



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**INSTITUTO DE BIOLOGÍA**  
**BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

**Efecto de la fragmentación y perturbación del hábitat en dos especies  
de anuros del interior de selva en Los Tuxtlas, Veracruz**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**NOEMÍ MATÍAS FERRER**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. BERTHA PATRICIA ESCALANTE PLIEGO  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM**

**DR. JOSÉ JAIME ZÚÑIGA VEGA  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

**CIUDAD DE MÉXICO.**

**Agosto 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 29 de junio de 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **MATÍAS FERRER NOEMÍ** con número de cuenta **504008436** con la tesis titulada: **"EFECTO DE LA FRAGMENTACIÓN Y PERTURBACIÓN DEL HÁBITAT EN DOS ESPECIES DE ANUROS DEL INTERIOR DE SELVA EN LOS TUXTLAS, VERACRUZ"**, realizada bajo la dirección del **DRA. BERTHA PATRICIA ESCALANTE PLIEGO**:

Presidente:	DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
Vocal:	DR. JUAN ESTEBAN MARTÍNEZ GÓMEZ
Secretario:	DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES
Suplente:	DR. VÍCTOR ARROYO RODRÍGUEZ
Suplente	DR. VÍCTOR HUGO REYNOSO ROSALES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx, a 21 de junio de 2016.

  
**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

## **AGRADECIMIENTOS**

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (No. becario 226707) para estudios de Doctorado (Febrero 2009-2013), así como por la Beca Mixta 2012-2013 Movilidad al extranjero (290674) para la estancia de investigación realizada en la Universidad de Los Andes, Colombia.
- Al Fondo Mixto CONACYT-Veracruz-Ignacio de la Llave por el apoyo otorgado al proyecto “Monitoreo, fragmentación del hábitat y genética poblacional para la conservación de vertebrados en estatus de riesgo en la Reserva de la Biósfera de los Tuxtlas” No. VER-2008-C02-109298 con el que se obtuvo el financiamiento para el presente proyecto.
- A la Dra. Bertha Patricia Escalante por la dirección del proyecto de tesis.
- A los Miembros del Comité tutorial, Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales y Dr. José Jaime Zúñiga Vega por su asesoría y sugerencias durante los estudios del Doctorado.

## AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

- A la Dra. Patricia Escalante Pliego por la dirección del proyecto del proyecto de tesis por sus sugerencias y principalmente por su confianza.
- A los miembros del Jurado: Dr. Daniel Piñero Dalmau, Dr. Juan Esteban Martínez Gómez, Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales, Dr. Victor Hugo Reynoso Morales y Dr. Víctor Arroyo por las valiosas sugerencias y aportaciones al presente trabajo.
- A la Biól. Rosamond Coates por la extensión del permiso de colecta científica así como por su apoyo y conexión con las comunidades de la Reserva de la Biosfera Los Tuxtas (Veracruz).
- Al M. en C. Ryamundo Mineros Ramírez y Ramiro Sinaca por su invaluable apoyo en el campo y por compartir su fascinación por las ranas.
- A la M. en C. Isabel Herrera por su apoyo en la elaboración de los mapas.
- Un agradecimiento especial al grupo Ecoturístico El Apompal, a la comunidad de Las Margaritas y la Reserva Ecológica Nanciyaga, por su apoyo y hospitalidad que fue fundamental para la obtención de las muestras en la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas, así como al Parque Ecológico Jaguaroundi por las facilidades otorgadas para el trabajo en la región.
- A la M. en C. Laura Márquez responsable del Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud por su gran apoyo para la genotipificación de los microsátélites.
- A mis compañeros de la CNAV, Jonathan, Flavia, Alejandra, David, Marisela y Miguel Angel así como a mi hermano Fernando Matías por su gran apoyo en el campo y en el laboratorio.
- Al Dr. Carlos Olivares Urbina (†), por ser un gran amigo.
- A mis grandes amigos Martha Esteva, Rodolfo Pérez, Patricia Frías, Erika Pagaza y Noé González, por su amistad y cariño, por estar en las buenas y en las malas.
- A mi familia y principalmente a mis padres quienes han estado siempre presentes.

# ÍNDICE

---

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCION GENERAL .....	3
HIPÓTESIS .....	14
MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
ÁREA DE ESTUDIO .....	17
ESPECIES DE ESTUDIO .....	21
RESULTADOS .....	26
CAPÍTULO I.	
Asimetría fluctuante, talla y condición corporal en <i>Agalychnis calidryas</i> y <i>Dendrosophus</i> <i>ebraccatus</i> en Los Tuxtlas, Veraruz (México) .....	27
CAPÍTULO II.	
Variación genética de dos especies de anuros ( <i>Agalychnis callidryas</i> y <i>Dendropsophus</i> <i>ebraccatus</i> ) ante la perturbación de la selva alta perennifolia. ....	36
DISCUSIÓN FINAL. ....	77
LITERATURA CITADA. ....	84

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

---

Cuadro 1. Sitios de muestreo, tipo de hábitat y abreviaturas de cada sitio en la Reserva de la Biosfera los Tuxtlas (RBLT) y del Parque Ecológico Jaguaroundi (PEJ) .....	19
Figura 1. Área de estudio y sitios de muestreo en la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas y Parque Ecológico Jaguaroundi (Veracruz, Mexico) .....	20
Figura 2 <i>Agalychnis callidryas</i> (Rana de ojos rojos) .....	25
Figura 3. <i>Dendropsophus ebraccatus</i> (Ranita reloj de arena) .....	25

## RESUMEN

---

Las selvas tropicales son de los ecosistemas mayormente afectados por actividades antropogénicas, lo que ha dado como resultado la modificación del hábitat de muchas especies de especies de plantas y animales. Por tanto, es crucial entender como los cambios en el ambiente afectan a las especies y entonces proponer estrategias de conservación. La alteración del hábitat puede llevar a la fragmentación y aislamiento de las poblaciones, así como cambios en caracteres fenotípicos y en la variación genética poblacional. A pesar de la gran diversidad biológica de las regiones tropicales, la mayoría de los estudios para entender los efectos de las modificaciones del hábitat se han realizado con especies de zonas templadas. Entre los vertebrados, los anfibios es el grupo menos estudiado. En el presente trabajo, se evaluó la respuesta de dos especies de ranas arborícolas (*Agalychnis callidryas* y *Dendropsophus ebraccatus*) a las modificaciones de su hábitat en la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas (RBLT) y en el Parque Ecológico Jaguaroundí (PEJ). Particularmente, se evaluó el grado de perturbación del hábitat sobre la talla, la condición corporal (índice de masa escalada) y los niveles de asimetría fluctuante (AF) en tibia y fémur para cada especie. Se evaluó también la variación genética dentro y entre las poblaciones remanentes, utilizando cinco loci de microsatélites. En total, se obtuvieron muestras de 11 sitios de la RBLT y tres del PEJ. Los sitios se clasificaron en cuatro categorías de perturbación. 1) sin perturbación, 2) perturbación baja, 3) perturbación intermedia y 4) perturbación alta. Para los análisis de variación genética, cada población se analizó por separado. Los resultados indican que *D. ebraccatus* mostró una reducción de la talla y condición corporal a una mayor perturbación. En *A. callidryas*, los resultados no fueron significativos. Respecto a los niveles de AF, en ninguna de las dos especies se encontró un incremento relacionado con la perturbación del hábitat. Respecto a la variación genética, los índices de diversidad presentaron valores de bajos a intermedios en ambas especies. Sin embargo, las diferencias no fueron significativas. En la mayoría de las poblaciones, se detectaron indicios de reducción y aislamiento poblacional como la presencia de alelos únicos, endogamia, cuellos de botella y un alto parentesco entre individuos, principalmente en *A. callidryas*. La diferenciación genética entre las poblaciones es significativa en más de la mitad de las comparaciones, lo cual puede ser resultado de los procesos demográficos mencionados. En general, *D. ebraccatus* resultó menos afectada que *A. callidryas* por las modificaciones en el hábitat. Por tratarse de una especie pequeña, los requerimientos de hábitat pueden ser menores, por lo que los parches de hábitat pueden reunir los recursos suficientes para mantener poblaciones relativamente estables, a diferencia de *A. callidryas* que requiere de estanques específicos para la reproducción. En ambientes perturbados, la pérdida en la conectividad es una de las principales consecuencias, sin embargo, en las especies aquí estudiadas, la frecuencia e intensidad de las lluvias pueden ser de los factores clave en el mantenimiento del flujo génico. En la temporada de lluvias, la humedad puede reducir factores de estrés como la intensidad de la luz y la desecación. Además, la permanencia y formación de los estanques reproductivos es mayor. Por tanto, en esta época se puede favorecer la dispersión de los individuos. Sin embargo, estos eventos no son suficientes, si el hábitat no reúne los recursos básicos para que los individuos cumplan con el ciclo de vida. Por lo anterior, es urgente la recuperación del hábitat mediante la creación de estanques nuevos en zonas conservadas y perturbadas. Además, es importante reducir otros factores de riesgo, como la extracción ilegal de individuos y la modificación continua de los estanques.



## ABSTRACT

---

Tropical forests are the ecosystems most affected by anthropogenic activities, which has resulted in the modification of habitat of many species of plants and animals. Therefore is crucial to understand how changes in the environment affect the species and thereby propose conservation strategies. Habitat alteration can lead to fragmentation and isolation of populations and changes in phenotypic traits and genetic variation in the population. Despite the high biodiversity in tropical regions, most studies to understand the effects of habitat changes have been made with temperate species. Among vertebrates, amphibians are the least studied group. In the present work, the response of two species of tree frogs (*Agalychnis callidryas* and *Dendropsophus ebraccatus*) to changes in their habitat was assessed from the Reserve of the Biosphere Los Tuxtlas (RBLT) and Jaguarundi Ecological Park (PEJ). In particular, the degree of habitat disturbance on body size, body condition (mass index scaled) and the fluctuating asymmetry levels (FA) in tibia and femur for each species was evaluated. Also, genetic variation within and among the remaining populations were evaluated using five microsatellite loci. In total 11 sites from RBLT three sites from PEJ were sampled. The sites were classified into four categories perturbation. 1) undisturbance), 2) low disturbance, 3) intermediate disturbance and 4) high disturbance. For genetic variation, each population was analyzed separately. The results indicate that *D. ebraccatus* showed a reduction in size and body condition to high disturbance. The results of *A. callidryas* were not significant. Regarding FA levels in either species the increase are related habitat disturbance. With regard to genetic variation, diversity indices had low to intermediate values in both species, but the differences were not significant. In most populations, evidence of reduction and isolation population, presence of unique alleles, inbreeding, bottlenecks and high relatedness between individuals, mainly in *A. callidryas*. Genetic differentiation between the populations is significantly in more than half of the comparisons, which can result from the aforementioned demographic processes. Overall, *D. ebraccatus* was less affected than *A. callidryas* by habitat changes. Since this is a small species, habitat requirements may be smaller, so habitat patches can together enough resources to support fairly stable populations, unlike *A. callidryas* which requires specific ponds for breeding. In disturbed environments, the loss in connectivity is one of the main consequences, however, the species studied here; the frequency and intensity of rainfall can be a key factor in maintaining gene flow. In the rainy season, humidity can reduce stress of the factors such as the intensity of light and desiccation. In addition, the creation and permanence of breeding ponds is higher. Consequently, at this time it can promote the dispersion of individuals. However, these events are not enough, if the habitat does not have the basic resources for individuals to comply with the life cycle. Therefore, it is urgent the habitat recovery by creating new ponds in conserved and perturbed areas. Additionally, to reduce other threat factors such as illegal individual extraction and the continuous modification of the ponds.

## INTRODUCCION GENERAL

---

La acelerada transformación de los ecosistemas naturales que han provocado las actividades humanas ha tenido como resultado la pérdida, fragmentación y degradación del hábitat natural, siendo las regiones con mayor biodiversidad las más afectadas (Laurance 2010). Este es el caso de los bosques tropicales (Dirzo y Raven 2003), los cuales son de los ecosistemas que presentan los mayores índices globales de deforestación y fragmentación (Gibbs *et al.* 2010, FAO 2011), causados por actividades como la agricultura, la ganadería, la urbanización, las carreteras y la explotación forestal (Saunders *et al.* 1991, Gardner *et al.* 2010). La fragmentación del hábitat es definida como un proceso en la escala del paisaje en el cual un hábitat continuo es dividido en fragmentos de hábitat de menor tamaño inmersos en una matriz formada por campos agrícolas, pastizales ganaderos, carreteras y asentamientos humanos (Saunders *et al.* 1991). La fragmentación no sólo significa la pérdida y reducción del hábitat, sino también, el incremento de los efectos de borde y la reducción o pérdida de la conectividad (Fahrig 2003), procesos que pueden tener como consecuencia la reducción del rescate y tamaño poblacional (Baguette y Schtickzelle 2003 y Cronin 2004).

La fragmentación provoca cambios en las condiciones bióticas y abióticas en el interior de los fragmentos de vegetación remanentes, causados por el incremento de los efectos de borde en el paisaje (Murcia 1995). Por ejemplo, la temperatura del ambiente y la intensidad de la luz se incrementan mientras que la humedad del suelo disminuye (Murcia 1995, Kapos *et al.* 1997, Didham y Lawton 1999, Pollock *et al.* 2015). Estos cambios pueden tener repercusiones en la composición y abundancia de las especies, la estructura del hábitat, la intensidad de diversos procesos ecológicos, la distribución, los patrones de actividad y en la morfología de los individuos (Lips 1999, Visco y Sherry 2015, Sekercioglu *et al.* 2002, Tuff *et al.* 2016). Por lo

tanto, las nuevas condiciones en los fragmentos (e.g. incremento de la temperatura), pueden provocar estrés en las poblaciones residentes y afectar la morfología, reproducción, patrones de actividad, distribución y sobrevivencia de los individuos, y en el largo plazo resultar en extinciones locales (Clarke 1993, Tuff et al. 2016).

Los cambios en la calidad del hábitat pueden afectar la disponibilidad del alimento y entonces afectar la talla y estado de salud de los individuos (Mazerolle 2001, Neckel-Oliveira y Gascon 2006, Delgado y Restrepo 2008). Además, el estrés ambiental puede incrementarse debido a la reducción de nutrientes, el incremento en la temperatura, la presencia de contaminantes químicos, el incremento del ruido, parásitos, el riesgo a la depredación así como los cambios en la estructura del hábitat y densidad poblacional (Wright y Zamudio 2002, Lauck 2006, Alford *et al.* 2007, Delgado-Acevedo y Restrepo 2008). Entonces, estas alteraciones pueden interrumpir los procesos que promueven el desarrollo de los individuos (Floate y Fox 2000, Lens *et al.* 2002) y reflejarse como un incremento en los niveles de asimetría en caracteres bilaterales ante la inestabilidad del desarrollo (Leamy y Klingenberg 2005).

La inestabilidad del desarrollo de un organismo se puede evaluar a través de la asimetría fluctuante (AF), que es un patrón de desviación aleatoria de la simetría perfecta en caracteres bilaterales y que pueden incrementarse bajo diferentes factores ambientales de estrés (Palmer y Strobeck 2003). En hábitats con disturbio alto se ha observado una relación positiva respecto a la AF (Lens *et al.* 1999, Anciaes y Marini 2000).

La pérdida y alteración del hábitat pueden disminuir la viabilidad poblacional debido a que estos factores reducen el número de individuos (Bender *et al.* 1998). Lo anterior tiene repercusiones en las tasas de crecimiento y reproducción, en la esperanza de vida, los periodos reproductivos, en los patrones de actividad, en la distribución (Hanski y Ovaskainen 2000), en la dispersión (Gibbs 1998), así como en el uso del hábitat (Bender *et al.* 1998). Todos estos efectos

provocan cambios en la estructura demográfica, con consecuencias en los patrones de diversidad genética poblacional ya que los índices de riqueza pueden disminuir, así como incrementar endogamia, los procesos de deriva génica, cuellos de botella y la pérdida del flujo génico (Young *et al.* 1996, Eckert *et al.* 2008). En el largo plazo puede resultar en la erosión de la diversidad genética adaptativa y neutral (Reh y Seits 1990, Young *et al.* 1996, Keyghobadi 2007, Eckert *et al.* 2008).

