cada núcleo cerebral, estos fueron fotografiados y divididos en 6 secciones de 200 x 200 μ , cada una de las cuales tenía un total de 16 cuadros de 50 x 50 μ (Fig. 3) los cuales estaban numerados de la misma forma para cada sección (1-16 a, 1-16 b...1-16-f). De cada sección se seleccionaron, mediante un sorteo aleatorio, cuatro cuadros en los que se midió densidad neuronal, únicamente se excluyeron aquellos cuadros que quedaban totalmente fuera del núcleo o dentro del tercer ventrículo.

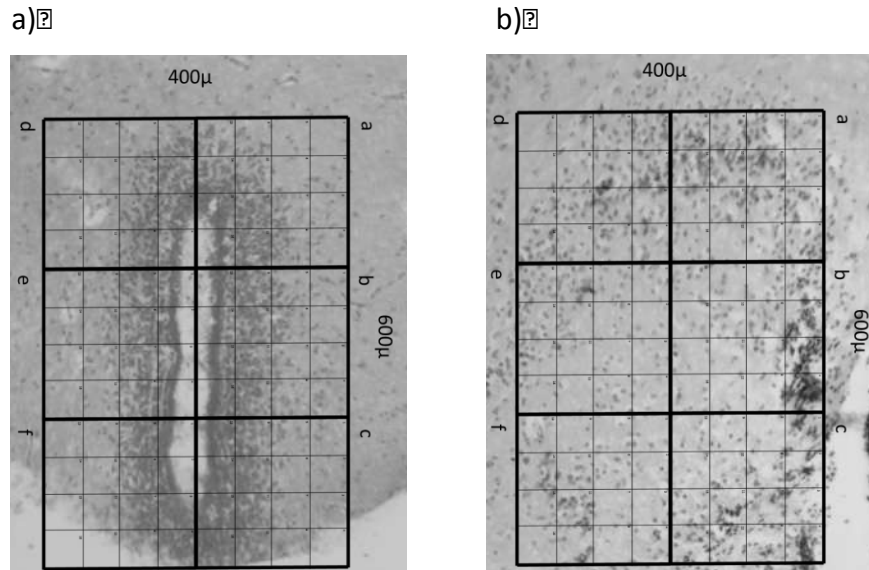


Figura 4. a) Imagen del APO b) imagen del AM ambas con gradillas de sorteo para cuantificar densidad neuronal de $400 \times 600\mu$ a $10\times$.

Para medir el tamaño del núcleo, las fotografías tomadas se procesaron con el programa ImageJ (Kizic y Borovac, 2001), el cual, mediante escalas predeterminadas, cuantifica las distancias del punto a al b por lo que se pueden trazar líneas, en este caso el perímetro de cada núcleo y calcular el área exacta del mismo, para el caso del APO se excluye el área del tercer ventrículo

Los datos obtenidos fueron almacenados en hojas de cálculo de Excel y posteriormente analizados mediante el programa JMP 9.01 (SAS Institute, 2010a).

Debido a que el tamaño de muestra fue pequeño ($n=5 \times \text{tratamiento}$) los datos obtenidos se compararon con pruebas de t para muestras pareadas, cuando presentaban distribución normal, y se corroboró el resultado con la prueba no paramétrica de Wilcoxon/kruskal Wallis, para aquellas muestras que no presentaron dicha distribución, los datos fueron comparados únicamente con esta segunda prueba. Se utilizó una prueba de Bartlett para las varianzas de cada población.

2.3. Resultados.

2.3.1. Área Preóptica Hipotalámica (APO)

Núcleo de menor tamaño que el AM con un tamaño de 99563.7289 \pm 29853.360 μ^2 (Tabla 1).

Cuadro 1. Promedios de tamaño de los núcleos y de la densidad neuronal, entre el BM y el PA. Den.AM= Densidad neuronal de la amígdala medial en 50 μ^2 , Den.APO= Densidad neuronal del área preoptica hipotalámica en 50 μ^2 .

Condición	Den. AM	Den. APO	Tamaño APO μ^2	Tamaño AM μ^2
	10	10	99563.7289	237355.8283
	(\pm 1.751)	(\pm 1.947)	(\pm 29853.360)	(\pm 92138.662)
BM	9.8	9.6	86191	222252
	(\pm 1.789)	(\pm 1.949)	(\pm 37672.5)	(\pm 117714)
PA	10.6	9.8	112936	252460
	(\pm 1.817)	(\pm 2.168)	(\pm 11788.1)	(\pm 68370)

En los resultados obtenidos no se observaron diferencias significativas entre el tamaño del núcleo de cada condición (Tabla 1), BM= 86191 \pm 37672.5 μ^2 , PA=112936 \pm 11788.1 μ^2 y una $\chi^2= 0.2506$ (Fig. 13a). La prueba Bartlett mostró que las varianzas de cada población difieren significativamente entre sí, siendo mayor en el BM, $\chi^2=37672.5$, PA=11788.1 y una $p_{\text{Bartlett}}= 0.0456^*$

Al igual que el tamaño del APO, tanto el BM como el PA presentaron la misma densidad de neuronas (Tabla 1) BM= 9.6 \pm 1.949 neuronas*50 μ^2 , PA= 9.8 \pm 2.168 neuronas*50 μ^2 con una $p= 0.559$ (Fig. 13b)

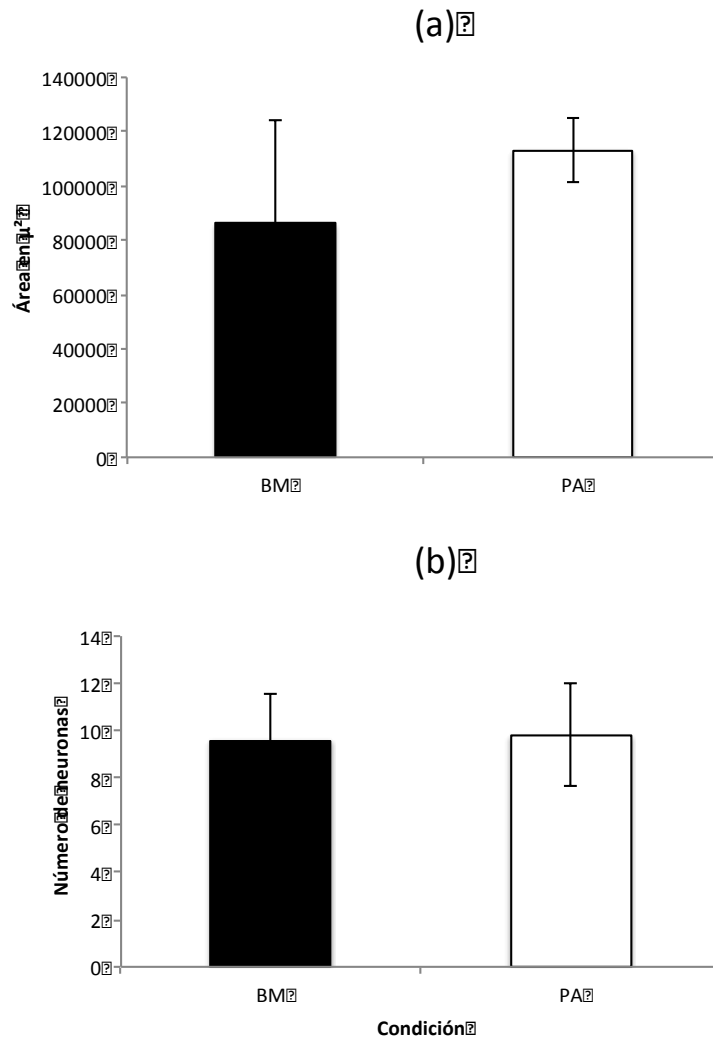


Figura 5. a) Área total del APO donde se observa la diferencia en la varianza para cada condición y b) densidad de neuronas del APO por cada 50μ².

2.3.2 Núcleo Amigdalino Medial (AM)

Este núcleo, es de mayor tamaño que el APO (Tabla2), presenta un tamaño promedio de 237355.8283 ±92138.662 μ². Los resultados obtenidos no muestran ser significativamente diferentes entre las poblaciones, con un área promedio para el BM= 222252 ±117714 μ² y para el PA= 252460 ±68370μ² con una P=0.6819 (Fig.a). En términos de densidad neuronal, tampoco se observaron diferencias significativas entre los tratamientos teniendo para el BM= 9.6 ±1.949 neuronas*50μ² y para el PA=9.8 ±2.168 neuronas*50μ² con una Chi²= 0.5192 (Fig. 14b)

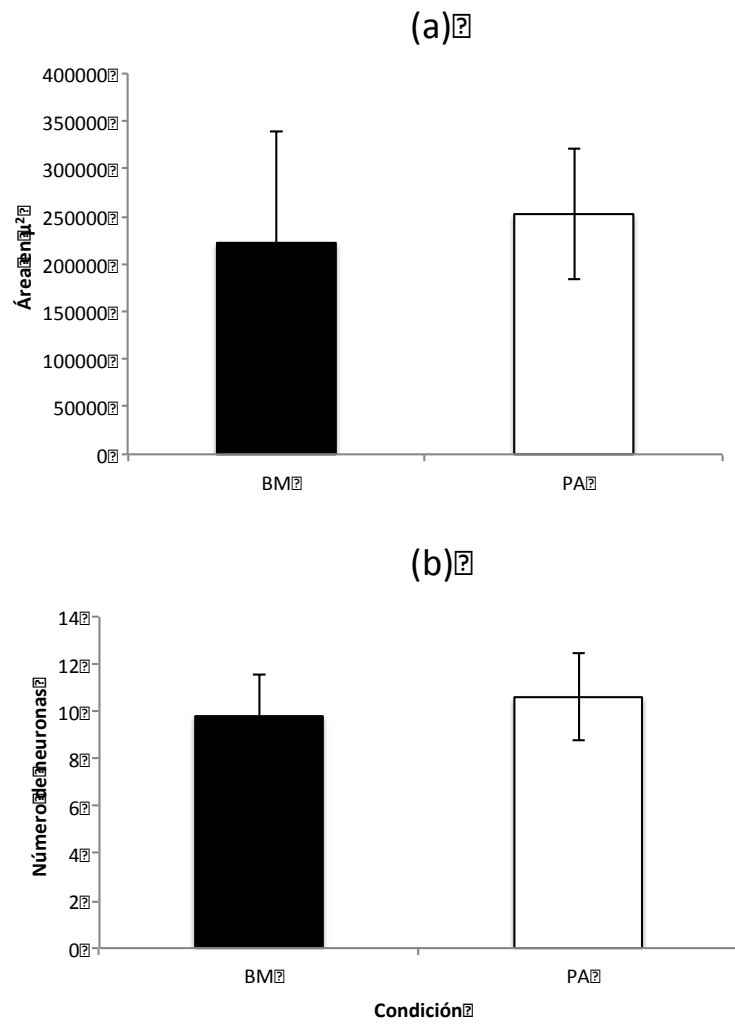


Figura 6. a) Área total del AM y b) densidad de neuronal del AM por cada $50 \mu^2$.

2.4 Discusión

A pesar de que no se encontraron diferencias significativas para el núcleo AM ni para el APO, existen numerosos trabajos que han demostrado el efecto del hábitat sobre el desarrollo neuronal de los organismos, principalmente en edades tempranas del desarrollo (etapas larvales o antes de eclosionar) (Nowicki *et al.*, 1998; Prieto y Velázquez, 2002; Nowick *et al.*, 2002; Lavezzi *et al.*, 2004; MacDonald *et al.*, 2006). Los eventos estresantes pueden ocasionar la muerte neuronal y en consecuencia disminuir la densidad neuronal del AM y APO. Por otro lado, los eventos estresantes no solo pueden manifestarse en la muerte neuronal, sino que también pueden ocasionar atrofia neuronal al reducir drásticamente la capacidad sináptica de las neuronas reduciendo el número y el tamaño de las dendritas que realizan dicha función (Hebb, 1949; Urano, 1984; Hunter, 2005), aunque en este estudio no se evaluó si ocurre algún tipo de atrofia neuronal en respuesta a la perturbación del hábitat. Los resultados de este estudio podrían indicar que el estrés que ejerce el ambiente en las dos condiciones del hábitat estudiadas no comprometen la organización de los circuitos neuronales, aunque el Núcleo Amigdalino Medial (AM) podría estar relacionado con la complejidad de la llamada de anuncio de *S. baudinii* (ver capítulo III).

2.5 Conclusiones

Tanto el tamaño del núcleo amigdalino medial como su densidad neuronal no respondieron al efecto del tratamiento, siendo igual tanto en el BM como en las zonas con PA. De la misma forma ocurre para el área preóptica hipotalámica. Es probable que el tamaño de muestra sea pequeño para realizar comparaciones entre los tratamientos, así como aplicar herramientas que permitan determinar el tamaño y el número de dendritas de las neuronas de cada tratamiento (como son el estudio de Golgi), con el fin de poder evaluar si el hábitat está actuando en términos de densidad neuronal, en el tamaño de las neuronas o en ambos sentidos.

2.6 Literatura Citada

- Bucio P. F. E. 2012. Variaciones morfológicas del área preóptica hipotalámica y de la amígdala medial en la rana macho de la especie *Diaglena spatulata*, y su relación con la sucesión secundaria del bosque tropical seco en la región de Cuixmala-Chamela, Jalisco. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México 39pp.
- Carabio F. M. M. 2011. Plasticidad fenotípica inducida por competencia en larvas de *Hypsiboas pulchellus*. Informe de pasantía. Facultad de ciencias. Universidad de la República. 27pp.
- De la Torre M. L. Y A. Agüero 2006. Papel del núcleo parabraquial medial (NPBm) en un paradigma demorado de aprendizaje aversivo gusto-olfativo. *Iniciación a la Investigación* (1):a15.
- Domínguez, L., A. González y N. Moreno. 2015. Patterns of hypothalamic regionalization in amphibians and reptiles: common traits revealed by a genoarchitectonic approach. In: Alvarez-Bolado, G., V. Grinevich y L. Puelles (Eds), *Development of the Hypothalamus*. *Frontiers in neuroanatomy*, 9 (83) :47-66.
- Gillooly, J. F. y A. G. Ophir. 2010. The energetic basis of acoustic communication. *The Royal Society of London B* 277: 1325-1331.
- Gómez V. I. 2012. Respuestas fenotípicas en larvas de anuros a situaciones cambiantes en los factores bióticos y abióticos. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. 172 pp.
- Hebb, D.O. 1949. *The Organization of Behavior*. Wiley. New York: 353pp.
- Hunter, Z. R. 2005. Plasticity of the adult human brain and motor recovery after stroke. *Publications of the Institute of Cognitive Science* 5: 39pp.
- Kelley, D. B. 1980. Auditory and vocal nuclei in the frog brain concentrate sex hormones. *Science* 207(4430): 553-555.
- Kizic M. y M. Borovac. 2001. ImageJ: Image Processing and Analysis in Java. <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/pdfs/imagej-gui.pdf>.

- Kolb, B., R. Gibb y T. E. Robinson. 2003. Brain plasticity and behavior. *Current Directions in Psychological Science* 12(1): 1-5.
- Lavezzi, A. M., G. Ottaviani, L. Rossi y L. Maturri. 2004. Hypoplasia of the parabrachial/Kölliker-Fuse complex in perinatal death. *Neonatology* 86(2): 92-97.
- MacDonald, I. F., B. Kempster, L. Zanette y S. A. MacDougall-Shackleton. 2006. Early nutritional stress impairs development of a song-control brain region in both male and female juvenile song sparrows (*Melospiza melodia*) at the onset of song learning. *Proceedings of the Royal Society of B* 273: 2559-2564.
- Moreno, N. y A. González. 2006. The common organization of the amygdaloid complex in tetrapods: new concepts based on developmental, hodological and neurochemical data in anuran amphibians. *Progress in neurobiology* 78(2): 61-90.
- Moreno, N. y A. González. 2007. Evolution of the amygdaloid complex in vertebrates, with special reference to the anamnio-amniotic transition. *Journal of Anatomy* 211(2): 151-163.
- Neary, T. J. y W. Wilczynski. 1977. Ascending thalamic projections from the obex region in ranid frogs. *Brain Research* 138(3): 529-533.
- Nowicki, S., S. Peters y J. Podos. 1998. Song learning, early nutrition and sexual selection in songbirds. *American Zoologist* 38(1): 179-190.
- Nowicki, S., W. Searcy y S. Peters. 2002. Brain development, song learning and mate choice in birds: a review and experimental test of the "nutritional stress hypothesis". *Journal of Comparative Physiology A* 188(11-12): 1003-1014.
- Paxinos, G., X. F. Huang, G. Sengul y C. Watson. 2012. Organization of brainstem nuclei. In: Mai, J. K. y G. Paxinos (Eds), *The Human Nervous System*. Amsterdam Elsevier Academic Press: 260-327.
- Prieto-Gómez, B. y M. Velázquez-Paniagua. 2002. Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 45(6): 252-57.

- Roden, K., H. Endepols y W. Walkowiak. 2005. Hodological characterization of the septum in anuran amphibians: I. Afferent connections. *Journal of Comparative Neurology* 483(4): 415-436.
- SAS Institute. 2010. JMP Modeling and Multivariate Methods, versión 9.01©. SAS Institute.
- Sherman, S. M. 2005. Thalamic relays and cortical functioning. *Progress in brain research* 149: 107-126.
- Sherman, S. M., y R. W. Guillery. 2001. *Exploring the thalamus*. San Diego. Academic Press 312pp.
- Urano, A. 1984. A Golgi-electron microscopic study of anterior preoptic neurons in the bullfrog and the toad. *Zoological science* 1: 89-99.
- Urban, M. C., J. L. Richardson y N. A. Freidenfelds. 2014. Plasticity and genetic adaptation mediate amphibian and reptile responses to climate change. *Evolutionary Applications* 7(1): 88-103.

Capítulo III “Estructura de la llamada de anuncio de la rana verde de árbol (*Smilisca baudinni*) en estadios sucesionales contrastantes y su relación con cambios morfológicos de la cabeza, la densidad neuronal y el tamaño del área Preóptica Hipotalámica y de la Amígdala Medial”

3.1. Introducción

Uno de los mecanismos más usados por la mayoría de las especies de vertebrados terrestres para comunicarse con individuos de su misma especie y entre especies diferentes, es la emisión de sonidos. Estas señales acústicas forman parte de lo que se conoce como comunicación auditiva. Esta juega un papel sumamente importante para una gran cantidad de especies, principalmente de aves y anfibios (anuros), las cuales usan sus vocalizaciones de diversas formas, entre ellas para la búsqueda de pareja, delimitar territorio e incluso para advertir de posibles depredadores (Augusto, 2007; Araya y Barrantes, 2013; Escalante, 2013).

En el caso particular de los anuros, las vocalizaciones tienen el papel principal durante la época de reproducción para atraer a la hembra al sitio de percha de los machos, al mismo tiempo que delimita el territorio del macho que la emite (Ludwing, 1996; Augusto, 2007). A este tipo de señal acústica se le ha denominado llamada de anuncio (Sullivan y Wagner, Jr., 1988; Cocroft y Ryan, 1995; Ryan et al., 1996; Castellano y Giacoma, 2000; Doty y Welch, 2001; Gerhardt, 2005).

Al ser la llamada de anuncio una característica especie específica, es decir, que es única para cada especie, también funciona como una barrera para evitar el entrecruzamiento de especies (Cocroft y Ryan, 1995). Por lo tanto, cualquier cambio en su estructura puede tener consecuencias directas en la adecuación de los individuos (Rojas y Escobar, 2011). Casos como el de *Diaglena spatulata* han demostrado que el grado de perturbación del hábitat provoca cambios morfológicos, donde sobresalen aquellos que evalúan la forma y el tamaño de la cabeza de los individuos (Orozco, 2012) y fisiológicos entre los que destacan el cambio en la densidad y el tamaño de las células, de aquellas regiones cerebrales asociadas a la emisión de las vocalizaciones (Bucio, 2012).