La diversidad genética adaptativa tiene un efecto directo sobre la adecuación de los individuos. Por otro lado, cuando la diversidad genética no está influenciada por la selección natural entonces se considera neutral (Holderegger *et al.* 2006). Ante la pérdida de la variación genética, la habilidad de las poblaciones para responder a los cambios ambientales disminuye y por tanto al pérdida del potencial evolutivo (Allendorf y Luikart 2007).

La diversidad genética es una característica de la población que puede ser particularmente susceptible a la distribución del hábitat, por ello es muy importante evaluar el grado en que la perturbación antropogénica afectan la variación genética de las poblaciones. La perturbación del hábitat puede llevar al incremento en diferenciación genética entre poblaciones, si la conectividad entre las poblaciones se reduce debido a que los procesos de deriva génica prevalecen sobre el flujo génico (Ouborg *et al.* 2006, Frankham 2005, Levy *et al.* 2013, Méndez *et al.* 2014). Si el flujo génico es restringido, ante la reducción de la inmigración, la recolonización se puede dificultar y entonces la viabilidad de las poblaciones se ve comprometida al grado que puede derivar en extinciones locales (Brown y Kodric-Brown 1977, Harrison 1991, Semlitsch y Bodie 1998, Frankham 2005, Hamer y McDonell 2008, Richardson 2012).

La reducción de la variabilidad genética también ha sido reportada después de que ha ocurrido la fragmentación causada por la creación de caminos y carreteras, y se ha evidenciado por la pérdida de alelos raros, la reducción en la heterocigosidad, hasta la completa fijación de

alelos que resultan en el incremento de la endogamia (Holderegger y Di Giulio 2010). Además, altos índices de endogamia están relacionados con una adecuación y fecundidad bajas (Keller y Waller 2002, Reed y Frankham 2003), lo cual puede incrementar la mortalidad y reducir el reclutamiento, y por tanto, el efecto de rescate poblacional.

Las poblaciones particularmente susceptibles a la pérdida de la diversidad genética son las que tienen un tamaño poblacional pequeño debido a procesos de deriva génica, y en última instancia, por los efectos de depresión por endogamia (Beebee y Griffiths 2005, Frankham 2005). Esto se debe a la acumulación de mutaciones deletéreas y la pérdida del potencial adaptativo (Lynch 1996, Lande y Shannon 1996). Entonces, la habilidad de estas poblaciones para responder a los cambios en el hábitat pueden limitarse (Dodd y Smith 2003, Reed y Frankham 2003, Johansson *et al.* 2007) y entonces el riesgo de extinción local es mayor (Young *et al.* 1996, Reed y Frankham 2003, Frankham 2005, Hamer y McDonnell 2008, Richardson 2012).

Los efectos inmediatos en la composición genética dependen principalmente del tamaño efectivo poblacional remanente, del patrón de diversidad genética de la población original antes de la fragmentación, y de la tasa de migración de individuos entre las poblaciones remanentes (Bates 2000, Meyer *et al.* 2008). Sin embargo, la intensidad de los efectos negativos sobre la variación genética pueden menguarse (Van Houtan *et al.* 2007, Bowie 2011, Callens *et al.* 2011) acorde a las características de historia de vida asociadas a los procesos de dispersión (e.g. Zuckerberg *et al.* 2014) y a las preferencias de hábitat (Blanchet *et al.* 2010, Di Leo *et al.* 2010, Lange *et al.* 2010).

Las características del paisaje también pueden influir en la magnitud de la respuesta en las modificaciones del hábitat (e.g. tipo y calidad de la matriz, presencia de barreras físicas como caminos o cercas vivas), ya que pueden limitar la dispersión y por tanto el flujo génico. Estas respuestas pueden incrementar el número de individuos relacionados (i.e. endogamia) y reducir la

diversidad genética poblacional en paisajes fragmentados (Reh y Seitz 1990, Cook *et al.* 2002, Keyghobadi 2007).

Los cambios en el paisaje afectan la densidad poblacional (Revilla y Wiegand 2008) y, ante un incremento en la mortalidad de los individuos (Fahrig *et al.* 1995) aunado a la reducción en la dispersión (Gibbs 1998), las poblaciones no pueden recolonizar después de una extinción local si la inmigración es reducida (Brown y Kodric-Brown 1977, Harrison 1991, Semlitsch y Bodie 1998). Entonces, la conectividad remanente del paisaje tiene una importancia fundamental para la estabilidad de la población (movimiento de genes, individuos, poblaciones y especies sobre múltiples escalas (Taylor *et al.* 1993, Minor y Urban 2008).

## **Modificaciones del hábitat como promotores de la declinación de anfibios**

Los anfibios son el grupo de vertebrados con mayor número de especies en vías de extinción a nivel mundial (Stuart *et al.* 2004, Shaffer *et al.* 2015). Se estima que una de cada tres especies de anfibios se encuentra en la Lista Roja de la IUCN (Baillie *et al.* 2004). En total, 21% de las especies de anfibios están críticamente amenazadas o en peligro, contra un 10% y 5% de mamíferos y aves (Baillie *et al.* 2004). La pérdida, fragmentación y degradación del hábitat se consideran como los factores principales de riesgo para los anfibios (Semlitsch 2003, Beebee y Griffiths 2005, Cushman 2006), y que impactan al 88% de los anfibios amenazados (Baillie *et al.* 2004).

La vulnerabilidad de los anfibios a las alteraciones del hábitat se debe a factores complejos relacionados con las características propias del grupo (Stuart *et al.* 2004, Cushman 2006). Por ejemplo, el potencial de dispersión de los anfibios es bajo (Gibbs 1998, Bowne y Bowers 2004) si se compara con el de aves o mamíferos (Beebee y Griffiths 2005, Blaustein y

Wake 1990, Allentoft y O'Brien 2010), incluso reptiles pequeños (e.g. Stickel y Cope 1947, Porter 1972).

La dispersión limitada de los anfibios está determinada por restricciones de tipo fisiológico. Por tratarse de seres vivos ectotermos, los anfibios invierten una gran parte del día en termoregular para evitar los efectos de temperaturas extremas (Duellman y Trueb 1986). Por tanto, el movimiento sólo ocurre durante un intervalo estrecho de condiciones ambientales y en ocasiones limitado a cortos periodos a lo largo del día y del año (Sinsch 1990).

La permeabilidad de la piel es otra de las limitantes de los anfibios a una dispersión mayor. La piel está desprovista de una cubierta que la hace altamente susceptible a evapotranspiración. Especies que habitan en regiones con humedad abundante como los bosques tropicales pueden tener un mayor riesgo a la desecación (Wells 2007).

La complejidad de los ciclos de vida de la mayoría de los anfibios también incrementa su vulnerabilidad ante los cambios del ambiente, ya que dependen de un determinado tipo de hábitat en cada etapa de su desarrollo (Blaustein *et al.* 1994, Cushman 2006, Wells 2007, Becker *et al.* 2007). Por ejemplo, en muchas especies de anfibios la metamorfosis ocurre de una larva acuática a un adulto terrestre (Wells 2007). Posteriormente, los individuos requieren hacer migraciones a sitios de alimentación y descanso. Durante esta etapa la mortalidad es mayor y entonces más vulnerable a la extinción de sus poblaciones (Biek *et al.* 2002), si la conectividad se reduce o interrumpe (Crump 2003 y Cushman 2006). La fidelidad alta a los sitios de reproducción (Duellman y Trueb 1986) también puede ser otro factor que incrementa el riesgo de extinción de las poblaciones de anfibios, debido a que la probabilidad de rescate de poblaciones recientemente extirpadas disminuye si los sitios quedan aislados o se pierden (Blaustein *et al.* 1994).

La importancia ecológica de los anfibios radica en el papel que juegan como depredadores y presas en la dinámica de los ecosistemas (Burton y Likens 1975, Gibbons *et al.* 2006), con un

efecto directo en el flujo de nutrientes entre el medio acuático y terrestre, a través de la inmigración y emigración entre ellos (Semlitsch 2003). Además, se consideran buenos indicadores de la calidad del ambiente debido a la sensibilidad alta a las alteraciones del hábitat (Semlitsch 2003).

A pesar de la vulnerabilidad de los anfibios, de su importancia, y del extenso declive poblacional documentado, los estudios que evalúan el efecto de la fragmentación de bosques y selvas tropicales aún son pocos (Crump 2003). En comparación con las zonas templadas, el Neotrópico es de las regiones con mayor riqueza y con un gran número de especies endémicas de anfibios (Crump 2003, Wells 2007). Sin embargo, es la región en donde ha ocurrido una deforestación elevada en grandes extensiones de selvas tropicales en tierras bajas y bosques templados en tierras altas dando como resultado a la pérdida y fragmentación del hábitat de los anfibios (Laurance 2010, Laurance *et al.* 2014), procesos que se consideran como los promotores principales del declive de los anfibios neotropicales (Blaustein *et al.* 1994, Semlitsch 2003, Cushman 2006, Allentoft y O'Brien 2010).

## **El declive de anfibios y deforestación de las selvas en México**

En México, se estima que existían cerca de 22 millones de hectáreas de selvas (CESPEDES 2005). De acuerdo con el Inventario Nacional Forestal, la cobertura forestal actual es de 138 041 234.3 ha, de las cuales el 10% son selvas altas y medianas (CONAFOR 2012). Sin embargo, dos terceras partes de ellas están formadas por vegetación secundaria, lo que indica el grado de alteración que este tipo de ecosistemas ha tenido a partir de su condición original (CONAFOR 2012). Las principales causas de la deforestación de las selvas tropicales están



asociadas a actividades antropogénicas como las agrícolas, forestales y la urbanización, factores que también ejercen una presión alta en los remanentes selvas (Moreno-Sánchez *et al.* 2012).

En México, la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas, Veracruz (RBLT) alberga el extremo boreal de la selva alta perenifolia (Dirzo y García 1992). Los cambios intensos en el paisaje dentro de la región se dieron a partir de 1940 con la expansión acelerada de la ganadería (González-Sierra 1991) y para finales de la década de los 80 se había perdido el 84% de la cobertura original de la selva alta perennifolia (Dirzo y García 1992). Esto ha resultado en un paisaje altamente fragmentado, en dónde los remanentes de vegetación original se encuentran dispersos entre pastizales ganaderos (potreros) y campos agrícolas (Guevara *et al.* 2004a). En 1998 es decretada como Reserva de la Biosfera como medida para conservar la alta biodiversidad que aún se presenta la región (CONANP y SEMARNAT 2006).

EL Paque Ecológico Jaguaroundí (PEJ) fue decretado como “Reserva Privada” con una extensión de 1010 ha, la cual colinda con los complejos petroleros de Coatzacoalcos (Veracruz). El parque fue creado para mitigar los impactos en el ambiente generados por actividades petroleras, ganaderas y de agricultura y para proteger y los relictos de selva alta perenifolia y otros tipos de vegetación como sabana, popal, tular, encinar tropical y vegetación acuática (Nava y Rosas 2008). Los cuales son de importancia en la conservación de la diversidad faunística de la región (Herrera *et al.* 2008).

A pesar del panorama, México es considerado como un país megadiverso ya que ocupa el cuarto lugar en diversidad de especies en el mundo (Toledo 1994, Mittermeier y Goettsch 1992), y el quinto lugar en riqueza de especies de anfibios (Ochoa-Ochoa y Flores-Villela 2006, Stuart *et al.* 2008, IUCN 2010). Sin embargo, también es el segundo país con mayor número de especies amenazadas (Stuart *et al.* 2008). Más de la mitad de las especies de anfibios mexicanos (58% = 211) están incluidas en alguna categoría de la lista roja de la IUCN (Frías *et al.* 2010), de las

cuales el 86% están en riesgo por las modificaciones del hábitat causadas por actividades humanas (Frías *et al.* 2010).

Los estudios para evaluar el efecto que los cambios en el hábitat han tenido en las poblaciones y especies de anfibios mexicanos han sido pocos. En la década de los 90 se dieron los primeros registros de extinciones locales y disminución de poblaciones de anfibios, los cuales se asociaron a la pérdida y transformación del hábitat principalmente en salamandras pletodóntidas (Parra-Olea *et al.* 1999, Rovito *et al.* 2009), aunque el declive de este grupo de anfibios también pudo estar influenciado por la quitridiomycosis (Cheng *et al.* 2011).

Otros estudios se han centrado en los cambios de las comunidades de anfibios en bosques fragmentados. La abundancia y riqueza de especies ha estado relacionada directamente con el tamaño y distancia entre fragmentos de bosque (Pineda y Halfpeter 2004, Meza-Parral y Pineda 2015, Cabrera y Reynoso 2012), pero también está influenciado por la composición del paisaje, ya que el tipo de matriz que rodea a los fragmentos (e.g. plantaciones de café, corredores riparios) es de relevancia en la conectividad entre los fragmentos de bosque remanentes y en el mantenimiento de la riqueza y abundancia de especies (Pineda y Halfpeter 2004, Meza-Parral y Pineda 2015). Por otro lado, también se ha observado una menor abundancia de individuos cuando la matriz es inhóspita (Pineda y Rodríguez-Mendoza 2010). Estos cambios en la abundancia pueden tener repercusiones en la estructura demográfica de las poblaciones.

En cuanto a los efectos de borde causados por la fragmentación de la selva, las hembras de *Craugastor locki* (una especie de hojarasca) evitan los bordes de los fragmentos de vegetación durante la reproducción, y se desplazan hacia el interior en donde las condiciones de humedad son más favorables (Urbina-Cardona y Reynoso 2009).

En cuanto a la talla corporal de las especies, se sugiere que especies de grandes y medianas potencialmente pueden cruzar la matriz y mantener la conectividad entre los parches de

hábitat, ya que fisiológicamente son menos susceptibles al estrés ambiental (Gascón *et al.* 1999, Urbina-Cardona 2005). Mientras que anfibios de talla pequeña, se consideran más susceptibles a la evapotranspiración por lo que están limitados a desplazarse grandes distancias (Mazerolle 2001). Sin embargo, también se ha observado que especies de anfibios pequeños se logran mantener en parches de hábitat muy reducidos debido a que éstos remanentes reúnen los requerimientos básicos (e.g. alimento, reproducción y refugio) para su persistencia (Semlitsch y Bodie 1998).

Por otro lado, los caracteres de historia de vida como los modos reproductivos pueden incrementar la susceptibilidad de las especies a los cambios en el hábitat. Especies terrestres, que depositan sus huevos fuera del agua tienen una susceptibilidad mayor a las alteraciones del hábitat (Semlitsch 2003, Pineda y Halfpeter 2004), ya que los huevos pueden deshidratarse rápidamente, así como son más susceptibles a depredadores (Touchon y Warkentin 2009). Las especies que utilizan la matriz se considera que pueden persistir, ya que se asume que sus poblaciones son estables, sin embargo, se desconoce si son saludables o aisladas (Urbina-Cardona 2005).

Considerando la situación actual de los anfibios, no sólo en México sino en todo el Neotrópico, resultan cruciales los estudios que permitan esclarecer los factores que están asociados a la declinación de las poblaciones de anfibios, de tal forma que se pueden proponer estrategias adecuadas de conservación, más aún en ecosistemas tropicales que albergan la mayor diversidad de especies del planeta. Por lo anterior, el presente estudio tiene como objetivo analizar los efectos que las modificaciones en el hábitat por actividades humanas (perturbación) tiene sobre caracteres fenotípicos y variación genética poblacional de dos especies de ranas arborícolas Neotropicales en paisajes fragmentados de selva alta perenifolia, en la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas y en el Parque Ecológico Jaguaroundi (Veracruz, México). Ambas regiones,

alcanzan gran relevancia ya que albergan los últimos remanentes de selva alta perenifolia del extremo boreal de su distribución. Además, de tener toda una historia de pérdida, reducción y fragmentación. Por tanto, estos sitios son buenos modelos para evaluar los efectos de estos procesos en la biodiversidad.