De tal manera que los cambios morfológicos pueden estar afectando la estructura de las vocalizaciones en los anuros, debido a que la forma y el tamaño de la boca determinan la frecuencia con la que se puede emitir un sonido, ranas con cabezas grandes emitirán cantos con frecuencias graves y ranas con cabezas pequeñas emitirán cantos agudos (Cocroft y Ryan, 1995; Castellano y Giacoma, 2000). Así mismo los cambios en la densidad y el tamaño de las células del área preoptica hipotalámica y amigdalina medial, regiones asociadas a la maduración sexual y la emisión de llamadas de anuncio (Kelly, 1980; Prieto-Gómez y Velázquez-Paniagua, 2002; Bucio 2012), pueden determinar la capacidad para emitir llamadas más complejas, o de mayor duración, por lo que podemos esperar que aquellas ranas que presenten centros neurales de mayor tamaño y con mayor densidad neuronal, emitan llamadas de anuncio más complejas. Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la estructura del canto de la rana verde de árbol (*Smilisca baudinni*) en estadios sucesionales contrastantes y relacionarlo con la morfología de la región cefálica, así como con la densidad neuronal y el tamaño del área preóptica hipotalámica y de la amigdalina medial, regiones asociadas a la maduración sexual y a la emisión de llamadas de anuncio.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1 Colecta de organismos

El estudio se llevó a cabo en el Bosque Tropical Seco (BTS) de Chamela, Jalisco donde se seleccionaron sitios con estadios sucesionales contrastantes (sitios con perturbación antropogénica (PA) vs sitios de bosque maduro (BM), teniendo así dos tratamientos. Para cada tratamiento se establecieron tres réplicas, parcelas pertenecientes al proyecto MABOTRO (Manejo de Bosques Tropicales), por lo que se tuvieron tres parcelas en zonas con PA y tres parcelas en el BM.

Una vez seleccionados los sitios de muestreo, la recolecta de los organismos se llevó a cabo durante dos años en la época de lluvias, de Agosto a Septiembre 2014 y de Agosto a Septiembre del 2015, mediante el método de búsqueda intensiva por encuentro visual en cada una de las tres réplicas correspondientes a cada tratamiento. Únicamente se muestrearon y recolectaron

organismos adultos. Cada vez que un organismo fue localizado, se llevó a cabo la grabación de las llamadas de anuncio.

3.2.2. Medidas Morfométricas

Para evaluar la diferencias entre la talla (LHC), el peso (Pgr), el factor de condición corporal (K) y tamaño de la región cefálica (TRC) de los organismos entre los años de muestreo (2014 y 2015) y entre los tratamientos (BM y PA), con el uso del paquete estadístico JMP 9.01 (SAS Institute, 2010a), se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con dos factores (año y tratamiento), con la Prueba de Shapiro-Wilks. El factor de condición se calculó mediante el índice de Fulton (K) con la fórmula $K=w/svl^3 \times 10^5$ (Bancilia *et al.*, 2010).

3.2.3. Descripción de la llamada de Anuncio de *S. baudinii*

Para analizar la estructura de la llamada de anuncio de *S. baudinii* y las diferencias entre zonas perturbadas y el BM se llevó a cabo la grabación y análisis de estas. Se registraron las llamadas de anuncio de 15 individuos por cada tratamiento (5 individuos por réplica), con el uso de un micrófono cardioide (unidireccional) marca Behringer®, modelo B-5 y una grabadora marca Handy®, modelo ZOOM-H4n con capacidad para grabar sonidos de hasta 15,000 Hz. Todos los individuos grabados fueron recolectados, pesados, medidos y fotografiados.

Las grabaciones fueron tomadas durante periodos de canto, estos fueron determinados en campo dependiendo de los individuos. Para poder hacer la comparación de los cantos y poder aislar el canto de la especie de estudio los cantos se grabaron a una distancia no mayor a 30 cm del individuo.

Las llamadas de anuncio fueron almacenadas en carpetas individuales por punto de muestreo, con los siguientes datos: tratamiento (BM o zonas con PA), sitio de colecta (nombre de la localidad) y el número de individuo.

Con el fin de eliminar el ruido ambiental, cada llamada de anuncio fue depurada con el programa Raven Pro 1.5 (Bioacoustics Research Program, 2013), posteriormente fue aislada y recortada a una ventana de 350 ms (Fig. 1), estas se almacenaron por individuo y por intervención.

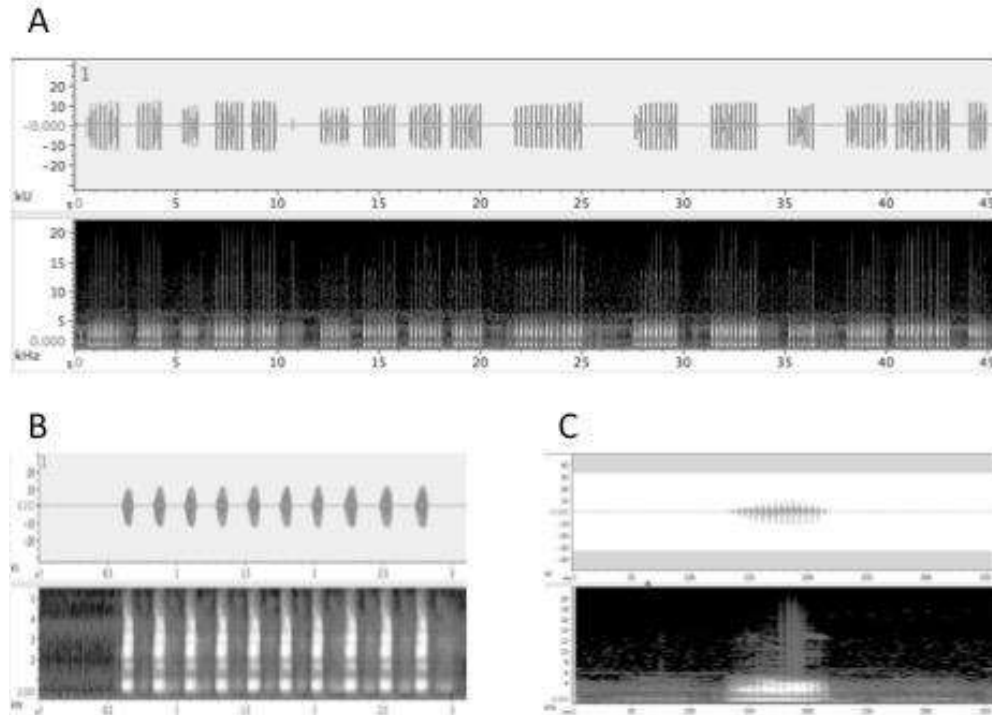


Figura 1. Espectrograma de una grabación realizada para un individuo macho de *S. baudinii*. A) Grabación completa y sin depurar a una ventana de 45s, consta de varios elementos (múltiples intervenciones), en la parte superior en el eje “y” se puede observar la amplitud de onda a través del tiempo y en la parte inferior en el eje “y” se observa la frecuencia a través del tiempo. B) Espectrograma de una intervención completa, esta consta de varios cortes. C) Espectrograma de un corte, donde se puede observar la duración, frecuencia y amplitud.

Para caracterizar los componentes acústicos se utilizó la plataforma estadística R 3.0.0 (Urbanek *et al.*, 2012), con el paquete Seewave 1.7.6 (Sueur *et al.*, 2014). Se obtuvieron 2049 cortes, 1106 pertenecientes al BM y 943 de los sitios con PA. Los elementos analizados del canto fueron los siguientes (Barrio, 1965; Salas *et al.*, 1998; Duré *et al.*, 2003):

Amplitud: Representa el grado de movimiento de las moléculas de aire en la onda, es una medida de presión. Cuanto mayor es la amplitud de la onda, más intensamente golpean las moléculas el tímpano y más fuerte es el sonido percibido.

Frecuencia dominante (FD): Se define como aquella frecuencia que más se repite dentro del canto.

Frecuencia Media (F_{μ}): Se refiere a la frecuencia promedio de cada corte. También es utilizada como la FD.

Frecuencia de mayor amplitud (FA): Es la frecuencia que se da en la mayor amplitud registrada, cuando el sonido es más intenso.

Frecuencia fundamental (FF): Es la frecuencia primaria, que indica la nota emitida y se caracteriza por ser la frecuencia más baja.

Número de cortes: Se refiere al número de cantos que hay dentro de cada intervención.

Tiempo: Es la duración en segundos de cada corte.

Para determinar la forma de la llamada de anuncio, se realizó un espectrograma de frecuencia con el Programa Raven Pro 1.5 (Bioacoustics Research Program, 2013). La descripción general de la llamada de anuncio se hizo con los valores promedio de la F_{μ} , FD, FA, FF, Tiempo y Amplitud.

3.2.4. Efecto del hábitat y la temporalidad sobre la estructura de la llamada de anuncio

Para evaluar la diferencias entre la F_{μ} , FD, FF, Amplitud y Tiempo de la llamada de anuncio de los organismos entre los tratamientos (BM y PA) y los años de muestreo (2014 y 2015) se realizó una ANOVA con dos factores (año y tratamiento), ya que todas las variables presentaron distribución normal de acuerdo con la prueba de Shapiro-Wilks (SAS Institute, 2010a); debido a que la FF no presentó distribución normal, previamente fue transformada con el protocolo de ajuste de JMP 9.01 (SAS Institute 2010b).

3.2.5. Relación entre la estructura de la llamada de anuncio, la talla del cuerpo (LHC) y el tamaño de la región cefálica (TRC).

Una vez caracterizados todos los elementos que componen la llamada anuncio de *S. baudinii*, se buscó su posible correlación con las variables morfométricas (longitud hocico cloaca (LHC) y el tamaño de la región cefálica (TRC)) mediante regresiones lineales simples con el paquete estadístico JMP 9.01 (SAS Institute, 2010a), las cuales permiten cuantificar el valor de correlación y predecir el valor de una variable en función de la otra mediante una fórmula algebraica.

Una vez estimado el valor de correlación entre las variables acústicas y morfométricas, se determinó el comportamiento de estas en función del tipo de hábitat, con un análisis de función discriminantes usando el paquete estadístico

JMP 9.01 (SAS Institute, 2010a); este análisis, permite determinar cómo responde el conjunto de variables medidas a cambios en el ambiente y cuales diferencian los sitios perturbados de los sitios conservados.

3.2.6. Relación entre la estructura de la llamada de anuncio, el tamaño de los centros neurales y la densidad neuronal del APO y AM de *S. baudinii*

Los elementos que componen la llamada anuncio de *S. baudinii* se relacionaron con el tamaño de los centros neuronales y la densidad neuronal del APO y AM, aplicando regresiones lineales simples con el paquete estadístico JMP 9.01 (SAS Institute, 2010a); de tal forma que se obtuvo un valor de correlación entre las variables y una fórmula para predecir el cambio de una variable en función de la otra. Así mismo, se realizó un análisis de función discriminante, para determinar el efecto de la condición del hábitat sobre el agrupamiento de los organismos conforme a las variables acústicas y cerebrales. Para los análisis se usaron únicamente los datos de los 10 organismos empleados en el análisis de los centros cerebrales (ver capítulo II).

3.2.7. Relación entre la estructura de la llamada de anuncio, la morfometría corporal y cerebral de *S. Baudinii*

Para determinar el efecto del hábitat sobre los atributos acústicos y morfométricos de *S. baudinii* y la forma en que las variables se comportan en función del hábitat, se realizó un análisis de función discriminante con el paquete estadístico JMP 9.01 (SAS Institute, 2010a), el cual no solo permite agrupar a los organismos de acuerdo al tipo de hábitat, sino que al tiempo caracteriza cada grupo en función al comportamiento de las variables que lo conforman. Para este análisis se utilizaron las siguientes variables: Morfométricas (LHC y tamaño de la región cefálica), cerebrales (área del núcleo amigdalino medial) y acústicas (FA, FD y F μ).

3.3. Resultados

3.3.1. Medidas Morfométricas

El análisis de varianza mostró diferencias significativas en la LHC entre los especímenes recolectados del BM y los sitios con PA ($F_{3,29}= 2.94$, $P=0.0495$) (Fig. 2a). Los individuos de los sitios con PA fueron significativamente más chicos que los del BM ($P=0.016$); pero no hubo diferencias entre los organismos muestreados entre los años 2014 y el 2015 ($P=0.158$), ni tampoco entre la interacción año de muestreo*tratamiento ($P=0.59$). Para el TRC el ANOVA ($F_{3,29}=12.65$, $P<0.0001$) (Fig. 2b) mostró que los organismos del BM presentan cabezas de mayor tamaño que los de las zonas con PA ($P=0.0004$), así mismo los organismos recolectados durante el periodo 2014 presentaron tallas más grandes que los del periodo 2015 ($P=0.028$) y la interacción año de muestreo*tratamiento mostró diferencias significativas, siendo los organismos del BM del 2014 los que presentaron cabezas de mayor talla ($P=0.0003$). Para el Pgr el ANOVA mostró que los individuos del BM son significativamente más pesados (Fig. 2c), que los de los sitios con PA ($P=0.030$), no hubo diferencias en el Pgr entre los años de muestreo ($P=0.118$), pero sí en la interacción año de muestreo*tratamiento ($P=0.015$). En este caso los individuos del BM del 2014 fueron significativamente más pesados que el resto de los individuos ($F_{3, 29}=4.80$, $P=0.0078$). En el caso del Factor de Condición (K), el ANOVA mostró diferencias significativas entre los individuos ($F_{3, 29}= 4.1745$, $P= 0.014$) (Fig. 2d). Aunque no se encontraron diferencias entre los individuos del BM y los individuos de los sitios con PA ($P=0.784$), sí se encontraron diferencias significativas entre los años de muestreo ($P=0.006$) y la interacción entre el año de muestreo*tratamiento. En este caso los individuos del BM del 2014 presentaron un Factor de Condición mayor que los del BM del 2015 ($P=0.032$).

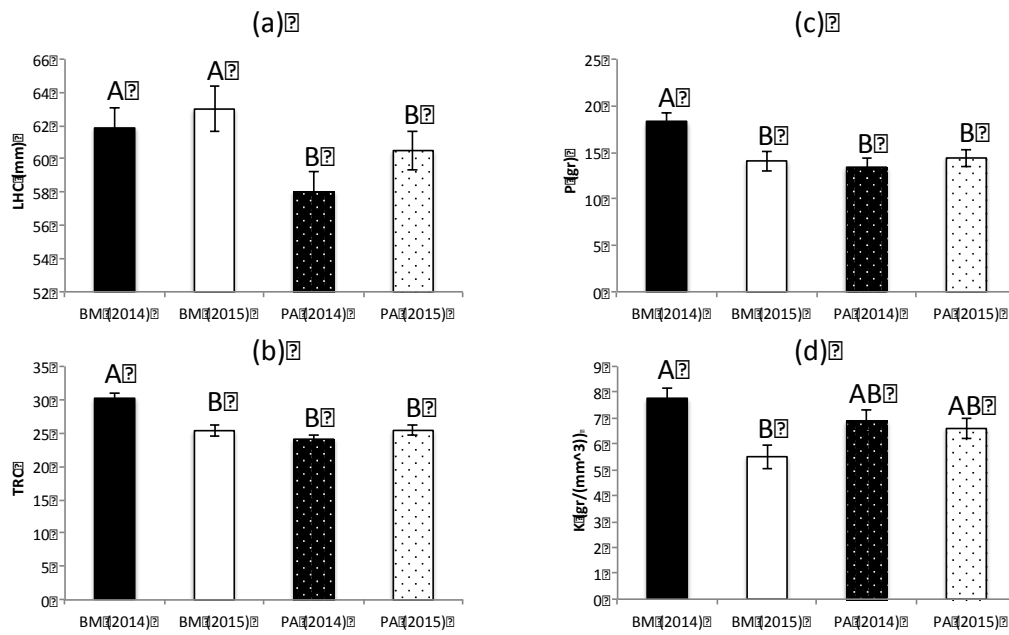


Figura 2. ANOVA para las variables morfométricas. a) LHC, el BM presentó organismos de mayor talla; b) Tamaño de la región cefálica (TRC), los organismos más grandes pertenecen al BM; c) El BM del 2014 presentó los organismos más pesados; d) Factor de condición de Fulton (K), solo es diferente el BM del 2014 con el BM del 2015.

3.3.2. Descripción de la llamada de anuncio de *S. baudinii*

Se grabaron un total de 33 individuos machos de *S. baudinii*, de los cuales 15 pertenecieron a sitios conservados y 18 a sitios con PA. La rana *S. baudinii* presentó un canto simple de una sola nota que repite constantemente (Fig. 3), cuyos valores promedio de frecuencia y amplitud son: F_{μ} de 2.41 ± 0.30 kHz; FD de 1.81 ± 0.87 kHz, un tiempo promedio de 362 ± 79 ms, FA de 1.23 ± 0.79 kHz, FF de 2.66 ± 0.62 kHz y una Amplitud de 0.489 ± 0.17 dB (Tabla 1).

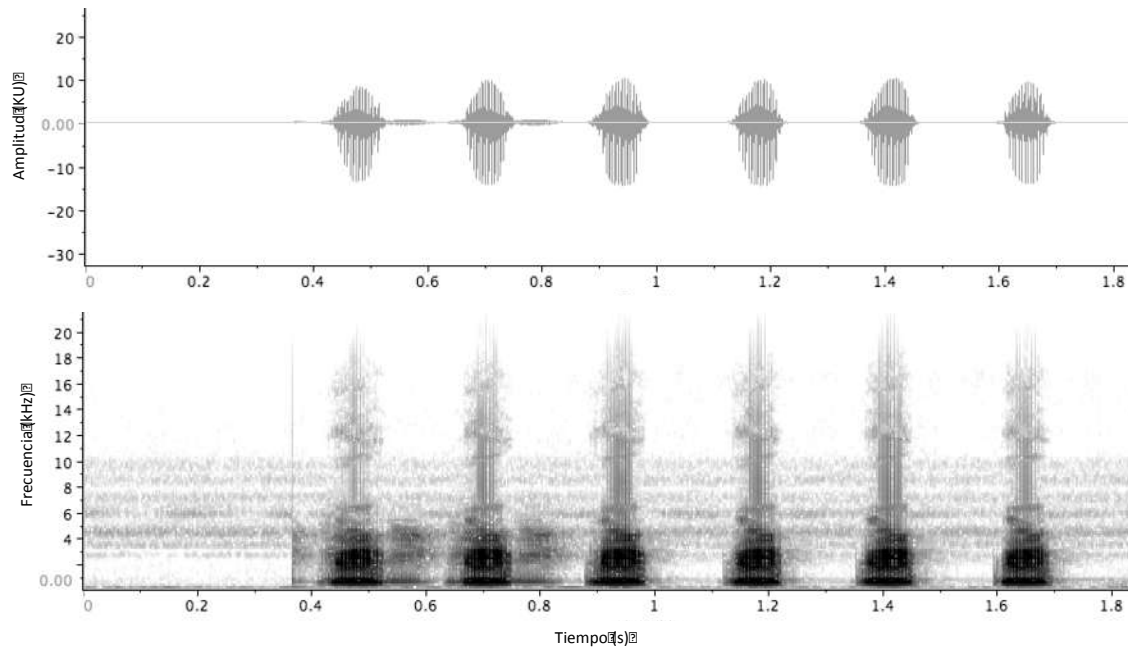


Figura 3. Representación de la amplitud de onda y espectrograma de frecuencia de la llamada de anuncio de *S. baudinii* a lo largo del tiempo dentro de una intervención en una ventana de 1.8 segundos.

Cuadro 1. Variables acústicas de la llamada de anuncio de *S. baudinii* y Comparación entre el BM y las zonas con PA.