Este estudio hace énfasis en estanques para la reproducción (parches de hábitat) de especies de anuros que se encuentran tanto en la matriz formada por potreros, campos de cultivo y zonas urbanas así como en fragmentos y en el continuo de selva alta perennifolia. La sucesiva fragmentación de la selva puede llevar a que estos parches de hábitat queden aislados y disminuya aún más la conectividad, y que al quedar inmersos en la matriz pueden mantener hábitats de baja calidad. Por lo anterior, el presente estudio se realizó usando dos enfoques: 1) los efectos de la calidad del hábitat en un paisaje fragmentado sobre los cambios fenotípicos poblacionales como la talla, la condición corporal y la asimetría fluctuante y 2) los efectos de las modificaciones del hábitat en el flujo génico y en los patrones de variación genética poblacional mediante marcadores moleculares de microsatélites.

## HIPÓTESIS

---

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, este trabajo tiene como base las hipótesis siguientes:

1. La perturbación del hábitat causada por la fragmentación de la selva alta perenifolia reduce la talla corporal en poblaciones de anuros Neotropicales
2. La perturbación del hábitat causada por la fragmentación de la selva alta perenifolia lleva a una menor condición corporal en anuros Neotropicales
3. El estrés ambiental que resulta de la perturbación del hábitat provocará un incremento en las diferencias en caracteres bilaterales de anuros Neotropicales
4. La perturbación del hábitat lleva a la erosión genética en poblaciones de anuros neotropicales que se reproducen en estanques
5. La perturbación del hábitat impacta negativamente en el flujo génico de las poblaciones remanentes de anuros neotropicales

Se espera que ante una menor calidad del hábitat la talla y condición corporal (índice de masa escalada) disminuyan. Las diferencias entre caracteres bilaterales (asimetría fluctuante) se incrementan ante un grado mayor de perturbación del hábitat. En cuanto a la variación genética se espera la reducción en los índices de diversidad, así como la reducción del flujo génico entre las poblaciones remanentes dentro de un paisaje perturbado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### Recolecta de ejemplares

La recolecta de ejemplares se realizó en la temporada de lluvias durante los meses de julio a diciembre en los años 2009-2011. Se hicieron de dos a tres visitas nocturnas (20:00-24:00 hrs) por sitio en estanques y cuerpos de agua permanentes y semipermanentes. Los individuos fueron capturados a mano con ayuda de lámparas. Posteriormente, se llevaron al Laboratorio de la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas (UNAM) en donde se tomaron las muestras de tejido y medidas básicas para los análisis de morfológicos y de condición corporal. Una vez que se tomaron los datos y muestras se procedió a liberar los ejemplares en los lugares de recolecta. En total se obtuvieron muestras de 11 sitios, de los cuales sólo en cinco se obtuvieron muestras de *A. callidryas* y en ocho sitios se obtuvieron muestras de *D. ebraccatus* (Figura 1).

En septiembre del 2010 se tomaron las muestras del Parque Ecológico Jaguaroundi (Veracruz) que se encuentra aproximadamente a 45 km en línea recta de la Reserva de Los Tuxtlas y a 5 km de la ciudad de Coatzacoalcos. El parque tiene una extensión aproximada de 1010 ha con remanentes de selva alta perennifolia, selva mediana subperennifolia, encinares, palmares, sabanas, popales y tulares, además de vegetación acuática. La región también fue severamente perturbada por la ganadería, aunada a la agricultura y al crecimiento de la industria petrolera (Nava y Rosas 2008). En total se muestrearon tres sitios, una laguna dentro de un fragmento de selva cerca de los quemadores (JQUE), un estanque junto a la unidad habitacional La Cangrejera (JCAN) y en un estanque dentro del centro recreativo (JSAB). Estas muestras sólo se incluyeron en los análisis genéticos (Figura 1b).

## **Análisis de datos**

### **Condición del cuerpo, talla y asimetría fluctuante**

Este análisis sólo se realizó con las muestras de la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas (RBLT) por tener un número mayor de muestras por sitio y una mejor representación de las diferentes categorías de perturbación. En PEJ, los tres sitios corresponden a una categoría de disturbio intermedio, por esto no se incluyeron en los análisis. Los métodos para analizar y obtener los índices de asimetría fluctuante (AF) se hicieron acorde a Palmer (1994), Palmer y Strobeck (1992, 2003). Mientras que para calcular la condición corporal se utilizó el índice de masa escalada (SMI) propuesto por Peig y Green (2009, 2010), los cuales requieren de peso y talla corporales para su cálculo. La talla se consideró como la longitud hocico cloaca (LHC, mm). Las localidades, tamaños de muestra y análisis completos se detallan en el Capítulo 1.

### **Variación genética y estructura genético poblacional**

En el segundo Capítulo se evaluó la variación genética poblacional mediante los marcadores moleculares llamados microsatélites o STRs (*short tandem repeats*). Las muestras tomadas en cada estanque se consideraron como poblaciones distintas. Se hicieron las comparaciones generales entre los resultados de las muestras de la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas respecto a las muestras del Parque Ecológico Jaguaroundi. Los análisis que se hicieron fueron de diversidad, estructura y diferenciación genética poblacional, utilizando las frecuencias alélicas o genotípicas según el análisis empleado. En todos los casos, se realizaron las pruebas de significancia estadística para dar soporte a los resultados obtenidos. Los detalles de los análisis, tamaños de muestra y localidades se describen en el Capítulo 2.

## ÁREA DE ESTUDIO

---

El área de estudio se localiza en la Sierra de los Tuxtlas (Veracruz) desde el nivel del mar a no más de los 900 m y en la planicie costera de Coatzacoalcos (Figura 1). Los municipios que abarca son San Andrés Tuxtla en su mayor parte y Catemaco (Laborde 2004) siendo los principales poblados del área La Palma, Montepío, Balzapote, Coyame, Catemaco y San Andrés Tuxtla.

Fisiográficamente el área es una combinación de cañadas, cerros y valles. El clima es tipo cálido húmedo Am (f) el cual se caracteriza por una temperatura anual mayor a 22 °C y una precipitación menor a 60 mm en el mes más seco, con lluvias de verano con influencia de monzón. El porcentaje de lluvia invernal es mayor al 10% con respecto al total anual entre 3 000 y 4 000 mm anuales (Soto 2004).

La vegetación en la región de Los Tuxtlas está formada por fragmentos de selva alta perennifolia, vegetación secundaria y cultivos, con una extensión más o menos continua de potreros de tamaño variable aislados o continuos dependiendo de la topografía (Guevara 1995, Guevara *et al.* 2004b). Los fragmentos de selva generalmente están rodeados de potreros o campos agrícolas y se localizan principalmente en los cerros, en laderas con pendientes abruptas y en zonas de inundación pedregosas (Guevara *et al.* 2004b). En la zona de estudio la fragmentación de la vegetación nativa mantiene un patrón de islas hacia el Volcán San Martín Tuxtla unidas entre sí por corredores de vegetación ribereña localizados a las orillas de los ríos (Guevara *et al.* 2004b). En las partes bajas prácticamente los parches de vegetación nativa son pocos y la mayoría se encuentran perturbados.

El muestreo se realizó en las partes bajas desde el nivel del mar a no más de los 900 m a lo largo de toda la Reserva de la Biosfera de Los Tuxtlas (Figura 1a). La fragmentación y la



pérdida de la selva alta perennifolia ha sido tan severa que la mayoría de los sitios potenciales de reproducción de los especies de estudio actualmente se encuentran aislados y rodeados de una matriz de hábitat distinta y sólo la laguna El Zacatal y en el norte de la Laguna Catemaco representan fragmentos selva alta perennifolia. Por lo que la mayoría de los sitios de muestreo se encuentran fuera de éste tipo de vegetación (Figura 1a).

El Parque Ecológico Jaguaroundi (PEJ) se localiza a 5 km de la ciudad de Coatzacoalcos, cuenta con aproximadamente 1010 ha que incluyen cuerpos de agua. El parque colinda con los Complejos Petroquímicos “Cangrejera” y “Pajaritos” (Nava y Rosas 2008). Se ubica en la subprovincia florística Llanura Costera Veracruzana, la cual incluye el municipio de Coatzacoalcos (INEGI 1988). La altitud varía de 10 a 60 msnm. El clima es cálido húmedo con lluvias en verano Am (i')g. La zona se ve afectada por los ciclones en otoño y el verano, mientras que en el invierno, los frentes fríos son frecuentes. La temperatura promedio es de 23.4° C. La temporada de lluvias y sequías está bien marcada. La precipitación pluvial anual es de 2509 mm. Es una zona inundable debido a que desembocan las cuencas Tonalá, Lagunas del Carmen y Machona. Por su cercanía al mar, sus aguas son salobres (INEGI 1988)

El PEJ actualmente es un mosaico de fragmentos de diferentes tipos de vegetación y cuerpos de agua (Figura 1b). S encuentra dentro de la provincia florística Costa del Golfo, por lo que la flora original pudo ser de selva tropical perennifolia, así como palmares inundables y vegetación acuática. Desde la época prehispánica, el ecosistema se ha visto impactado por las actividades humanas las cuales se intensificaron con el avance de la ganadería, la agricultura, el crecimiento de la mancha urbana y la actividad petrolera incrementado su deterioro (Nava y Rosas 2008).

El muestreo se realizó en tres cuerpos de agua que se encuentran en los límites del PEJ (Figura 1b). Uno de los estanques se encuentra a la entrada de la unidad habitacional Cangrejera.

El segundo cuerpo de agua está fuera del Parque, junto a los quemadores del complejo petroquímico pero en los márgenes del PEJ. Es una laguna temporal dentro de un fragmento de vegetación secundaria. El tercer estanque se encuentra en una zona de pastizal de inundación. Los tres son cuerpos de agua con una profundidad mayor al 1 m, con vegetación circúdate y dosel.

Cuadro 1. Sitios de muestreo, tipo de hábitat y abreviaturas de cada sitio (*Abrev.*) en la Reserva de la Biosfera los Tuxtlas (RBLT) y del Parque Ecológico Jaguarondi (PEJ): *sp*: especie detectada por sitio; *A*: *Agalychnis callidryas* y *D*: *Dendropsophus ebraccatus*.

	<b>Sitio</b>	<b>Abrev.</b>	<b>Tipo de hábitat</b>	<b>sp</b>
<i>Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas (RBLT)</i>				
1	Ejido Revolución, Costa de Oro	REV	Pastizal, estanque piscícola abandonado	<i>D</i>
2	Potrero Ejido 2 de Abril	PODA	Fragmento de selva alta perennifolia < 1 ha.	<i>A</i>
3	Laguna El Zacatal	EZAC	Continuo de selva alta perennifolia	<i>A, D</i>
4	Camino a Playa Escondida	CAPE	Pastizal	<i>D</i>
5	Playa Escondida	PLES	Parche de carrizo	<i>A, D</i>
6	Laguneta de El Real, Sontecomapan	REAL	Manglar perturbado, zona urbana	<i>A</i>
7	Desviación a San Juan Seco	DSJS	Pastizal, a lado de una autopista	<i>D</i>
8	Parque Ecológico Nanciyaga	NANC	Fragmento de selva alta perennifolia > 40 ha.	<i>D</i>
9	Parque, La Jungla, Catemaco	JUNG	Fragmento de selva alta perennifolia > 40 ha (estanque artificial)	<i>A</i>
10	La Cruz, cerca de Tebanca	CRUZ	Patizal, en zona inundable	<i>D</i>
11	Las Margaritas	MARG	Parcela inundada, zona urbana	<i>D</i>
<i>Parque Ecológico Jaguarondi, Coatzacoalcos (PEJ)</i>				
12	Centro del Parque, área sabana	JAGS	Parche de selva baja primaria	<i>A,D</i>
13	Unidad Habitacional La Cangrejera	JAGC	Estanque en un parche de selva secundaria	<i>A</i>
14	Zona de Quemadores	JQUE	Laguna semipermanente, en un parche de selva baja	<i>A,D</i>

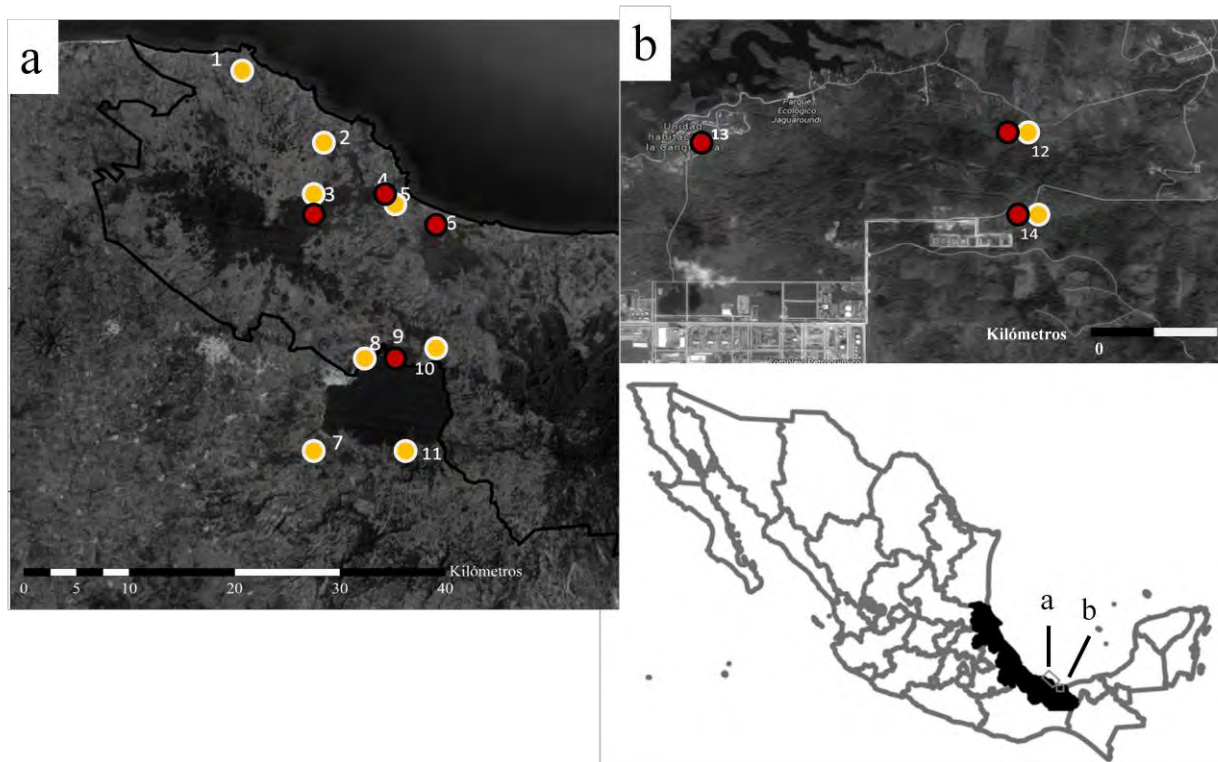


Figura 1. Área de estudio y sitios de muestreo en la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas (a) y Parque Ecológico Jaguarundi (b) (Veracruz, México). Los círculos corresponden a los sitios de muestreo para las dos especies de estudio, *Agalychnis callidryas* (en rojo) y *Dendropsophus ebraccatus* (en amarillo). Las zonas más oscuras son los remanentes de vegetación primaria. En gris las zonas de pastoreo, zonas urbanas y de agricultura. 1: REV, 2: PODA, 3: EZAC, 4: CAPE, 5: PLES, 6: REAL, 7: DSJS, 8: NANC, 9: JUNG, 10: CRUZ, 11: MARG, 12: JAGS, 13: JAGC, 14: JQUE. Mapa realizado por I. Herrera.

## ESPECIES DE ESTUDIO

---

Se seleccionaron como especies de estudio a *Agalychnis callidryas* (rana de ojos rojos) y a *Dendropsophus ebraccatus* (ranita reloj de arena), especies que han sido consideradas como vulnerables por la fragmentación y pérdida del hábitat (Solís *et al.* 2008), así como por la contaminación de los cuerpos de agua (Jungfer *et al.* 2008). Por otro lado, y contrario a lo mencionado, se ha sugerido que ambas especies persisten a una perturbación del hábitat baja, dado que se pueden encontrar en bosques secundarios y parcelas (Cedeño-Vázquez *et al.* 2006). Sin embargo, no hay estudios puntuales que apoyen estas aseveraciones (Frías *et al.* 2010).