	FA [kHz]	FD [kHz]	Tiempo (ms)	Amplitu (Db)	FF [kHz]	No. de arcos	F μ [kHz]
Prom.	1.23928	1.81647	362.88	0.489	2.66748	6.1	2.41603
	$\pm(0.793)$	$\pm(0.879)$	$\pm(79.3)$	$\pm(0.171)$	$\pm(0.628)$	$\pm(1.66)$	$\pm(0.309)$
BM	0.7	2.01401	376.33	0.45	2.68457	6.6	2.34325
	$\pm(0.13628)$	$\pm(0.940)$	$\pm(55.4)$	$\pm(0.0346)$	$\pm(0.726)$	$\pm(1.72)$	$\pm(0.385)$
PA	1.748	1.65184	351.67	0.524	2.74599	5.8	2.47666
	$\pm(0.12849)$	$\pm(0.815)$	$\pm(94.9)$	$\pm(0.03262)$	$\pm(0.404)$	$\pm(1.58)$	$\pm(0.221)$

3.3.3. Efecto del hábitat y la temporalidad sobre la estructura de la llamada de anuncio

El Análisis de Varianza mostró que la F μ presentó diferencias significativas ($F_{3, 29}=2.99$, $P=0.046$) (Fig. 4a). No hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P=0.23$), entre los años de muestreo ($P=0.14$), pero sí en la interacción tratamiento*año de muestreo ($P=0.026$). En este caso, los individuos del BM del 2014 tuvieron una F μ de 2.165 ± 0.10 KHz y fue diferente significativamente con los del BM 2015 que presentaron una F μ de 2.546 ± 0.10 y de los individuos de los sitios con PA del 2014 que presentaron una F μ de 2.518 ± 0.09 . La FD también mostró diferencias significativas entre los años de

muestreo (Fig. 4b), pero no entre el tratamiento ni en la interacción ($F_{3,29}=31.55$, $P<0.0001$). Para el 2014 la FD fue de 2.54 ± 0.10 kHz y para el 2015 fue de 1.06 ± 0.11 kHz. El tiempo solo mostró diferencias significativas en los años de muestreo ($P=0.032$). El tiempo para 2014 fue de 0.422 ± 0.026 s y para el 2015 fue de 0.33 ± 0.027 s (Fig. 4c). La FF fue estadísticamente diferente entre los años de muestreo ($F_{3,29}=1051$, $P<0.0001$). La FF (2014)= 3.09355 ± 0.035 kHz y en el 2015 la FF= 0.24859 ± 0.036 kHz (Fig. 4d). La FA solo en los sitios con PA del periodo 2015 fue estadísticamente diferente (4e). La Amplitud mostró diferencias significativas entre los años de muestreo (Fig.4f) pero no entre el tratamiento y la interacción ($F_{3,29}=27.03$, $P<0.0001$). Para el 2014 la Amplitud fue de 0.487 ± 0.028 dB y para el 2015 fue de 0.129 ± 0.29 dB.

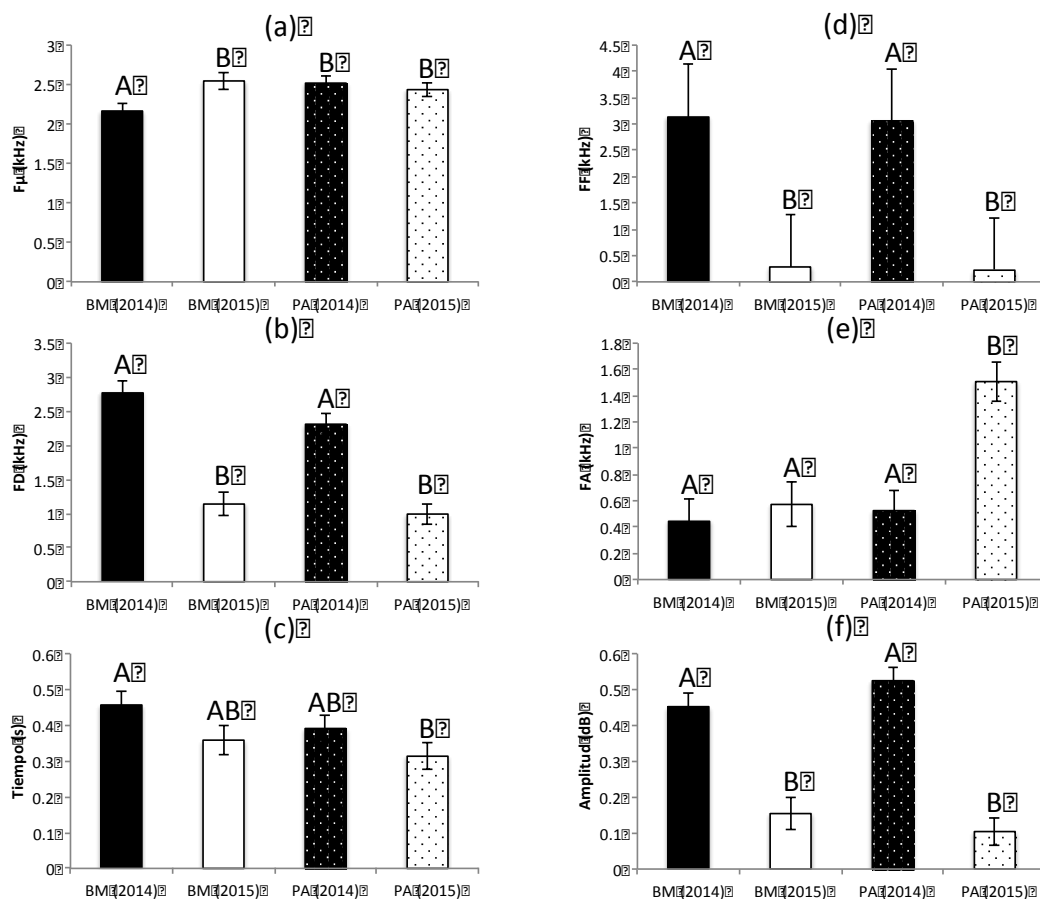


Figura 4. ANOVA para las variables acústicas. a) F_{μ} , se registró baja frecuencia para el BM durante el periodo 2014; b) FD, es más alta en el periodo 2015; c) Tiempo, la llamada de anuncio de los organismos del 2014 fue de mayor duración que la de los organismos del PA del 2015; d)

FF, fue mayor en el periodo 2014; e) FA, fue mayor en las zonas con PA del periodo 2015; f) Amplitud, fue mayor durante el periodo 2014.

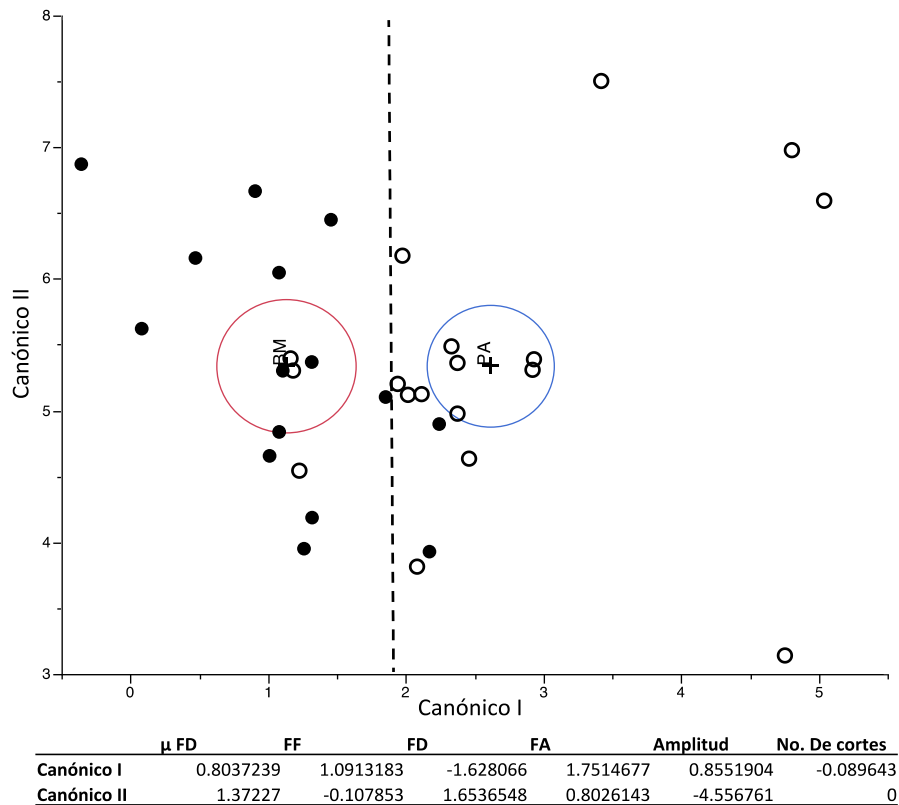


Figura 5. Análisis de función discriminante donde se observa el agrupamiento de los organismos de acuerdo a la condición del hábitat en función de los valores dados para el canónico I y II del conjunto de variables acústicas, los círculos oscuros pertenecen al BM y los claros al PA.

Respecto al comportamiento conjunto de las variables acústicas que conforman la llamada de anuncio, el análisis de función discriminante muestra dos grupos claramente definidos (Fig. 5), con 5 organismos mal clasificados, 2 pertenecientes al BM y tres pertenecientes a las zonas con PA, con una ($P=0.0469$) siendo para el eje del canónico I la FA la variable más explicativa.

3.3.4. Relación entre la estructura de la llamada de anuncio, la talla del cuerpo (LHC) y el tamaño de la región cefálica (TRC).

Como se observó en el capítulo I, los organismos del BM presentaron cuerpos y cabezas de mayor tamaño, así mismo estos fueron más pesados que los de los sitios con PA. La $F\mu$ presentó una relación negativa con la LHC, teniendo un valor de $R^2= - 0.215906$; $p=0.0064$, que responde a la siguiente ecuación: $F\mu= 4655.4525 - 36.903384*LHC$ (Fig. 6)

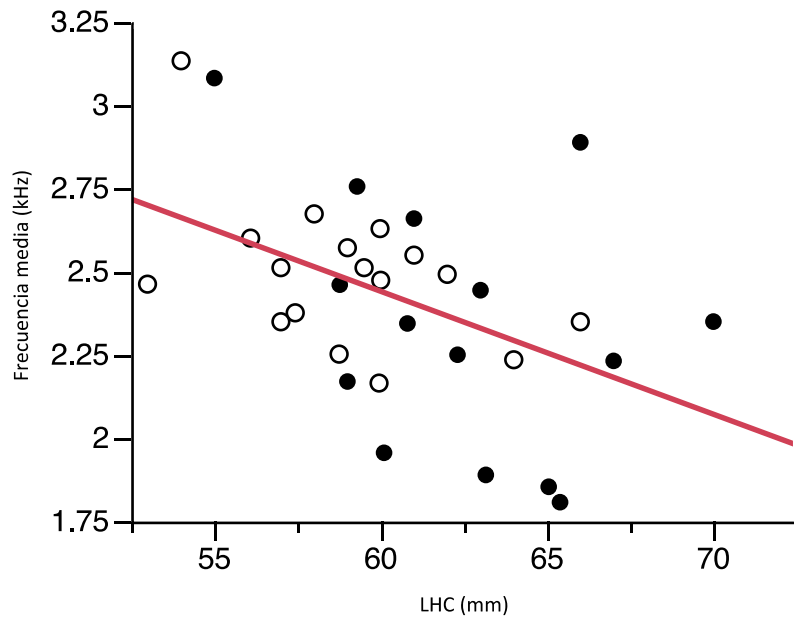


Figura 6. Regresión lineal entre la $F\mu$ y la LHC de *S. baudinii*, los círculos oscuros pertenecen al BM y los círculos claros a los sitios con PA.

Al evaluar la relación de la $F\mu$ con el TRC, la relación es del mismo tipo pero el doble de fuerte, mostrando un valor de $R^2 = -0.429109$; $p < 0.0001$, la cual responde a la siguiente ecuación: $F\mu = 4.1071864 - 0.0645635 * TRC$ (Fig. 7)

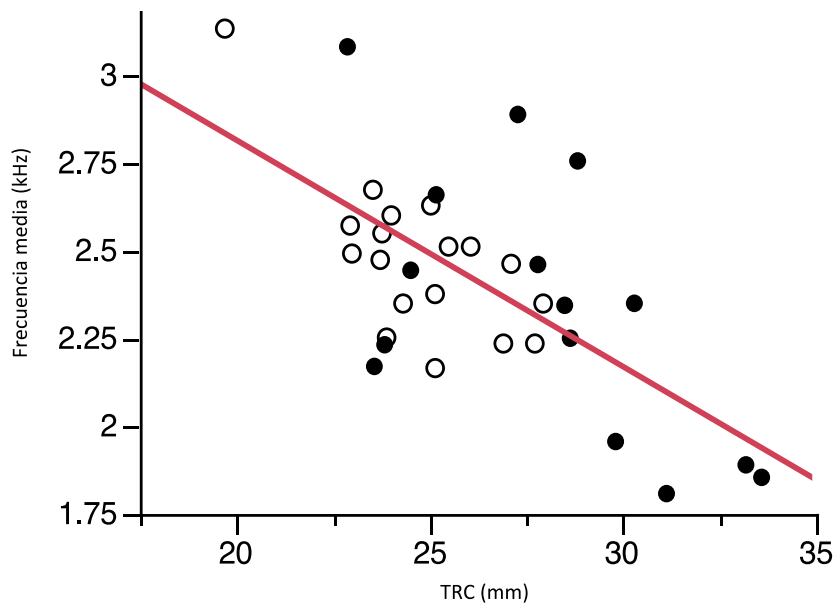


Figura 7. Regresión lineal entre la $F\mu$ y el tamaño de la región cefálica de *S. baudinii*, los círculos oscuros pertenecen al BM y los círculos claros a PA

El análisis de función discriminante entre los elementos acústicos de la llamada de anuncio y los elementos morfométricos (LHC, TRC) de *S. baudinii* mostró la formación de dos grupos, el del BM, con dos organismos mal clasificados; y el del PA con 5 organismos mal clasificados, con una $p= 0.0006$ (Fig. 13). Dicha agrupación solo se pudo observar en función de las variables del eje canónico I, siendo las variables más explicativa la FA, la $F\mu$ y la FD (Fig. 10).

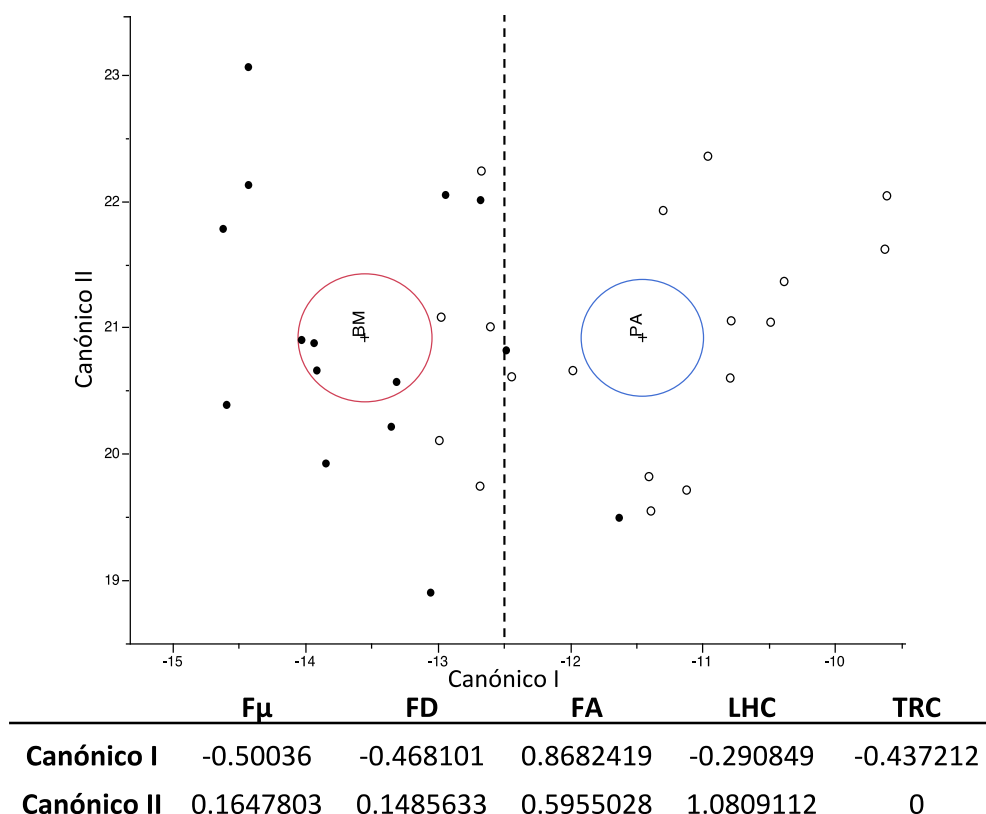


Figura 10. Análisis de función discriminante donde se observa el agrupamiento de los organismos de acuerdo a la condición del hábitat en función de los valores dados para el canónico I y II del conjunto de variables acústicas y morfométricas, los círculos oscuros pertenecen al BM y los claros al PA.

3.3.5. Relación entre la estructura de la llamada de anuncio, el tamaño de los centros neurales y la densidad neuronal del APO y AM de *S. baudinii*

A pesar de que no se encontraron diferencias entre los centros neurales APO y AM de los organismos del BM vs PA (ver capítulo II) se observó un valor alto de correlación entre la densidad neuronal del AM y el número de cortes por intervención, dicha relación fue positiva y tiene un valor de $R^2= 0.449467$; $p=0.0339$ y responde a la siguiente ecuación: número de cantos por

intervención= $2.5239085 + 0.3471933$ por Densidad neuronal de la AM por cada $50\mu^2$ (Fig. 11).

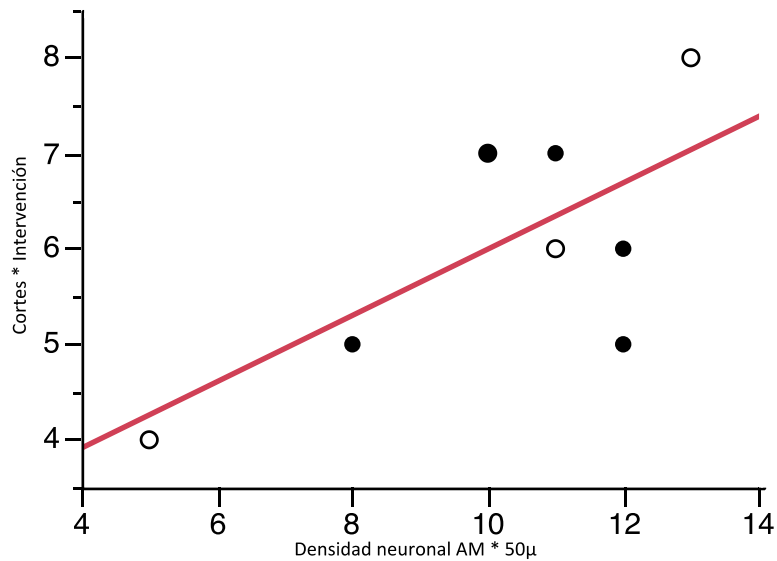


Figura 11. Regresión lineal entre el número de cortes por intervención y la densidad neuronal del AM de *S. baudinii*. Los círculos oscuros pertenecen al BM y los círculos claros al PA.

El análisis de función discriminante del conjunto de variables acústicas y fisiológicas, agrupó los organismos de cada población sin tener ningún organismo mal clasificado; sin embargo, esta agrupación no es válida ya que no es significativa con una $p=0.2716$ (Fig. 12)

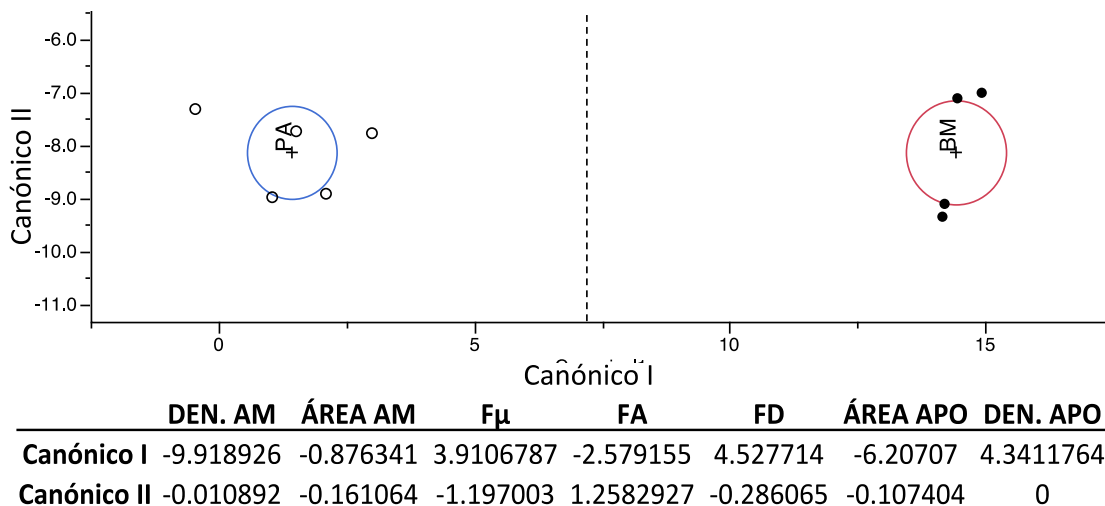


Figura 12. Análisis de función discriminante donde se observa el agrupamiento de los organismos de acuerdo al tratamiento en función de los valores dados para el canónico I y II del conjunto de variables acústicas y fisiológicas, los círculos oscuros pertenecen al BM y los claros al PA.