En México, ambas especies se consideraban abundantes principalmente en selvas tropicales, sin embargo, se ha sugerido que la deforestación y cambio de uso de suelo pueden haber llevado al declive de sus poblaciones (Urbina-Cardona y Reynoso 2005, Frías *et al.* 2010). Otro de los factores que se consideran de riesgo, es que estas especies depositan sus huevos fuera del agua y sus larvas acuáticas (modo reproductivo tipo 2), con una reproducción prolongada por lo que requieren que los estanques tengan agua con una permanencia alta (Donnelly y Guyer 1994). Por lo anterior, están más expuestas a los cambios del hábitat (Crump 2003) particularmente en el periodo reproductivo.

Las características mencionadas las hacen buenos modelos para estudiar los cambios en el hábitat causados en este caso por la pérdida y fragmentación de la selva alta perennifolia. Además, se pueden encontrar tanto en zonas conservadas como perturbadas y dado sus requerimientos de hábitat la respuesta de cada especie a los cambios en el ambiente puede ser diferencial. Por tratarse de especies que se co-distribuyen se pueden comparar las respuestas a la perturbación del hábitat, pero, al diferir en la talla corporal la capacidad de movimiento y desplazamiento de cada una pueden ser factores clave en la respuesta a la perturbación del hábitat.

### ***Agalychnis callidryas* (Cope 1862)**

Es una rana arborícola de tamaño mediano y de cuerpo esbelto con patas largas y delgadas. Las hembras son más grandes que los machos, miden entre 40-60 mm de longitud hocico cloaca (LHC) aunque pueden alcanzar hasta los 75 mm (Briggs 2008). La principal particularidad de estas ranas es que la pupila es verticalmente elíptica con una membrana que cubre los ojos. La pupila es negra con los ojos rojos. El dorso es de color verde brillante con algunos puntos blancos en la espalda. El vientre es blanco o crema, las partes laterales y las piernas amarillas o naranjas (Figura 2).

Se distribuye desde el sur de Veracruz y norte de Oaxaca (México) hacia el sur a través de Honduras hasta Costa Rica (Duellman 1970). En la región de Los Tuxtlas se encuentra desde el nivel del mar hasta los 800 m dentro de la selva alta perennifolia (Vogt *et al.* 1997), aunque también ha sido registrada en la selva mediana en Quintana Roo (Calderón-Mandujano *et al.* 2005), selva baja, selva baja inundable así como en vegetación secundaria y huertos familiares (Cedeño-Vázquez *et al.* 2006).

*Agalychnis callidryas* es una especie arborícola nocturna. Es común encontrarla durante la época de lluvias (de finales de mayo a octubre) (Warketin 2000). Durante el día y en la estación seca posiblemente se encuentre en el dosel de los árboles (Duellman 1970). La reproducción ocurre durante la época de lluvias en cuerpos de agua tanto permanentes como temporales (Duellman 1970). En la laguna El Zacatal (Los Tuxtlas), la actividad reproductiva inicia a mediados o finales de junio y se extiende hasta diciembre (Vogt 1997). Los machos son los primeros en congregarse en los cuerpos de agua para llamar a las hembras que arriban cuando las lluvias son fuertes (Lee 1996). Los cantos pueden ser escuchados desde el crepúsculo (Lee 1996, Cedeño-Vázquez *et al.* 2006).

Las hembras depositan numerosas puestas en la vegetación a cierta altura de la superficie del agua (Vogth 1997), poniendo entre 30 y 50 huevos (Cedeño-Vázquez *et al.* 2006, IUCN 2007). La eclosión es un proceso rápido que ocurre entre los cinco y ocho días y puede anticiparse según la presencia de depredadores (Warketin *et al.* 2007), así como al grado de perturbación (Warketin 2000). Al eclosionar, los renacuajos caen al agua (Warketin 2000, Cedeño-Vázquez *et al.* 2006). Los renacuajos son grandes y se llegan a alimentar de renacuajos de otras especies de anuros (Calderón-Mandujano *et al.* 2005). La metamorfosis ocurre aproximadamente a los 76 días de la eclosión, al final de la estación lluviosa hasta inicios de la estación seca (Duellman 1970).

#### ***Dendropsophus ebraccatus* (Cope 1874)**

Es un hílido esbelto y pequeño que mide en promedio 25 mm de LHC, aunque las hembras pueden alcanzar los 36 mm (Vogth 1997). Se caracteriza por tener los muslos dorados y una mancha cruciforme estrecha de color café (Vogt 1997, Figura 3). Es una especie nocturna, activa principalmente durante la época de lluvias, en lugares inundados y charcas permanentes o temporales (Calderón-Mandujano 2005).

Se distribuye desde el sur de Veracruz (México) hasta Colombia (Cedeño-Vázquez *et al.* 2006), en las partes bajas y moderadas hasta los 1200 m (Duellman 1970), aunque en la región de Los Tuxtlas se encuentra desde el nivel del mar hasta los 500 m (Vogt 1997). Habita principalmente selvas tropicales húmedas, pero también puede encontrarse en los bordes o en zonas donde la vegetación ha sido removida (Duellman 1970, Cedeño-Vázquez *et al.* 2006). En Campeche se registraron en charcas con abundante pasto en potreros y zonas inundables con abundante vegetación acuática (Cedeño-Vázquez *et al.* 2006). También se encuentran en el

estrato arbóreo de la Launa El Zacatal, así como utilizando rocas y arbustos alrededor de ésta (Vogt 1997).

En la reproducción se congregan en grupos grandes (Vogt *et al.* 1997), en charcas o cuerpos de agua temporales (Lee 1996). La mayor actividad reproductiva se concentra en las lluvias del verano (Vogt *et al.* 1997) de junio a septiembre (Duellman *et al.* 1970). Sin embargo, su presencia puede prolongarse hasta diciembre (Vogt *et al.* 1997). Los machos se mantienen en los márgenes de los cuerpos de agua desde donde llaman a las hembras (Duellman *et al.* 1970).

*Dendrosophus ebraccatus* presenta plasticidad reproductiva particularmente en lo que refiere a la selección del sitio de oviposición (Touchon y Warkentin 2008). Los adultos pueden depositar los huevos dentro del agua, en la superficie o en dorso de las hojas por arriba del cuerpo de agua dependiendo del riesgo en el que se puedan encontrar los huevos a causa de la desecación causada por la pérdida de la cubierta vegetal (Touchon y Warkentin 2008).

El tamaño de las puestas varía de 20 a 80 huevos (Lee 1996) aunque pueden ser más numerosas llegando a ser de hasta 300 huevos (Vogth 1997). La eclosión ocurre a los tres o cuatro días (Touchon y Warkentin 2008) y completan su desarrollo dentro del cuerpo de agua. Los renacuajos se distinguen fácilmente por su larga cola amarilla en forma de punta (Vogt 1997).



Figura 2. *Agalychnis callidryas* (Rana de ojos rojos). Foto: N. Matías-Ferrer



Figura 3. *Dendrosophus ebraccatus* (Ranita reloj de arena). Foto: N. Matías-Ferrer



## RESULTADOS

---

Los siguientes dos capítulos incluyen los resultados obtenidos donde se abordan los objetivos planteados en el presente trabajo. Cada capítulo se presenta en formato de artículo. El **Capítulo 1**, es el manuscrito aceptado y ya publicado en la revista *Herpetological Journal*. En éste se evaluaron los cambios en la talla, condición corporal y asimetría fluctuante (AF) ante la perturbación de su hábitat reproductivo de *A. callidryas* y *D. ebraccatus*. Los resultados indicaron que los adultos de ambas especies no presentaron una mayor AF de la tibia y fémur, pero sí una menor condición y talla corporales en ambientes con mayor disturbio. Entre las dos especies, la que se puede encontrar en un mayor riesgo es *A. callidryas* que fue de la que menos sitios idóneos se encontraron para su reproducción. Además, no fue registrada en los sitios con alta perturbación, en donde prácticamente no existe el dosel.

En el **Capítulo 2**, se abordó el estudio de variación genética y estructura poblacional de *Agalychnis callidryas* y *Dendropsophus ebraccatus*. Los resultados de cinco loci de microsatélites dieron información acerca de la estructura poblacional y variación genética afectada por la fragmentación del hábitat. Para ambas especies se encontró que hay una diferenciación genética en la mayoría de las comparaciones que puede ser resultado de diferentes procesos demográficos (cuellos de botella, deriva génica y endogamia) y aun flujo génico relativamente bajo dentro de las poblaciones de la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas (RBLT) y del Parque Ecológico Jaguaroundi (PEJ). Entre las dos localidades (RBLT vs. PEJ) no se encontraron diferencias significativas en los patrones de diversidad genética. Dentro de cada región la diversidad genética varió de baja a intermedia, similar a lo reportado en otros estudios de fragmentación.

## Capítulo I.

---

### **Asimetría fluctuante, talla y condición corporal en *Agalychnis calidryas* y *Dendrosophus ebraccatus* en Los Tuxtlas, Veracruz (México)**

Artículo

“Size, body condition, and limb asymmetry in two hylid frogs at different habitat disturbance levels in Veracruz, Mexico”

Artículo publicado en la revista “Herpetological Journal”



## Size, body condition, and limb asymmetry in two hylid frogs at different habitat disturbance levels in Veracruz, Mexico

Noemí Matías-Ferrer<sup>1,2</sup> & Patricia Escalante<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas. Instituto de Biología - Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-153. 04510. México, D.F. México

<sup>2</sup>Departamento de Zoología. Instituto de Biología - Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-153. 04510. México, D.F. México

Habitat disturbance is one of the main factors contributing to population declines. Changes in the amount and quality of available habitat can affect body condition and morphology. In this study we evaluated the effect of habitat disturbance (deforestation, urbanisation and land-use change) on body size, body condition and fluctuating asymmetry in two species of arboreal tropical frogs (*Agalychnis callidryas* and *Dendropsophus ebraccatus*) at Los Tuxtlas Biosphere Reserve, Veracruz, México. We did not find significant differences in body condition or body size associated with habitat disturbance in *A. callidryas*, although the species reduced its local distribution in line with habitat disturbance. In *D. ebraccatus*, on the other hand, we observed a significant relationship between body condition and size with habitat disturbance. It is unknown whether these changes are adaptive or compromise the permanence of populations. Fluctuating asymmetry indices for both species exhibited no significant differences except for the tibia-fibula length of *D. ebraccatus*, which was significantly higher in undisturbed habitat.

*Key words:* *Agalychnis callidryas*, body condition, body size, *Dendropsophus ebraccatus*, fluctuating asymmetry, habitat disturbance, Hylidae

### INTRODUCTION

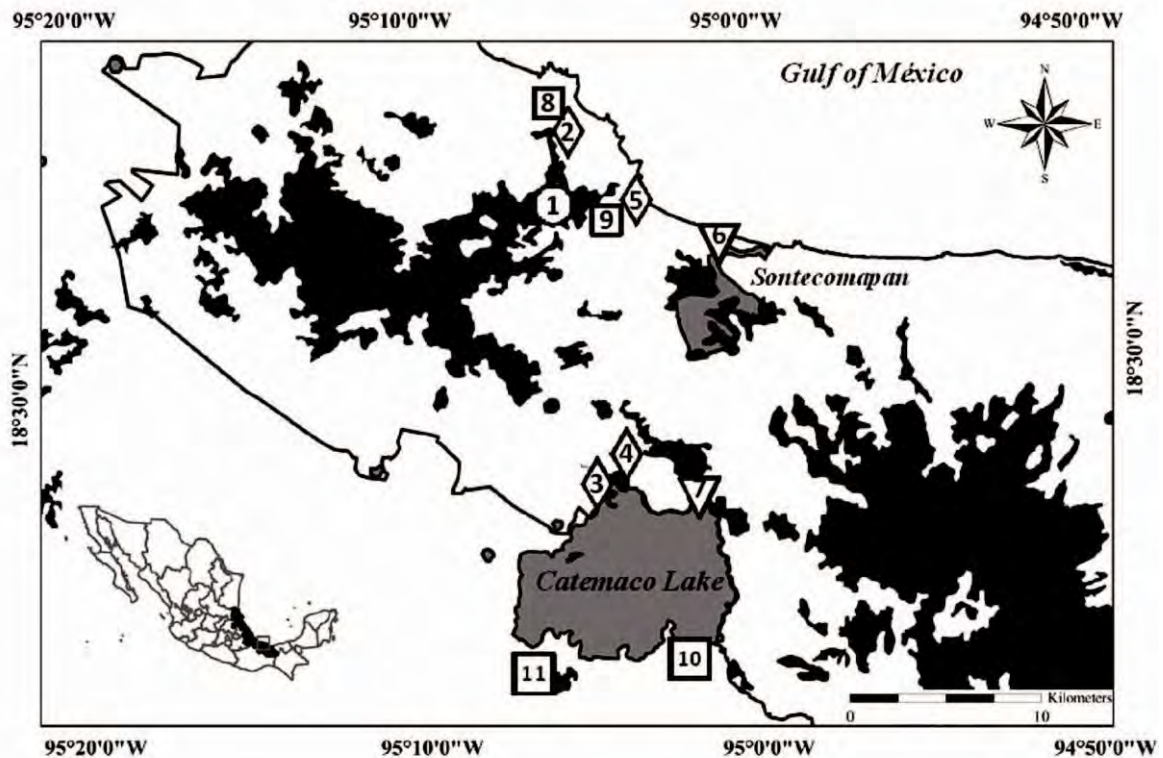
Habitat loss and fragmentation are the two most important factors causing biodiversity loss (Henle et al., 2004a). Land use changes have led to the decline and deterioration of habitats, resulting in the reduction of habitat quality (Henle et al., 2004b). Changes in microclimate and food availability affect the physiology of organisms. These changes may increase mortality or interrupt dispersal processes, and thereby increase the risk of decline and local extinction. Habitat changes may also affect the abundances of predators and prey as well as parasites and pathogens (Lips, 1999).

Changes in the environment can lead to changes in the morphology of organisms (Sumner et al., 1999). For example, size and body condition may decrease in response to changes in habitat quality (Lauk, 2006; Delgado-Acevedo & Restrepo, 2008; Henríquez et al., 2009). Transformed habitat conditions can also cause stress in resident populations, inducing changes during development that result in morphological asymmetry (Lens et al., 2002; Wright & Zamudio, 2002). Fluctuating asymmetry (FA) is a pattern of random deviations from symmetry of bilateral characters (Palmer & Strobeck, 1992), and has been used as an indirect measure of developmental instability in populations subjected to different environmental stressors (Hoffmann & Woods, 2003; Söderman et al., 2007). In some species, asymmetry

increases with the degree of habitat disturbance (Sarre, 1996; Wright & Zamudio, 2002).

Rainforests are the most diverse terrestrial ecosystems, and are rapidly disappearing due to high rates of deforestation. In Mexico, 80–90% of rainforests have been cleared or severely altered by human activities such as logging, livestock production, farming and urbanisation (Guevara et al., 2004). The most important Mexican boreal remnant rainforest is situated in Los Tuxtlas, Veracruz. Currently, Los Tuxtlas consists of forest, pastures, and crop fields in the lowlands (Dirzo & Garcia, 1992; Guevara et al., 2004). The region, encompassing an area of 155,122 ha, was declared a Natural Protected Area and a Biosphere Reserve in 1998 (CONANP & SEMARNAT, 2006).

The red-eyed tree frog (*Agalychnis callidryas* Cope, 1862) and the hourglass tree frog (*Dendropsophus ebraccatus* Cope, 1874) are both members of the family Hylidae and have a wide distribution stretching from Southern Mexico to Costa Rica and Colombia, respectively (Duellman, 1970). *Agalychnis callidryas* is 40–60 mm in snout vent length (SVL), and *D. ebraccatus* is <30 mm in SVL (Duellman, 1970; Rodríguez-Mendoza & Pineda, 2010). They are frequently found in the rainy season on vegetation overhanging permanent and temporary ponds where they breed (Duellman, 1970; Warkentin 2000). Their eggs are deposited on leaves, and tadpoles fall into the water for development to metamorphosis



**Fig. 1.** Collection sites for sampling of *Agalychnis callidryas* and *Dendropsophus ebraccatus* for length, body condition and limb asymmetry. The area corresponds to the northern region of the Biosphere Reserve Los Tuxtlas, Veracruz (Mexico). Black areas are primary vegetation remnants, located mainly above 600 m. White areas are livestock, urban, and agricultural areas. circles: undisturbed habitat (UD), diamonds: low disturbance habitat (LD), triangles: intermediate disturbance (ID) and squares: high disturbance (HD). Within the symbols are localities numbers.

(Vogt, 1997; Cedeño-Vázquez et al., 2006). Both species have an extended breeding season (Donnelly & Guyer, 1994). Land use changes, global climate change, and pollution are considered risk factors for both species in Mexico (Solís et al., 2008; Jungfer et al., 2008), and records for both species are rare compared to other frogs (Urbina-Cardona & Reynoso, 2005; Rodríguez-Mendoza & Pineda, 2010). While no data are available on population trends (Frías-Álvarez et al., 2010), both species may be tolerant of habitat disturbance, as they have been found in orchards, secondary vegetation, pastures and habitat edges (Duellman 1970; Cedeño-Vázquez et al., 2006). The aim of this study is to evaluate the effect of habitat disturbance on both tree frog species. We test the following predictions: i) habitat disturbance influences adult size and body condition and ii) the asymmetry of bilateral characters will increase with the degree of environmental disturbance.

## MATERIALS AND METHODS

This study was conducted in the northern part of Los Tuxtlas Biosphere Reserve, an area with a complex topography. Original forest vegetation is found primarily on hills and ridges, whereas the lowlands have been converted into grasslands, crop fields and villages. The main remaining patch of lowland rainforest is situated in the Biological Station of UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México, Fig. 1).

The study area was surveyed with the aid of local guides until a total of 11 sites with permanent and semi-permanent breeding ponds were found and included in our sampling design; a random design was impossible because the most pristine areas are in the highlands and are not suitable for the formation of breeding ponds for *A. callidryas* and *D. ebraccatus* (Fig. 1). The degree of habitat perturbation was categorised as Undisturbed (UD), Low Disturbance (LD), Intermediate Disturbance (ID) or High Disturbance (HD) based on knowledge and experience (Table 1). We manually collected individuals at night during the rainy season between July and December 2009–2011 (125 days in total). Each site was visited only once, with the exception of sites 7 and 10 (Table 1) which are represented by individuals collected on two different years. At each site, we collected at least 10 calling males per species, which had well-developed nuptial pads as described by Duellman (1970). After capture, each individual was weighed with a digital scale ( $\pm 0.01$  g), and snout vent length (SVL) was measured with a digital caliper ( $\pm 0.01$  cm). Because asymmetry analyses require high accuracy (Palmer, 1994), captured animals were euthanised with 5% Xylocaine and fixed with 10% formaldehyde. The length of the tibia-fibula was measured from the knee to the ankle joint, and femur length was measured from the knee to the tight joint (following Lauk, 2006; Delgado-Acevedo & Restrepo, 2008; Plăiașu et al., 2012). Three replicate measurements were taken to reduce measurement error (ME). All measurements were made by the same person.

SVL was used as a measure of body size. Body condition was obtained using the scaled mass index (SMI, Peig & Green, 2009; 2010; MacCracken & Stebbins, 2012). We used an ordinary least squares regression to estimate SMI parameters. SMI and body size were averaged by category of habitat disturbance for each species. The total number of specimens was 65 and 196 individuals of *A. callidryas* and *D. ebraccatus*, respectively. The normality distribution and homogeneity of variances of the sample data were tested before constructing a general linear model. SVL and SMI were considered response variables, and the disturbance category a fixed factor. Each response variable was evaluated in a separate analysis.

Limbs were assessed in terms of fluctuating asymmetry (FA) following Palmer (1994) and Palmer & Strobeck (2003). We obtained data on the tibia-fibula and femur lengths from 63 and 105 individuals of *A. callidryas* and *D. ebraccatus*, respectively. Factors that obscure the analysis of FA (i.e., directional asymmetry, antisymmetry and trait size) were ruled out as follows. First, we performed a two-way model ANOVA with individual as a random factor and side as a fixed factor (Palmer & Strobeck, 2003). Significant interaction terms (side x individual) suggested the presence of antisymmetry or FA (Palmer & Strobeck, 2003). Then, we calculated measurement error as  $M_{SE} / M_{SI} \times 100$ , with  $M_{SE}$  and  $M_{SI}$  being mean squares of error and interaction, respectively. We estimated repeatability with the ME5 index ( $M_{SE} / M_{SI} + (n-1) M_{E}$ ). To confirm that directional asymmetry (DA) was absent, we performed a one-sided *t* test comparing the mean of (R-L) to zero for each trait in each habitat for each species. Finally, we assessed antisymmetry with the Kolmogorov-Smirnov test for differences from normality for the difference between of sides ( $|R-L|$ ) of the tibia-fibula and femur lengths (Parris & Cornelius, 2004). A

non-normal distribution is indicative of antisymmetry, whereas a normal distribution with a mean of zero is indicative of FA (Polak, 2003). Trait size may also confound estimates of FA. To check for size dependence of trait size in trait variation, we performed a linear regression between the asymmetry absolute value of R-L ( $|R-L|$ ) and trait size  $((R+L)/2)$  as independent variable for each habitat disturbance category.

We calculated three FA indices described in Palmer & Strobeck (2003) for each species, trait and category of disturbance: FA1, FA4a, and FA10a. FA1 (mean  $|R-L|$ ) is the recommended index because it is easy to interpret, but for small sample sizes ( $n < 30$ ) has low statistical power. FA4a ( $0.798 \sqrt{\text{var}(R-L)}$ ) has higher statistical power and represents the contribution of FA measurement error (ME, Bechshoft et al., 2008); FA10a ( $0.798 \sqrt{2\sigma_i^2}$ ) is recommended because it describes the difference between the sides after ME has been removed (Palmer & Strobeck, 2003). Given that the FA1 ( $|R-L|$ ) in each category did not deviate from a normal distribution, the data were analyzed using a general linear model with categories of habitat disturbance as an explanatory factor and FA1 as the response variable. All statistical analyses were performed in R v.2.1.3.1 (The R Foundation for Statistical Computing, 2011) and Statistica for Windows v.7.0 (StatSoft, Inc. 2004).

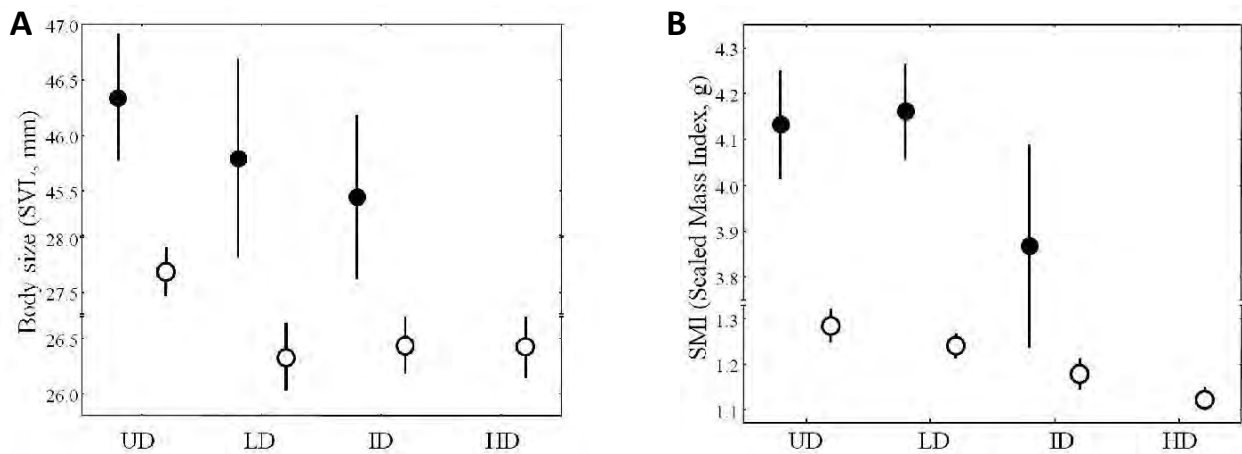
## RESULTS

### Body size and condition

*Agalychnis callidryas* was found only in the three least-disturbed categories (UD, LD and ID). Individuals from UD and LD sites were larger compared to ID individuals (Fig. 2a), a differences which was however not statistically significant ( $F_{3,195}=1.068$ ,  $p=0.349$ ). In *D. ebraccatus*, significant differences in body size were found between

**Table 1.** Sampling sites, habitat type and degree of disturbance. (UD: undisturbed, LD: low disturbance; ID: intermedi-ate disturbance and HD: highly disturbed). Site numbers correspond to each location in Fig. 1. Species: A=*Agalychnis callidryas* and D=*Dendropsophus ebraccatus*.

Locality	Habitat type	Species	Disturbance Category
1 Laguna El Zacatal	continuous rainforest	A, D	UD
2 Potrero Ejido 2 de Abril	rainforest fragment <1 ha.	A	LD
3 Nanciyaga Ecological Park	rainforest fragment >40 ha.	D	LD
4 La Jungla Park, Catemaco	rainforest fragment >40 ha. (artificial pond)	A	LD
5 Playa Escondida	reed patch	A, D	LD
6 Laguneta de El Real, Sontecomapan	disturbed mangrove, urban zone	A	ID
7 La Cruz, near Tebanca	macrophyte patch near pasture	D	ID
8 Villa El Cariño. Ejido 2 de Abril	pasture	D	HD
9 Road to Playa Escondida	pasture	D	HD
10 Las Margaritas	flooded plot, urban zone	D	HD
11 Deviation to San Juan Seco	Pasture, highway on one side	D	HD



**Fig. 2.** Mean (circles) and standard error (bars) for (A) body size (SVL) and (B) body condition (g, Scaled Mass Index) for *Agalychnis callidryas* (black circles) and *Dendropsophus ebraccatus* (open circles) in relation to different levels of habitat disturbance in the Biosphere Reserve of Los Tuxtlas, Veracruz (Mexico). UD: undisturbed, LD: low-disturbance, ID: intermediate disturbance and HD: high disturbance. The horizontal lines join habitat categories not significantly different from one another.

the UD habitat and the other categories ( $F_{3,195}=23.4$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 2a). We did not find significant differences in *A. callidryas* body condition among categories of habitat disturbance ( $F_{2,64}=2.783$ ,  $p=0.069$ ; Fig. 2b). In *D. ebraccatus*, we found significant decreases in SMI depending on habitat disturbance (UD-LD vs. ID-HD,  $F_{3,195}=22.485$ ,  $p<0.001$ ).

#### Limb asymmetry

The interaction term was significant ( $p<0.001$ ), demonstrating that non-directional asymmetry could be distinguished from measurement error. Measurement errors were  $>10\%$  for all characters except femurs length of *D. ebraccatus* (15–30%). The repeatability of FA was 0.6–0.8 for *A. callidryas*, and 0.08–0.31 for *D. ebraccatus* (Table 2).

The mean (R- L) was significantly different from zero ( $t=2.8$ ,  $p=0.048$ ) in *D. ebraccatus* femur lengths in the UD habitat, demonstrating the presence of directional asymmetry (DA). Therefore, DA for this character was removed by estimating the differences between right and left sides, subtracted from the larger measurement and added to the shorter measurement (Table 2; following Palmer, 1994). The Kolmogorov-Smirnov test did not suggest a significant departure from normality for any trait or species (all  $d$ -KS  $>0.08$ ,  $p>0.05$ ), demonstrating that non-directional asymmetry can be used as an estimate for FA. The relationship of trait size with FA1 ( $|R-L|$ ) provides no evidence of a size-dependent component of FA ( $\beta=-0.2-0.3$ ,  $p>0.05$ , Table 2).

No significant differences were found in FA1 limb traits with respect to habitat disturbance in *A. callidryas* (tibia-fibula,  $F_{2,60}=0.020$ ,  $p=0.98$ ; femur,  $F_{2,59}=0.577$ ,  $p=0.57$ , Table 3), while significant differences were observed for *D. ebraccatus* ( $F_{3,101}=4.843$ ,  $p=0.003$ ). A *post hoc* comparison using Tukey's HSD test showed that UD exhibited a higher tibia-fibula FA1 than the remaining categories (Mean=0.067, SE=0.008,  $p<0.001$ ). The values of FA4 and FA10 displayed similar asymmetry results

(Table 3). For femur length, FA1 was higher in UD but the difference was not significant ( $F_{3,101}=1.5216$ ,  $p=0.214$ , Table 3).

## DISCUSSION

Morphological changes due to habitat transformations have been proposed as indicators of habitat deterioration and the health status of individuals in transformed environments (Alford et al., 1999; Delgado-Acevedo & Restrepo, 2008). In this work, we quantified the effects of habitat disturbance in two species of tropical frogs, *A. callidryas* and *D. ebraccatus*, in a protected area. Our results suggest that *A. callidryas* is not significantly affected by habitat disturbance for the measured morphological parameters. However, frogs were not found in the highly disturbed habitat, and the lack of statistical evidence is linked with a small sample size obtained in the more disturbed categories. The size and body condition of *D. ebraccatus* decreased with habitat disturbance, consistent with studies on other anuran species (Neckel-Oliveira & Gascón, 2006; Lauk, 2006; Delgado-Acevedo & Restrepo, 2008). Reduced body size and poorer body condition might be responses to environmental change related to increased solar radiation, decreased humidity, pond desiccation, and/or restricted food availability, all of which are outcomes of altered habitats (Palkovacs, 2003; Buckley et al., 2005; Lowe et al., 2006). Predation may also influence size and body condition, as habitat disturbance might require higher energy expenditure for predator avoidance (Camargo & Kapos, 1995; Ball & Baker, 1996). Alternatively, larger individuals might be more conspicuous, which could explain why small-sized individuals prevail in areas with higher disturbance (Martín & Lopez, 1998; Delgado-Acevedo & Restrepo, 2008). Moreover, predation might accelerate the times of hatching and metamorphosis, resulting in a smaller adult body size (Warkentin, 1995; 2000; Ball & Baker, 1996; Jessop et al., 2006; Touchon

**Table 2.** Analysis of variance (ANOVA) to test the variation regarding trait measurement error (side x individual interaction) in *Agalychnis callidryas* and *Dendropsophus ebraccatus* by disturbance category (UD: undisturbed habitats, LD: low disturbed habitats; ID: intermediately disturbed habitats and HD: highly disturbed habitat).  $n$ =sample size. TI: tibia-fibula, FE: femur, ME3: measurement error expressed as  $MS_E/MS_{S_I} \times 100$  where  $MS_E$  and  $MS_{S_I}$  are the Mean Squares of error and side x individual interaction of the mixed model ANOVA, respectively. ME5: repeatability (Palmer & Strobeck, 2003), the values range from - 1 to 1. df: degrees of freedom of the side x individual interaction.  $F$ : F statistic for the side x individual interaction. R, L: sides;  $(R+L)/2$ : Trait size. DA: Directional asymmetry. %DA:  $(\text{mean}|R| - \text{mean}|L|) \times 100$ . *A. callidryas* was not captured at HD sites, therefore no data for this habitat category. \* Value of (R-L) before to remove the DA, which is made by subtracting the long side and by adding on the shorter side, the mean (R-L). After correction, the final values are  $\text{mean}(R-L)=0.03$  ( $SE=0.02$ ). † Slope of linear regression between  $|R-L|$  and trait size  $((R+L)/2)$ . ‡  $t$ -test of one-side analysis of mean (R-L) respect to zero.