3.3.6. Relación entre la estructura de la llamada de anuncio, la morfometría corporal y cerebral de *S. baudinii*

Al analizar el total de variables, tanto acústicas como morfométricas y fisiológicas, estas presentaron características propias que definen las poblaciones del BM y PA de manera individual (ver capítulos I, II y III). El análisis de función discriminante mostró que ambas poblaciones son diferentes con ningún organismo mal clasificado y una $p= 0.0155$ (Fig. 13)

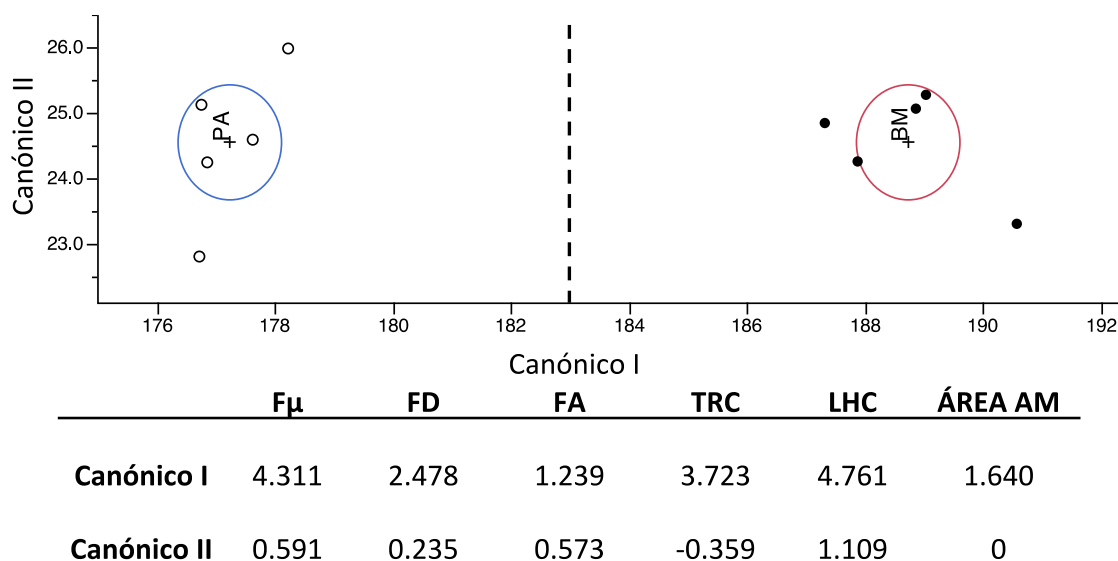


Figura 13. Análisis de función discriminante donde se observa el agrupamiento de los organismos de acuerdo a la condición del hábitat en función de los valores dados para el canónico I y II del conjunto de variables acústicas, morfométricas y cerebrales, los círculos oscuros pertenecen al BM y los claros al PA.

3.4. Discusión

La rana *S. baudinii* presentó un canto simple de una sola nota que se repite constantemente, este tipo de canto es común en los anuros de la familia Hylidae (Martins y Jim, 2003; Bernal *et al.*, 2004). La FD de *S. baudinii* (1.81 kHz) se encuentra entre los valores reportados para los Hylidos, *Hyla larinopygion* (1.66 kHz; Bernal *et al.*, 2004), *Hyla nana* (2.95 a 4.85 kHz; Martins y Jim, 2003) e *Hyla sanborni* (3.86 a 5.95; Martins y Jim, 2003). La FF fue más alta (2.66 ± 0.628 kHz) que la FF para ranas del Género *Hyloscirtus* de la Familia Hylidae y el tiempo promedio de duración (362 ms) se encuentra dentro de los valores reportados (210 a 547 ms) para este mismo grupo de especies (Almendáriz *et al.*, 2014; Coloma *et al.*, 2012). Los resultados de este estudio muestran que del total de los elementos que componen la llamada de anuncio de *S. baudinii* únicamente la FA mostró ser estadísticamente diferente, siendo mayor en los sitios con PA (1.74) que los de BM (0.70), lo que significa que los organismos del BM están emitiendo llamados de baja frecuencia y alta intensidad. De acuerdo con Duellman y Pyles (1983), la frecuencia de llamado decrece con el tamaño de los individuos. Estos resultados son interesantes, puesto que se ha reportado que los machos que cantan con frecuencias más bajas son más exitosos reproductivamente, ya que las hembras muestran preferencias por llamadas graves, que corresponden a machos más grandes como los registrados en el BM en este estudio (Castellano *et al.*, 2000; Lodé y Le Jacques, 2003; Gerhardt, 2005;; Bosch, 2014). Aunque lo anterior podría estar indicando que los machos del BM son más exitosos en la atracción de las hembras que los machos de los sitios con PA, es importante destacar que dado que los machos de los sitios con PA fueron significativamente más pequeños y menos pesados y con cabezas de menor tamaño las hembras en este tipo de hábitat podrían estar seleccionando a estos individuos en ausencia de individuos mas grandes. En cuanto a la variación temporal (anual) en los elementos de la llamada de anuncio, los individuos grabados en 2014 presentaron valores significativamente más altos en las cuatro variables (FF, FD, Amplitud y tiempo). Este cambio puede ser explicado debido a que los individuos registrados en el año 2014 en el BM fueron más pesados y presentaron mayor índice de condición corporal. Se ha reportado que en organismos que utilizan la vocalización durante el cortejo, la variación en

las características del canto pueden estar relacionadas con cambios en el Pgr y la condición del individuo (Mager et al., 2007; Brumm, 2009). También se ha demostrado que la condición del cuerpo puede cambiar sustancialmente (ya sea por limitación de recursos alimenticios o como resultado del gasto energético relacionado con la llamada de anuncio), aún en periodos cortos de tiempo y afectar en consecuencia el comportamiento reproductivo (Humfeld, 2013). Así mismo, tanto la FA como la F_{μ} de la llamada de anuncio presentaron una relación negativa con la LHC y con el tamaño de la región cefálica (TRC), ésta relación también ha sido demostrada por Bee et al. (2000) para *Rana clamitans*. En este sentido, el análisis de función discriminante separó a los individuos del BM de los de los sitios con PA en respuesta a la FA, la F_{μ} y la FD. Aunque se ha predicho que la estructura de las señales acústicas pueden estar relacionadas con la estructura del hábitat, en particular en aves y monos (Job et al., 2016), en el caso de los anfibios estas diferencias pueden estar más asociadas con diferencias en el tamaño del cuerpo (Zimmerman, 1983). Por otro lado, los organismos recolectados de *S. baudinii* en el bosque tropical seco de Chamela, Jalisco, no presentaron diferencias significativas al comparar tanto el tamaño de los centros cerebrales AM y APO como su densidad neuronal entre el BM y los sitios con PA. Sin embargo, al relacionar la densidad del AM con el número de cortes por intervención, se observa una correlación positiva, es decir aquellos individuos que presentan mayor densidad neuronal, emiten un mayor número de cortes por intervención teniendo como resultado llamadas de anuncio más complejas. Esta interacción que hay entre los centros cerebrales y la estructura de la llamada de anuncio puede ser explicada mediante la teoría del estrés a edades tempranas del desarrollo, la cual argumenta que, aquellos organismos que sufren altos niveles de estrés durante sus primeras etapas de vida, llegan a comprometer el desarrollo cerebral para sobrevivir, lo cual se refleja en vocalizaciones menos complejas (Nowick et al., 1998; Nowick et al., 2002; MacDonald et al., 2006). Finalmente el análisis del total de las variables estudiadas, tanto acústicas como morfométricas y fisiológicas mostró que la estructura de la llamada de anuncio de los sitios con PA es distinta a la de los sitios del BM y está principalmente influenciada por las características morfológicas de los individuos y que los individuos que presentan mayor tamaño de los centros neuronales y densidad neuronal tienen llamados de anuncio más

complejos sin importar el tipo de hábitat en el que se encuentren. En este sentido, la perturbación del hábitat está ejerciendo un fuerte impacto sobre la estructura de la llamada de anuncio de *S. baudinii*, lo cual podría tener consecuencias futuras para la especie, ya que podría ocurrir una barrera de comunicación entre las poblaciones de los BM y la de los sitios con PA.

3.5. Conclusiones

Los organismos del BM presentan llamadas de anuncio estructuralmente diferentes a las de los que habitan en sitios con PA. Esta diferencia se observa en la FA; en el BM las llamadas tienen puntos de baja frecuencia en el pico de máxima amplitud, lo que hace que atraviesen una mayor cantidad de obstáculos y en consecuencia lleguen a mayor distancia del sitio de emisión.

Así mismo, la llamada de anuncio de *Smilisca baudinii*, presenta una estructura diferente en la interacción tratamiento*año, en el 2014 se encontraron llamadas cuyos valores de FD, FF, amplitud y tiempo mayores que las registradas en el 2015. Éste comportamiento está asociado al factor de condición corporal, el cual fue mayor durante el 2014. Con respecto a los valores de las frecuencias, supondrían una desventaja en cuanto a la selección sexual; sin embargo, la amplitud y el tiempo son propios de cantos más largos e intensos, que tienen sentido como llamadas más atractivas, por lo que es plausible suponer que las altas frecuencias, sean propias de un modelo adaptativo para evadir depredación, ya que son más difíciles de localizar.

Además, el hecho de que la F_{μ} haya sido menor en los organismos colectados en el BM durante la temporada 2014, es indicativo que es en esta combinación de temporalidad y grado de conservación, donde se encontraron los organismos con mejores características morfológicas y morfométricas asociadas a la estructura de la llamada de anuncio. Puesto que la frecuencia de los organismos está relacionada al tamaño del cuerpo y de la región cefálica de los mismos, tallas grandes se asocian con frecuencias bajas, por lo que, la población del BM se caracteriza como por presentar llamadas más atractivas,

siendo la variable más explicativa la FA. De las variables que no se relacionan con la talla de los organismos, el número de cortes por intervención, esta relacionado con la densidad neuronal del núcleo amigdalino medial. Sin embargo, las variables cerebrales no responden a los tratamientos y las poblaciones del BM y de las zonas con PA no se diferencian de ninguna forma.