Habitat/ trait	$n$	ME3 (%)	ME5	df	$F$	$p$ -values	R (Mean±SE)	L (Mean±SE)	(R+L)/2 (Mean±SE)	Slope† ±SE	DA=R-L (Mean±SE)	%DA	(t-test)‡
<i>A. callidryas</i>													
UD/TI	29	1.75	0.66	28	62.58	<2.2e-16	26.4 (2.6)	26.5 (2.6)	23.9 (-0.2)	-0.02	-0.02 (0.00)	2.2	1.2
LD/TI	22	1.44	0.72	25	67.45	<2.2e-16	22.8 (0.2)	22.8 (0.2)	23.0 (-0.2)	0.01	-0.03 (0.00)	2.7	1.4
ID/ TI	7	1.83	0.88	6	55.22	3.1 e-14	23.4 (0.2)	23.5 (0.2)	23.1 (-0.1)	0.02	-0.02 (0.00)	2.1	0.5
HD/TI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UD/FE	30	1.94	0.63	29	57.52	<2.2e-16	24.6 (0.2)	24.6 (0.2)	24.5 (-0.2)	-0.01	-0.04 (0.00)	3.9	2.4
LD/FE	22	1.68	0.69	25	62.05	<2.2e-16	24.0 (0.3)	24.0 (0.3)	24.2 (-0.2)	0	-0.01 (0.00)	1.3	0.6
ID/ FE	7	4.13	0.79	5	24.11	1.2e-08	31.7 (7.0)	31.7 (7.0)	24.5 (-0.1)	0.01	-0.02 (0.00)	1.5	0.5
HD/FE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>D. ebraccatus</i>													
UD/TI	22	5.46	0.19	21	18.52	1.9 e-15	14.6 (0.1)	14.6 (0.1)	14.6 (0.1)	0.02	0.01 (0.02)	8.4	1.3
LD/TI	20	9.01	0.12	23	10.99	3.1 e-12	14.1 (0.1)	14.1 (0.1)	14.0 (0.1)	-0.01	0.00 (0.01)	0.5	0.9
ID/ TI	25	6.56	0.16	26	15.14	<2.2e-16	14 (0.1)	14 (0.1)	14.0 (0.1)	-0.01	0.01 (0.01)	3.2	0.5
HD/TI	31	7.27	0.15	30	13.85	<2.2e-16	14.3 (0.1)	14.3 (0.1)	14.3 (0.1)	0.01	0.02 (0.01)	1.1	0.4
UD/FE	21	29.8	0.05	20	3.36	0.000047	14.1 (0.1)	14 (0.1)	14.1 (0.1)	0.03	-0.08 (0.01)*	5.4	2.8
LD/FE	26	19.97	0.06	28	4.99	1.2 e-07	13.8 (0.1)	13.8 (0.1)	13.8 (0.1)	0.02	0.01 (0.01)	0.5	2.1
ID/ FE	22	21.09	0.08	21	4.74	6.9 e-06	13.6 (0.1)	13.6 (0.1)	13.6 (0.1)	0	-0.03 (0.02)	1.0	0.7
HD/FE	36	16.54	0.06	35	6.05	6.2 e-11	13.8 (0.1)	13.8 (0.1)	13.8 (0.1)	-0.02	-0.01 (0.01)	1.6	0.4

et al., 2013). Paternal effects may also influence the size of individuals, as small males may sire smaller froglets (Briggs, 2013). In some anurans, body condition is lower at the end of the breeding season, due to the energy consumed in reproductive activities (Reading & Clarke, 1995). In our study, the samples were obtained during breeding, with the exception of one *D. ebraccatus* population which comprised smaller individuals without lowered body condition. Our observations might however also be influenced by a relationship of age with size and body condition (Ormerod & Tyler, 2009; Iturra-Cid et al., 2010), and a lower average age in areas of higher disturbance (Semlitsch, 2008; VanderWerf, 2004).

Habitat disturbance did not strongly influence limb asymmetry. In *A. callidryas*, FA did not exhibit a correlation with habitat disturbance, a finding similar to those of other studies (Labrie et al., 2003; Henríquez et al., 2009). For *D. ebraccatus*, the results were unexpected because the FA of tibia-fibula length was significantly higher in undisturbed areas (but see also Floate & Fox, 2000; Lauk, 2006; Delgado-Acevedo & Restrepo, 2008; Hopton et al., 2009). The lack of an effect of habitat disturbance on FA has previously been attributed primarily to high measurement error, higher mortality of more asymmetrical individuals (Møller, 1997; Floate & Fox, 2000; Henríquez et al., 2009), the traits selected for measurement (Lens et al., 2002; Vishalakshi & Singh, 2008; Henríquez et al., 2009), and sample size (Palmer, 1994; Delgado-Acevedo & Restrepo, 2008). In this study, the measurement error was low (<30%). We do not know whether the measured traits are linked to individual fitness (Lauk, 2006), and the possibility of differential mortality at sites with higher disturbance is difficult to test. Floate & Fox (2000) considered that, under lower stress or a lack of environmental disturbance, the presence of individuals with extreme asymmetry can significantly skew the normal frequency distribution of FA. In this study, all samples were normally distributed, which makes increased mortality in sites with higher disturbance unlikely. However, differential mortality could also occur in earlier life stages (see for example Gagliano et al., 2008).

Small sample sizes can be translated into low statistical power (Delgado-Acevedo & Restrepo, 2008), and uneven sample size might have contributed to the differences found between *A. callidryas* and *D. ebraccatus*. Most ponds in disturbed areas were temporary, and migration to less disturbed areas after metamorphosis is possible. It is however unknown to what extent FA is retained between different stages in amphibians. Growth and metamorphosis influence adult size (Halliday & Verrell, 1988), whereas developmental stability is related to growth rate (Danzmann et al., 1986; McKenzie & O'Farrell, 1993). At a higher stability of development, FA will be lower (Palmer & Strobeck, 1992). In disturbed or high stress environments, metamorphosis and growth can be accelerated (Lowe et al., 2006; Crump, 1989), leading to both lower body size and FA (Møller & Manning, 2003).

*Agalychnis callidryas* was previously more abundant in undisturbed areas (Vogt, 1997), and local declines were reported (Urbina-Cardona & Reynoso, 2005;

Urbina-Cardona et al., 2006; Rodríguez & Pineda, 2009; Cabrera-Guzmán & Reynoso, 2012). In this work, sites with intermediate and high disturbance are located in deforested areas with practically no tree cover or ground vegetation above 2 m in height, vegetation features which are essential to the breeding habitat of *A. callidryas*. Also, illegal markets in Mexico City are supplied with individuals from Los Tuxtlas (personal observation), which might put the remaining populations at greater risk.

*Dendropsophus ebraccatus* was found across the entire gradient of habitat disturbance, despite an influence on body size and condition. We do not know to what extent the morphological changes caused by habitat disturbance are adaptive, and lack data on population trends. Habitat disturbance can exert long-term pressure on a population's demography due to the continual loss of particular individuals through direct mortality (Dodd & Smith, 2003). We consider *D. ebraccatus* as a suitable indicator of environmental change (following Caro & O'Doherty, 1999).

## ACKNOWLEDGEMENTS

Thank you to R. Sinaca, R. Mineros, and J. Islas for their support in the field and to R. Coates for support and extension of her collection permit. We thank El Apompal group, Nanciyaga Ecological Park and Santos Family from Las Margaritas community for their invaluable help. To C. González for assistance in data analysis, and I. Herrera for the map. For revisions of the first manuscript we thank M. Grabiell. The manuscript was greatly improved thanks to J.G. MacCracken, R. Jehle, P. Frías-Álvarez, and an anonymous reviewer. This study is part of project No. 109298 funded by FOMIX (CONACyT-VERACRUZ). We thank CONACyT for the scholarship awarded N. Matías-Ferrer. This work represents part of the requirements for NMF to obtain the degree of Doctor of Science in the Posgrado en Ciencias Biológicas at the Universidad Nacional Autónoma de México.

## REFERENCES

- Alford, R.A., Bradfield, K. & Richards, S. (1999). Measuring and analyzing developmental instability as a tool for monitoring frog populations. Pp. 34–43. In: A. Campbell, editor. *Declines and disappearances of Australian frogs. Environment Australia, Canberra.*
- Ball, S.L. & Baker, R.L. (1996). Predator-induced life history changes: Antipredator behavior costs or facultative life history shifts? *Ecology* 77, 1116–1124.
- Bechshoft, T.O., Riget, F.F., Wiig, O. & Sonne, C. (2008). Fluctuating asymmetry in metric traits: A practical example of calculating asymmetry, measurement error, and repeatability. *Annales Zoologici Fennici*, 45, 32–38.
- Briggs, V.S. (2013). Do big dads make big babies? Paternal effects on larval performance in red-eyed treefrogs of Belize (*Agalychnis callidryas*, *A. moreletti*). *Herpetological Journal* 23, 131–138.
- Buckley, C.R., Michael, S.F. & Irschick, D.J. (2005). Early hatching decreases jumping performance in a direct-developing frog, *Eleutherodactylus coqui*. *Functional Ecology* 19, 67–72.



- Cabrera-Guzmán, E. & Reynoso, V.H. (2012). Amphibian and reptile communities of rainforest fragments: minimum patch size to support high richness and abundance. *Biodiversity Conservation* 21, 3267–3268.
- Camargo, J.L.C. & Kapos, V. (1995). Complex edge effects on soil moisture and microclimate in central Amazonian forest. *Journal of Tropical Ecology* 11, 205–221.
- Caro, T.M. & O’Doherty, G. (1999). On the use of surrogate species in conservation biology. *Conservation Biology* 13, 805–814.
- Cedeño-Vázquez, J.R., Calderón-Mandujano, R. & Pozo, C. (2006). Anfibios de la Región de Calakmul Campeche, México. México: CONABIO/ECOSUR/CONANP/PNUD-GEF/SHM A.C.
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas & Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (CONANP & SEMARNAT). (2006). Programa de Conservación y Manejo Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas. México: *Comisión de Áreas Naturales Protegidas/Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales*.
- Crump, M.L. (1989). Effect of habitat drying on developmental time and size at metamorphosis in *Hyla pseudopuma*. *Copeia* 1989, 794–797.
- Danzmann, R.G., Ferguson M.M., Allendorf, F.W. & Knudsen, K.L. (1986). Heterozygosity and developmental rate in a strain of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Evolution* 40, 86–93
- Delgado-Acevedo, J. & Restrepo, C. (2008). The contribution of habitat loss to changes in body size, allometry, and bilateral asymmetry in two *Eleutherodactylus* frogs from Puerto Rico. *Conservation Biology* 22, 773–782.
- Dirzo, R. & García, M.C. (1992). Rates of deforestation in Los Tuxtlas and neotropical area in south east México. *Conservation Biology* 6, 84–90.
- Dodd C.K Jr. & Smith L.L. (2003). Habitat destruction and alteration. In: Semlitsch, R.D (ed.). *Amphibian Conservation*, pp. 94–110. R. Smithsonian Institution, Washington, D.C.
- Donnelly, M.A & Guyer, C. (1994). Patterns of reproduction and habitat use in an assemblage of Neotropical hyliid frogs. *Oecologia* 98, 291–302.
- Duellman, W.E. (1970). The hyliid frogs of Middle America. *Monograph of the Museum of Natural History, the University of Kansas* 1970, 1–753.
- Frías-Álvarez P., Zúñiga-Vega, J.J. & Flores-Villela, O. (2010). A general assessment of the conservation status and decline trends of Mexican amphibians. *Biodiversity and Conservation* 19, 3699–3742.
- Floate, K.D. & Fox, A.S. (2000) Flies under stress: A test of fluctuating asymmetry as a biomonitor of environmental quality. *Ecological Applications* 10, 1541–1550.
- Gagliano, M., Depczynski, M., Simpson S.D., & Moore, J.A. (2008). Dispersal without errors: symmetrical ears tune into the right frequency for survival. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 275, 527–34.
- Guevara, S.S., Laborde, D.J. & Sánchez-Ríos, G. (2004). La Deforestación. In *Los Tuxtlas. El Paisaje de la Sierra*, pp. 85– 110. Guevara, S.S., Laborde D.J. & Sánchez-Ríos, G. (eds.). México: *Instituto de Ecología A. C.-Unión Europea*.
- Halliday, T.R. & Verrell, P.A. (1988). Body size and age in amphibians and reptiles. *Journal of Herpetology* 22, 253–265
- Henle, K., Lindenmayer D.B., Margules, C.R., Saunders, D.A. & Wissel, C. (2004a). Species survival in fragmented landscapes: where are we now? *Biodiversity and Conservation* 13, 1–8.
- Henle, K., Davies, K.F., Kleyer, M., Margules, C. & Settele, J. (2004b). Predictors of species sensitivity to fragmentation. *Biodiversity Conservation* 13, 207–251.
- Henríquez, P., Donoso, D.S. & Grez, A.A. (2009). Population density, sex ratio, body size and fluctuating asymmetry of *Ceroglossus chilensis* (Carabidae) in the fragmented Maulino forest and surrounding pine plantations. *Acta Oecologica* 35, 811–818.
- Hoffmann, A.A. & Woods R.E. (2003). Associating environmental stress with developmental stability: problems and patterns. In: *Developmental Instability. Causes and Consequences*. 387–401. Polak, M. (ed.). New York: OXFORD
- Hopton M.E., Cameron G.N., Cramer, M.J., Polak, M. & Uetz G.W. (2009). Live animal radiography to measure developmental instability in populations of small mammals after a natural disaster. *Ecological Indicators* 9, 883–891.
- Iturra-Cid, M., Ortiz, J.C., & Ibarquengoytia, N.R. (2010). Age, size, and growth of the Chilean frog *Pleurodema thaul* (Anura: Leiuperidae): latitudinal and altitudinal effects. *Copeia* 2010, 609–617.
- Jessop, T.M., Madsen, T., Sumner, J., Rudiharto, H., et al. (2006). Maximum body Size among insular Komodo dragon populations covaries with large prey density. *Oikos* 112, 422–429.
- Jungfer, K.H., Lynch, J., Morales, M., Solís, F., et al. (2008). *Dendropsophus ebraccatus*. In: IUCN 2008. *2008 IUCN Red List of Threatened Species*. Available from: <<http://www.iucnredlist.org>>.
- Labrie, G., Prince, C., Bergeron, J.M. (2003). Abundance and developmental stability of *Pterostichus melanarius* (Coleoptera, Carabidae) in organic and integrated pest management orchards of Quebec, Canada. *Environmental Entomology* 32, 123–132.
- Lauk, B. (2006). Fluctuating asymmetry of the frog *Crinia signifera* in response to logging. *Wildlife Research* 33, 313–320.
- Lens, L., Van Dongen, S., Kark, S. & Matthysen, E. (2002). Fluctuating asymmetry as an indicator of fitness: can we bridge the gap between studies? *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 77, 27–38.
- Lips, K. (1999). Mass mortality and population decline of anurans at an upland site in western Panama. *Conservation Biology* 13, 117–125.
- Lowe, W.H., Likens, G.E., & Cosentino, B.J. (2006). Self-organization in streams: The relationship between movement behaviour and body condition in a headwater salamander *Freshwater Biology* 51, 2052–2062
- MacCracken, J.G. & Stebbings, J.L. (2012). Test of a body condition index with amphibians. *Journal of Herpetology* 46, 346–350.
- McKenzie, J.A. & O’Farrell, K. (1993). Modification of developmental instability and fitness: malathion resistance in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Genetica* 89, 67–76.
- Martín, J. & López, P. (1998). Shifts in microhabitat use by the lizard *Psammotromus algirus*: responses to seasonal changes in vegetation structure. *Copeia* 1998, 780–786.

- Møller, A.P. (1997). Development stability and fitness: a review. *American Naturalist* 149, 916–932.
- Møller, A.P. & Manning, J. (2003). Growth and developmental instability. *The Veterinary Journal* 166, 19–27.
- Neckel-Oliveira S. & Gascón C. (2006). Abundance, body size and movement patterns of a tropical treefrog in continuous and fragmented forests in the Brazilian Amazon. *Biological Conservation* 28, 308–315.
- Ormerod, S.J. & Tyler, S.J. (1990). Assessments of body condition in dippers *Cinclus cinclus*: potential pitfalls in the derivation and use of condition indices based on body proportions. *Ringing & Migration* 11, 31–41.
- Palkovacs, E.P. (2003). Explaining adaptive shifts in body size on islands: a life history approach. *Oikos* 103, 37–44
- Palmer, A.R. (1994). Fluctuating asymmetry analyses: a primer. In: *Developmental Instability: its origin and Evolutionary Implications*. pp 335–364. Markow, T.A. (ed.). *Dordrecht The Netherlands: Kluwer Academic*.
- Palmer, A.R. & Strobeck, C. (1992). Fluctuating asymmetry as a measure of developmental stability: Implications of non normal distributions and power of statistical tests. *Acta Zoologica Fennica* 191, 57–72.
- Palmer, A.R. & Strobeck, C. (2003). Fluctuating asymmetry analyses revisited. In: *Developmental Instability. Causes and Consequences*. Pp. 279–319. Polak, M. (ed.). *New York: Oxford*.
- Parris, M.J. & Cornelius, T.O. (2004). Fungal pathogen causes competitive and developmental stress in larval amphibian communities. *Ecology* 85, 3385–3395
- Peig, J. & Green, A.J. (2009). New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos* 118, 1883–1891.
- Peig, J. & Green A.J. (2010). The paradigm of body condition: a critical reappraisal of current methods based on mass and length. *Functional Ecology* 24, 1323–1332
- Plăiașu, R., Vörös, J. & Băncilă, R. (2012). Fluctuating asymmetry as a tool in identifying population stress in Hungarian populations of *Bombina bombina*, *B. variegata* and their hybrids. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 58, 361–368.
- Polak M. (2003). *Developmental Instability. Causes and Consequences*. New York: Oxford Univ. Press
- Reading, C.J. & Clarke, R.T. (1995). The effects of density, rainfall and environmental temperature on body condition and fecundity in the common toad, *Bufo bufo*. *Oecologia* 102, 453–459.
- Rodríguez-Mendoza, C. & Pineda, E. (2010). Importance of riparian remnants for frog species diversity in a highly fragmented rainforest. *Biological Letters* 6, 781–784.
- Sarre, F. (1996). Habitat fragmentation promotes fluctuating asymmetry but not morphological divergence in two geckos. *Researches on Population Ecology* 38, 57–64.
- Semlitsch, R.D. (2008). Differentiating migration and dispersal processes for pond-breeding amphibians. *The Journal of Wildlife Management* 72, 260–267.
- Solís F., Ibáñez, R., Santos-Barrera, G., Jungfer, K.H., et al. (2008). *Agalychnis callidryas*. In: IUCN 2008. *2008 IUCN Red List of Threatened Species*. Available from: <<http://www.iucnredlist.org>>.
- Söderman F.S., Van Dongen, S., Pakkasnaa, S. & Merilä, J. (2007). Environmental stress increases skeletal fluctuating asymmetry in the moor frog *Rana arvalis*. *Oecologia* 151, 593–604.
- StatSoft, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7. Available from: <<http://www.statsoft.com>>.
- Sumner, J., Moritz, C. & Shine, R. (1999). Shrinking forest shrinks skink: morphological change in response to rainforest fragmentation in the prickly forest skink (*Gnypetoscincus queenslandiae*). *Biological Conservation* 91, 159–167.
- The R Foundation for Statistical Computing. (2011). R version 2.13.1 Copyright (C). ISBN 3-900051-07-0. ISBN 3-900051-07-0.
- Touchon, J.C., McCoy, M.W., Vonesh, J.R. & Warkentin, K.M. (2013) Effects of plastic hatching timing carry over through metamorphosis in red-eyed treefrogs. *Ecology* 94, 850–860.
- Urbina-Cardona, J.N. & Reynoso, V.H. (2005). Recambio de anfibios y reptiles en el gradiente potrero-borde-interior en Los Tuxtlas, Veracruz, México. In *Sobre Diversidad Biológica: El significado de las Diversidades Alfa, Beta y Gamma*. 191–207. Halffter, G., Soberón, J., Koleff, P. & Melic, A. (eds.). México: CONABIO/SEA/CONACYT/ DIVERSITAS.
- Urbina-Cardona, J.N. Olivares-Pérez M. & Reynoso, V.H. (2006). Herpetofauna diversity and microenvironment correlates across a pasture–edge–interior ecotone in tropical rainforest fragments in the Los Tuxtlas Biosphere Reserve of Veracruz, Mexico. *Biological Conservation* 32, 61–75.
- VanderWerf, E.A. (2004). Demography of Hawai'i 'elepaio: variation with habitat disturbance and population density. *Ecology* 85:770–783
- Vishalakshi, C. & Singh, B.N. (2008). Effect of developmental temperature stress on fluctuating asymmetry in certain morphological traits in *Drosophila ananassae*. *Journal of Thermal Biology* 33, 201–208.
- Vogt, R.C. (1997). Las ranas de Laguna del Zacatal. In *Historia Natural de Los Tuxtlas*, 500-503. González-Soriano E., Dirzo, R. & Vogt, R.C. (eds.). México: UNAM.
- Warkentin, K.M. (1995). Adaptive plasticity in hatching age: a response to predation risk trade-offs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 3507–3510.
- Warkentin, K.M. (2000). Wasp predation and wasp-induced hatching of red-eyed treefrog eggs. *Animal Behaviour* 60, 503–510.
- Wright, A.N. & Zamudio, K.R. (2002). Color pattern asymmetry as a correlate of habitat disturbance in spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*). *Journal of Herpetology* 36, 129– 133.

Accepted: 24 November 2014

## CAPÍTULO II

---

**Variación genética de dos especies de anuros (*Agalychnis callidryas* y *Dendropsophus ebraccatus*) ante la perturbación de la selva alta perennifolia**

# Variación genética de dos especies de anuros (*Agalychnis callidryas* y *Dendropsophus ebraccatus*) ante la perturbación de la selva alta perennifolia

Noemí Matías-Ferrer<sup>1,2</sup>, Patricia Escalante Pliego<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas. Instituto de Biología - Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-153. 04510. México, D.F. México

<sup>2</sup>Departamento de Zoología. Instituto de Biología - Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-153. 04510. México, D.F. México

e-mail: [noemi.matias@st.ib.unam.mx](mailto:noemi.matias@st.ib.unam.mx)

## Resumen

Las modificaciones del hábitat generadas por actividades antrópicas pueden llevar a la erosión de la diversidad genética dentro y entre poblaciones. Sin embargo, las respuestas a estos procesos dependen de las características de historia de vida de las especies. En este estudio, se evaluaron los patrones de diversidad genética y flujo génico en dos especies de ranas arborícolas en dos áreas naturales la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas (RBLT) y del Parque Ecológico Jaguaroundi (PEJ) las que actualmente presentan un paisaje fragmentado de selva alta perennifolia en. La RBLT tiene una historia de deforestación que tuvo su máximo a finales de los años 80s. El PEJ es un área natural protegida privada de reciente creación (2002), la cual se encuentra dentro de una zona petrolera la cual también ha sido impactada por la ganadería y agricultura. En total se obtuvieron muestras de ocho poblaciones de *Agalychnis callidryas* y 11 de *Dendropsophus ebraccatus* que proceden de diferentes estanques dentro del continuo de selva, fragmentos de vegetación, potreros y zonas urbanas. De cada población se obtuvieron datos de

cinco loci de microsatélites específicos para cada especie. Los resultados indican que los índices de diversidad genética varían de bajos a intermedios en ambas especies, pero no hay diferencias significativas en los índices de diversidad genética dentro de las dos regiones (RBLT y. PEJ). La diferenciación genética entre ambas regiones fue significativa. Se detectaron signos de aislamiento y reducción poblacional asociados a cuellos de botella recientes, endogamia y deriva génica en la mayoría de las poblaciones muestreadas. La diferenciación y estructura genética están asociadas a la distancia geográfica en *A. callidryas* y a posibles limitantes ecofisiológicas en *D. ebraccatus*. Es necesario implementar acciones de conservación que garanticen el flujo génico en el corto y largo plazos, por lo que se recomienda la creación y mantenimiento de los estanques para la reproducción.

**Palabras clave:** Perturbación del hábitat, selva alta perennifolia, ranas arborícolas, diversidad genética, aislamiento genético, cuellos de botella, endogamia, deriva génica.

## **Introducción**

Las alteraciones del hábitat que resultan de actividades humanas son de las principales causas que han llevado a la pérdida de la diversidad biológica (Henle *et al.* 2004). La pérdida, degradación y fragmentación del hábitat, pueden generar diferentes respuestas dependiendo de las características de historia de vida de las especies, en combinación con la intensidad, frecuencia y escala espacial del disturbio ambiental (Crump 2003, Fisher y Lindenmayer 2007). La pérdida del hábitat puede afectar sutilmente a las poblaciones a través de múltiples generaciones, y llevar a la reducción del tamaño efectivo poblacional, la pérdida de la conectividad, la disminución de la diversidad genética y la depresión por endogamia. En un grado extremo, la pérdida del hábitat puede resultar en extinciones locales (Green 2003), siendo las

poblaciones pequeñas y aisladas las más propensas a la erosión de la diversidad genética (Keller y Waller 2002).

Las selvas del Neotrópico son de los ecosistemas con mayor diversidad biológica, sin embargo, su extensión se ha reducido severamente a causa de la deforestación. En México, la deforestación ha llevado a la pérdida mayor del 80% de las selvas tropicales (Challenger y Moreno 2008) y en particular en la región de Los Tuxtlas (Veracruz), la magnitud del problema es similar, quedando aproximadamente el 5% de la selva alta perennifolia (Dirzo y García 1992, Guevara *et al.* 2004, Castillo-Campos y Laborde 2004). En 1998, los Tuxtlas fue decretada como Reserva de la Biosfera con una extensión de 155,000 ha (CONANP y SEMARNAT 2006) con la finalidad de conservar la gran diversidad biológica que aún existe en la región entre las que se incluyen 39 especies de anfibios (Hernández-Ordóñez *et al.* 2014). El paisaje actual de la Reserva está conformado por una serie de parches de vegetación primaria, rodeados de campos agrícolas, potreros y vegetación secundaria, además de importantes zonas urbanas (Guevara *et al.* 2004).

El Parque Ecológico Jaguaroundi (PEJ) se encuentra dentro de una zona petrolera, a 5 km al sur de la ciudad de Coatzacoalcos (Veracruz). Al igual que el resto de las selvas del neotrópico mexicano, la región ha sufrido una severa transformación por la agricultura y ganadería. En el 2008 fue decretada como reserva privada con una extensión de 1010 ha (Nava-Cruz y Rosas 2008). El paisaje actual del Parque está formado por fragmentos de vegetación, primaria, secundaria y en regeneración, colindando con los complejos petroquímicos.

En ambas regiones, la heterogeneidad del paisaje puede representar una barrera para la dispersión en especies con un potencial de dispersión bajo, como es el caso de los anfibios. Particularmente, especies con hábitats complejos pueden ser vulnerables a las modificaciones en el hábitat (Crump 2003) ya que pueden afectar la conectividad (e.i entre el medio terrestre y acuático) e interrumpir su ciclo de vida (Becker *et al.* 2010). Además, de poner en riesgo el

reclutamiento de individuos para los próximos eventos reproductivos (Crump 2003).

La mayoría de los estudios que han tratado de evaluar el efecto de la perturbación del hábitat sobre los anuros, lo han hecho con especies de zonas templadas (Hitchings y Beebee 1997, Rowe *et al.* 1999, Beebee y Rowe 2000, Andersen *et al.* 2004, Allentoft *et al.* 2009, Dias *et al.* 2015), y con alta capacidad de dispersión terrestre (Lesbarrères *et al.* 2006, Arens *et al.* 2007, Johansson *et al.* 2007, Peterman *et al.* 2013). Los estudios que evalúan la variación genética de especies tropicales son escasos (Dixo *et al.* 2009, Emel y Storfer 2012), a pesar de presentar la mayor diversidad de anuros del planeta (Crump 2003).

La rana de ojos rojos (*Agalychnis callidryas*) y la rana reloj de arena (*Dendropsophus ebraccatus*) son dos especies de anuros arborícolas neotropicales. Ambas son especies de amplia distribución. La primera de talla mediana y la segunda de talla pequeña (Duellman 1970). Son de hábitos nocturnos y durante la época de lluvias son comunes (Warkentin 2000). En la temporada seca posiblemente se encuentran en el dosel (Duellman 1970). Respecto a sus hábitos reproductivos, son consideradas especies de reproducción prolongada, ya que el período de la eclosión hasta la metamorfosis es relativamente largo (Donnelly y Guyer 1994), por lo que requieren de cuerpos de agua semipermanentes para la reproducción. Además, se caracterizan por dejar las puestas de huevos en la vegetación fuera de los estanques. Una vez que ocurre la eclosión, la larva es acuática (Duellman 1970, Warkentin 2000).

Respecto al estado de conservación de *A. callidryas* y *D. ebraccatus*, están clasificadas en la lista de la IUCN dentro de la categoría de riesgo bajo (Jungfer *et al.* 2008, Solís *et al.* 2008) ya que pueden persistir en ambientes con cierto grado de disturbio (e.g. bordes de fragmentos de selva, potreros y aguadas con abundante vegetación acuática) (Cedeño-Vázquez *et al.* 2006). En México, no están consideradas dentro de la lista oficial de especies en riesgo (NOM-059-ECOL-2001, SEMARNAT 2002). En la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas (RBLT), *A. callidryas* se

consideraba abundante ya que era común encontrarla en toda la región (Vogt 1997, R. Coates, comunicación personal). Sin embargo, los registros recientes de esta especie son bajos (Urbina-Cardona y Reynoso 2005, Urbina-Cardona *et al.* 2006, Rodríguez-Mendoza y Pineda 2010, Cabrera-Guzmán y Reynoso 2012), por lo que se ha sugerido el declive de sus poblaciones al menos en la región (Urbina-Cardona y Reynoso 2005). *D. ebraccatus* es considerada una especie rara (Urbina-Cardona y Reynoso 2005), por lo que se desconoce cuál es su estado de conservación en la Reserva. En Parque Ecológico Jaguaroundí (PEJ) sólo fue registrada *A. callidryas* (Herrera *et al.* 2008).

Para poder proponer estrategias de conservación y manejo se requiere evaluar el estado de las poblaciones ante cambios ambientales de tipo antropogénico (Beebe 2005) por lo que es primordial conocer cómo se encuentra la diversidad genética dentro y entre poblaciones (Frankham *et al.* 2002). Para poder mantener poblaciones genéticamente diversas que aseguren su permanencia en el largo plazo. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio es evaluar la diversidad, diferenciación y estructura genética en las poblaciones remanentes de *A. callidryas* y *D. ebraccatus* en la RBLT y en el PEJ. Este estudio es el primero en investigar la genética de conservación de dos especies tropicales con tipo reproductivo tipo 2, y los resultados se aplicarán a decisiones futuras de conservación de anfibios Neotropicales.

## **Materiales y métodos**

*Área de estudio.* Este estudio fue realizado en dos localidades en el sur de Veracruz (México) que albergan el extremo boreal de la selva alta perennifolia. La primera es la RBLT (Figura 1a). En total se obtuvieron muestras de 11 sitios que se encuentran dentro del continuo y fragmentos de selva alta perennifolia, en pastizales dedicados a la ganadería y dentro de zonas urbanas (Cuadro 1). La segunda localidad corresponde al PEJ, el cual queda aproximadamente a



45 km al sur de la RBLT, de los cuales sólo se obtuvieron muestras de tres sitios y que corresponden a parches de selva alta perennifolia dentro de una zona petrolera (Cuadro 1).

*Muestras.* Durante la temporada de lluvias en los meses de diciembre del 2009, y julio-octubre del 2010 y del 2011, se realizaron muestreos nocturnos de 21:00-24:00 hrs en periodos de 10 a 30 días de trabajo de campo. La búsqueda de ambas especies se hizo en estanques semipermanentes y temporales de zonas perturbadas y conservadas de la RBLT y del PEJ. Las muestras están formadas principalmente por machos adultos y en mucho menor número por renacuajos, huevos o metamórficos. En total se obtuvieron muestras de 63 individuos de la RBLT y 47 del PEJ para *A. callidryas*, mientras que de *D. ebraccatus* se obtuvieron 141 y 59 muestras de cada área respectivamente. Las capturas se hicieron a mano con ayuda de lámparas. La eutанизación de los ejemplares se realizó con Xilocaína al 3%. Los tejidos obtenidos fueron de músculo, hígado y dedos, así como huevos que se almacenaron en microtubos con alcohol al 70% de concentración y posteriormente mantenidos a -20°C.