Finalmente los resultados de este estudio permiten hipotetizar que de continuar la modificación y perturbación de los hábitats en donde habitan especies que emiten llamados de anuncio, como es el caso de *S. fodiens*, podría ocurrir una barrera acústica entre las poblaciones de esta especie, con diversas consecuencias para esta especie que podrían ir desde la pérdida de diversidad genéticas mediante un proceso de endogámica, hasta un proceso de selección evolutiva en respuesta a la perturbación del hábitat.

3.6. Literatura citada

Augusto Silva R. 2007. Influência da heterogeneidade ambiental na diversidade de, uso de hábitat e bioacústica de anuros de área aberta no noroeste paulista. Tesis de Maestría. Instituto de biociências, letras e ciências exatas. Universidade Estadual Paulista: 94 pp.

Almendáriz, A., J. Brito, D. Batallas y S. Ron. 2014. Una especie nueva de rana arbórea del género *Hyloscirtus* (Amphibia: Anura: Hylidae) de la Cordillera del Cóndor. *Papéis Avulsos de Zoologia* (São Paulo) 54(4): 33-49.

Barrio, A. 1965. El género *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae) en la Argentina. *Physis* 25 (70): 421-428.

Bernal, M. H., D. P. Montealegre y C. A. Páez. 2004. Estudio de la vocalización de trece especies de anuros del municipio de Ibagué, Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 28(108): 385-390.

Bioacoustics Research Program. 2013. Raven Pro: Interactive Sound Analysis Software Versión 1.5. (Computer Software). Ithaca, NY: The Cornell Lab of Ornithology. Available from <http://www.birds.cornell.edu/raven>.

- Bucio P. F. E. 2012, Variaciones morfológicas del área preóptica hipotalámica y de la amígdala medial en la rana macho de la especie *Diaglena spatulata*, y su relación con la sucesión secundaria del bosque tropical seco en la región de Cuixmala-Chamela, Jalisco, Tesis de Licenciatura, Fac. de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México: 39pp.
- Brumm H. 2009. Song amplitude and body size in birds. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63:1157–1165.
- Bosch, J. 2014. Sapo partero común – *Alytes obstetricans*. In: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Salvador, A. e I. Martínez-Solano (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>
- Castellano, S., C. Giacoma y T. Dujsebayeva. 2000. Morphometric and advertisement call geographic variation in polyploid green toads. *Biological Journal of the Linnean Society* 70(2): 341-360.
- Cocroft, R. B. y M. J. Ryan. 1995. Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. *Animal Behaviour* 49(2): 283-303.
- Coloma, L.A., S. Carvajal-Endara, J. F. Dueñas, A. ParedesRecalde, M. Morales-Mite, D. Almeida-Reinoso, E. E. Tapia, C. R. Hutter, E. Toral y J. M. Guayasamin. 2012. Molecular Phylogenetics of stream treefrogs of the *Hyloscirtus larinygion* group (Anura: Hylidae), and description of two new species from Ecuador. *Zootaxa* 3364: 1-78.
- Escalante, I. 2013. Comportamiento de canto, descripción de las vocalizaciones y su posible variación geográfica en Costa Rica en *Myiothlypis fulvicauda*. Zeledonia. *Boletín de la asociación ornitológica de Costa Rica* 17 (1): 35-53.
- Gerhardt, H. C. 2005. Advertisement-Call Preferences in Diploid-Tetraploid Treefrogs (*Hyla chrysoscelis* and *Hyla versicolor*): Implications for Mate

- Choice and The Evolution of Communication Systems. *Evolution* 59(2): 395-408.
- Given, M. F. 2005. Vocalizations and reproductive behavior of male Pickerel frogs, *Rana palustris*. *Journal of herpetology* 39(2): 223-233.
- Job, J. R., S. L. Kohler y S. A. Gill. 2016. Song adjustments by an open habitat bird to anthropogenic noise, urban structure, and vegetation. *Behavioral Ecology*, arw105.
- Ludwing J. 1996. Observaciones de patrones de actividad en las especies *Eleutherodacrylus ridens*, *E. golmerii* y *E. cruentus* en la reserva forestal de San Ramón. *Revista de pensamiento actual* 2: 113-119.
- MacDonald, I. F., B. Kempster, L. Zanette y S. A. MacDougall-Shackleton. 2006. Early nutritional stress impairs development of a song-control brain region in both male and female juvenile song sparrows (*Melospiza melodia*) at the onset of song learning. *Proceedings of the Royal Society of B* 273: 2559-2564.
- Mager, J. N., C. Walcott y W. H. Piper. 2007. Male common loons, *Gavia immer*, communicate body mass and condition through dominant frequencies of territorial yodels. *Animal Behaviour* 73 (4): 683-690.
- Nowicki, S., S. Peters y J. Podos. 1998. Song learning, early nutrition and sexual selection in songbirds. *American Zoologist* 38(1): 179-190.
- Nowicki, S., W. Searcy y S. Peters. 2002. Brain development, song learning and mate choice in birds: a review and experimental test of the "nutritional stress hypothesis". *Journal of Comparative Physiology A* 188(11-12): 1003-1014.
- Orozco, R. J. 2012. Morfometría geométrica de la región cefálica de la rana pico de pato (*Diaglena spatulata*) en diferentes estadios sucesionales del bosque tropical seco en la Región de Chamela-Cuixmala, Jalisco, México. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 43pp.
- Rojas M. J. A. y S. Escobar. 2011. Comportamiento reproductivo, vocalizaciones, selección de pareja y mortalidad de las nidadas en la rana de cristal

- Centrolene savagei* (Anura: Centrolenidae). Tesis de licenciatura. Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad de Caldas. 77 pp.
- Ryan, M. J. 1980. Female mate choice in a neotropical frog. *Science* 209(4455): 523-525.
- Salas, N. E., M. V. Zavattieri, I. E. Di Tada, A. L. Martino y M. E. Bridarolli, 1998, Bioacustical and etho-ecological features in amphibian communities of Southern Córdoba province (Argentina). *Cuadernos de herpetología* 12 (1): 37-48.
- SAS Institute. 2010a. JMP Modeling and Multivariate Methods, versión 9.01©. SAS Institute.
- SAS Institute. 2010b. Using JMP, versión 9.01©. SAS Institute.
- Smith, M. J., J. D. Roberts, T. J. Hammond y R. A. Davis. 2003. Intraspecific variation in the advertisement call of the sunset frog *Spicospina flammocaerulea* (Anura: Myobatrachidae): a frog with a limited geographic distribution. *Journal of herpetology* 37(2): 285-291.
- Sueur, J., T. Aubin, C. Simonis, E. C. Brown, C. Desjonqueres, A. Gasc, E. LaZerte, J. Lees, L. Lellouch, L. J. Pavoine, Villanueva-Rivera, Z. Ross y C. G. Witthoft. 2014. seewave Package Sound analysis and Version 1.7.6.
- Sullivan, B. K. y W. E. Wagner Jr. 1988. Variation in advertisement and release calls, and social influences on calling behavior in the Gulf Coast toad (*Bufo valliceps*). *Copeia* 1988 (4): 1014-1020.
- Toledo, L. F., I. A. Martins, D. P. Bruschi, M. A. Passos, C. Alexandre y C. F. Haddad. 2015. The anuran calling repertoire in the light of social context. *Acta ethologica* 18(2): 87-99.
- Urbanek S., H. J. Bibiko y S. M. Iacus. 2012. R.app GUI 1.60 (6476 Snow Leopard build) © Versión 3.0.0. R Foundation for Statistical Computing.
- Zimmerman, B. L. 1983. A comparison of structural features of calls of open and forest habitat frog species in the central Amazon. *Herpetologica* 39 (3): 235-246.

Conclusión general

A partir de los resultados encontrados, se puede concluir que la condición de conservación de los sitios tiene un efecto sobre la morfología y morfometría de los machos de *Smilisca baudinii*, ya que las pruebas realizadas permiten sostener que en el BM se encuentran organismos más grandes y pesados con cabezas más grandes y redondeadas. En este sentido la talla fue un atributo de suma importancia para los machos, esta se relaciona directamente con la frecuencia en la que emiten la llamada de anuncio, siendo para machos grandes, llamadas de anuncio de baja frecuencia (tonos graves) y para machos pequeños llamadas de alta frecuencia (tonos agudos).

Aunque los atributos neurales de los organismos no difieren entre las condiciones de hábitat tratadas, la densidad neuronal del núcleo amigdalino medial se relaciona con el número de cortes por intervención, presentando cantos más complejos aquellos individuos que poseen mayor densidad neuronal. Así mismo, se encontró que la estructura de la llamada de anuncio fue diferente entre el BM y las zonas con PA, esta se caracteriza principalmente por que la FA es baja en el BM y alta en las zonas con PA. Aunado a esto, también se observó que el factor de condición corporal de los organismos en el año 2014 fue mayor que en los encontrados en el 2015. Aun que no se tienen los elementos suficientes para una explicación plausible respecto de este fenómeno, se encontró que el factor de condición se relaciona con la llamada de anuncio puesto que los elementos que componen la llamada de anuncio entre los machos de ambas temporadas de muestreo, fue distinta. En este sentido en el 2014 en ambas condiciones de hábitat se registraron llamadas de anuncio más prolongadas, e intensas, las cuales son características favorables para la selección de pareja.

El hecho de que los machos del BM son más grandes con cantos de frecuencias bajas, y por consiguiente pudieran ser más exitosos en la selección de pareja como se ha reportado en la literatura y por el otro lado, que los machos de los sitios con PA son significativamente más pequeños y menos pesados y con cabezas de menor tamaño con cantos de frecuencias altas,

permite hipotetizar que las hembras en este tipo de hábitat podrían estar seleccionando a estos individuos en ausencia de individuos mas grandes y de continuar la modificación y perturbación de los hábitats, podría desencadenarse un aislamiento acústico y en consecuencia ocurrir un proceso de selección evolutiva en respuesta a la perturbación del hábitat.