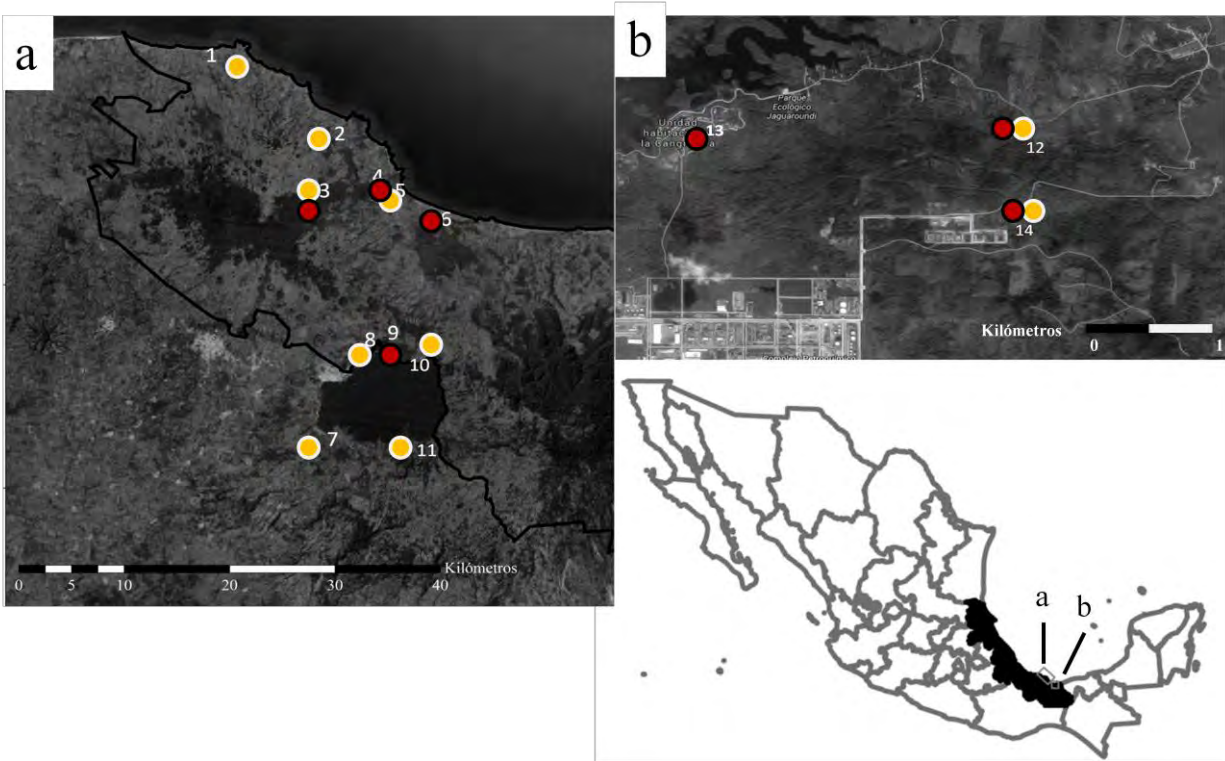


Figura 1. Mapa de localidades de colecta de *A. callidryas* y *D. ebraccatus*. Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas (a) y Parque Ecológico Jaguaroundi (b). Las áreas oscuras son los remanentes de vegetación. En gris las zonas de pastoreo, zonas urbanas y de agricultura. 1: REV, 2: PODA, 3: EZAC, 4: CAPE, 5: PLES, 6: REAL, 7: DSJS, 8: NANC, 9: JUNG, 10: CRUZ, 11: MARG, 12: JAGS, 13: JAGC, 14: JQUE.

Cuadro 1. Sitios de muestreo, tipo de hábitat y abreviaturas de cada sitio (*Abrev.*) en la Reserva de la Biosfera los Tuxtlas (RBLT) y del Parque Ecológico Jaguaroundi (PEJ): *sp*: especie detectada por sitio; *A*: *Agalychnis callidryas* y *D*: *Dendropsophus ebraccatus*

<b>Sitio</b>	<b>Abrev.</b>	<b>Tipo de hábitat</b>	<b>sp</b>	
<i>Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas (RBLT)</i>				
1	Ejido Revolución, Costa de Oro	REV	Pastizal, estanque piscícola abandonado	<i>D</i>
2	Potrero Ejido 2 de Abril	PODA	Fragmento de selva alta perennifolia < 1 ha.	<i>A</i>
3	Laguna El Zacatal	EZAC	Continuo de selva alta perennifolia	<i>A</i> , <i>D</i>
4	Camino a Playa Escondida	CAPE	Pastizal	<i>D</i>
5	Playa Escondida	PLES	Parche de carrizo	<i>A</i> , <i>D</i>
6	Laguneta de El Real, Sontecomapan	REAL	Manglar perturbado, zona urbana	<i>A</i>
7	Desviación a San Juan Seco	DSJS	Pastizal, a lado de una autopista	<i>D</i>
8	Parque Ecológico Nanciyaga	NANC	Fragmento de selva alta perennifolia > 40 ha.	<i>D</i>
9	Parque, La Jungla, Catemaco	JUNG	Fragmento de selva alta perennifolia > 40 ha (estanque artificial)	<i>A</i>
10	La Cruz, cerca de Tebanca	CRUZ	Patizal, en zona inundable	<i>D</i>
11	Las Margaritas	MARG	Parcela inundada, zona urbana	<i>D</i>
<i>Parque Ecológico Jaguaroundi, Coatzacoalcos (PEJ)</i>				
12	Centro del Parque, área sabana	JAGS	Parche de selva baja primaria	<i>A</i> , <i>D</i>
13	Unidad Habitacional La Cangrejera	JAGC	Estanque en un parche de selva secundaria	<i>A</i>
14	Zona de Quemadores	JQUE	Laguna semipermanente, en un parche de selva baja	<i>A</i> , <i>D</i>

*Extracción de DNA y cuantificación.* El DNA genómico se obtuvo con la técnica de fenol-cloroformo mediante la digestión con *proteínasa K* (7 µl) incubando a 56 °C y en agitación constante por una noche. Posteriormente se cuantificó el DNA utilizando un Nanodrop (Thermofisher) obteniendo entre 25 y 200 ng/µl. Las muestras fueron diluidas en agua ultra pura a 100 ng/µl. En total se probaron 12 pares de loci para *A. callidryas* y ocho pares de loci de microsátélites para *D. ebraccatus*, de los cuales nueve y seis loci son específicos para cada especie, respectivamente (Anexo 1).

La amplificación de los loci se realizó por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un volumen de reacción de 10 µl conteniendo 1X PCR Buffer, 2 µM de MgCl<sub>2</sub>, 0.03% BSA; 0.2 µM de dNTPs, 0.2 µM primer M13 marcado con fluorescencia (FAM, VIC, PET y NED; Applied Biosystems), 0.2 µM de primer “reverse” y 0.02 µM de primer “forward” y 2U de taq Amplificasa® (Biotecmol). La secuencia M13 (5'-CAGTCGGGCGTCATCA-3') se incluyó al primer forward de cada par en el 5' final (<http://www.gvsu.edu/dna/fragment-analysis-guidelines-4.htm>, G. Travis) (Anexo 1). Para los primers previamente marcados se usaron los fluoróforos TET, HEX y FAM (Invitrogen ®) (Anexo 1). Las reacciones de PCR se hicieron utilizando dos programas, uno sencillo y otro medio. El sencillo con una desnaturalización de 94° C por 5min, seguidos de 30-33 ciclos de, 94° por 30 seg, 56-60 °C por 45 seg; y 72° C por 1 min. El programa medio con una desnaturalización de 95° por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94° por 30 seg, 56-60 °C por 45 seg; y 72 °C por 1 min, seguido por 8 ciclos de 94° por 30 seg, 53-57 °C por 45 seg; y 72 ° C por 1 min. Una extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% y posteriormente se genotipificaron por electroforesis capilar en el secuenciador ABI PRISM 3100xL (Applied Biosystems) en el Laboratorio de Secuenciación de la Salud y la Biodiversidad del Instituto de Biología, UNAM. Los fragmentos se asignaron mediante la

comparación con la escala LIZ 500 pb y la tipificación de los alelos de acuerdo con el número y categoría de los motivos (repeticiones) utilizando el programa GeneMapper ver. 4.1 (Applied Biosystems).

### **Análisis de datos**

Los genotipos obtenidos se redondearon con el programa TANDEM V. 1.09 (Matschiner y Salzburger 2009). Posteriormente en MICROCHECKER 2.2.3 (Oosterhout *et al* 2004) se analizó cada población por separado para detectar la presencia de alelos nulos con 10,000 iteraciones con un 99% de confianza. En GENEPOP versión Web (Raymond y Rousset 1995) se evaluó que las frecuencias alélicas estuviesen en el equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) mediante pruebas exactas (Guo y Thompson 1992) por cada locus y población. Se analizaron con 10,000 dememorizaciones, 100 *batches* y 10,000 iteraciones por *batche*. Este programa también considera el déficit o exceso de heterocigos a través del estimador de  $F_{IS}$  de Weir y Cockerman (1984). Para cuantificar los niveles de diversidad genética de las poblaciones, se utilizaron índices distintos: número de alelos por locus ( $N_A$ ), número efectivo de alelos ( $N_E$ ), heterocigosidad observada y esperada ( $H_O$ ,  $H_E$ ), índice de fijación de endogamia ( $F_{IS}$ ), diversidad ( $R$ ) y riqueza alélicas ( $A_R$ ), proporción de polimorfismos ( $P$ ) y número de alelos privados ( $P_A$ ), patrones de diversidad calculados con el programa GENALEX V. 6.5 (Peakall y Smouse 2012). Los diferentes índices de diversidad genética se analizaron con una prueba de Kruskal-Wallis (Zar 1999) en el programa STATISTICA v.7.0 para Windows (StatSoft, Inc. 2004). Las comparaciones se hicieron entre poblaciones dentro y entre localidades. Como una prueba adicional de endogamia, se obtuvo el grado de relación genética (*relatedness*) entre individuos de cada sitio, usando el estimador  $r_{qg}$  (Queller y Goodnight 1989). Se estimaron los intervalos de confianza al 95% de  $r$  mediante un remuestreo de *bootstrap* para cada población. Para calcularlo,

se empleó el programa GENALEX V. 6.5 (Peakall y Smouse 2012). Bajo un modelo de equilibrio HW se espera que el parentesco se observe dentro de los intervalos de confianza calculados esperados. Si los valores obtenidos quedan por arriba de los intervalos de confianza, entonces el incremento en el parentesco puede estar determinado por procesos como endogamia, deriva génica o sesgo reproductivo. Para determinar la estructura genética de las poblaciones se realizó una prueba global de diferenciación  $F_{ST}$ , (no asumiendo equilibrio H-W dentro de las poblaciones) realizada en el programa FSTAT V. 2.9.3.2 (Goudet 2002). De igual forma se calcularon los estadísticos  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$ . Posteriormente se calculó el grado de subdivisión entre los pares de poblaciones mediante estimaciones  $F_{ST}$  pareadas utilizando el estimador de Weir y Cockerham (1984). Las pruebas estadísticas de significancia para  $F_{ST}$  se hicieron mediante la permutación y remuestreo de los genotipos multilocus entre pares de poblaciones (10,000 permutaciones) con un nivel de confianza del 5% y posterior a la corrección de Bonferroni. Con el mismo programa y para conocer cómo se encuentra distribuida la variación genética total se hizo un análisis de varianza molecular (AMOVA). Con el programa IBDW 3.23 (Jensen *et al.* 2005) se realizó la prueba de Mantel para determinar si existe aislamiento por distancia que indique la existencia de barreras que impidan la dispersión. En el análisis se incluyeron todas las poblaciones de la RBLT y del PEJ, ocho para *A. callidryas* y 11 de *D. ebraccatus*. El análisis se hizo con 2000 permutaciones utilizando los valores de  $F_{ST}$  como distancias genéticas entre poblaciones y las distancias geográficas en kilómetros.

Para determinar si las poblaciones han pasado por cuellos de botella recientes, se utilizó el programa BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet y Luikart 1996). Los análisis se corrieron con 10,000 iteraciones utilizando el modelo de mutación de dos fases (TPM) y el modelo de mutación paso a paso (SMM). Se utilizó la prueba estadística de Wilcoxon (Luikart *et al.* 1998) ya que tiene un poder relativamente alto cuando el número de loci es bajo y además es recomendable para

tamaños de muestra menor a 15 (Cornuet y Luikart 1996).

La estructura de la población se evaluó mediante estimaciones bayesianas con el programa STRUCTURE V. 2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000). Este programa también asigna a los individuos a diferentes grupos genéticos. Se implementaron 20 iteraciones para calcular la media y varianza de la verosimilitud de  $K$  con una corrida de 1, 000, 000 iteraciones (seguidas de 1, 000, 000 iteraciones del periodo *burn in*). A partir de éstas iteraciones se determinó el valor más probable de  $K$  (valor de probabilidad posterior más alto). Finalmente los análisis estadísticos y la presentación gráfica de los resultados se realizaron en el programa Statistica para Windows v.7.0 (StatSoft, Inc. 2004)

## **Resultados**

### **Variación y diferenciación genética**

En total, cinco loci resultaron polimórficos para cada especie: para *A. callidryas*: ACA126, ACA36, ACA7, ACA127 y ACA24, mientras que para *D. ebraccatus* HEB165, HEB 231, HEB 310, HEB 337 y HEB 226 (Anexo 1, Cuadro 1). Los rangos alélicos se encontraron dentro de los reportados por Robertson *et al.* (2009). El locus ACA36 resultó monomórfico para una población (JUNG) y el locus HEB165 resultó monomórfico para dos poblaciones (NANC y MARG). El locus ACA24 (estandarizado en este estudio) es un tetranucleótido con un rango de variación alélica de 158-240. Se encontró un déficit de heterocigos significativo para tres loci en *A. callidryas* y dos en *D. ebraccatus* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Variación genética de cinco loci de microsatélites para las poblaciones de *Agalychnis callidryas* y *Dendropsophus ebraccatus* de la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas y el Parque Ecológico Jaguarundi, Veracruz (México)

	<b>n</b>	$N_A$	$H_O$	$H_E$	$F_{IS}$	$F_{IT}$
<i>A. callidryas</i>						
ACA7	116	10	0.586	0.578	-0.015	0.131
ACA24	108	19	0.710	0.787	<b>0.098</b>	0.214
ACA36	116	6	0.602	0.494	-0.219	0.073
ACA126	93	7	0.414	0.509	<b>0.187</b>	0.359
ACA127	119	10	0.468	0.562	<b>0.168</b>	0.431
<i>Promedio</i>		10.4	0.556	0.586	0.044	0.242
<i>SE</i>		2.3	0.036	0.028	0.075	0.067
<i>D. ebraccatus</i>						
HEB165	200	3	0.218	0.210	-0.095	0.047
HEB226	200	18	0.652	0.702	<b>0.071</b>	0.211
HEB231	201	16	0.726	0.779	<b>0.070</b>	0.165
HEB310	201	12	0.580	0.600	0.024	0.152
HEB337	194	7	0.536	0.479	-0.124	0.117
<i>Promedio</i>		11.2	0.542	0.554	-0.011	0.138
<i>SE</i>		2.8	0.087	0.100	0.042	0.027

$N_A$ , número total de alelos por locus de todas las poblaciones.  $H_O$ , heterocigosidad observada.  $H_E$ , heterocigosidad esperada.  $F_{IS}$ , coeficiente de endogamia.  $SE$ , error estándar. En negritas déficit de heterocigos significativo ( $p < 0.001$ ).



Después de la corrección de Bonferroni, sólo el locus ACA24 mostró desviaciones del equilibrio de HW en tres poblaciones (EZAC, REAL y JAGC) y el locus HEB231 en dos (PODA y CRUZ). Las desviaciones de HW en el locus ACA24 se deben a la presencia de alelos nulos, por lo que se recurrió a la corrección mediante el análisis de Oosterhout *et al.* (2004). No se detectó desequilibrio de ligamiento para ninguna de los loci de ambas especies. El número de alelos total para cada especie fue de 56 para *A. callidryas* y 52 para *D. ebraccatus*. El intervalo de variación en *A. callidryas* fue de 6-19 (promedio =10.4) y 3-18 alelos (promedio = 11.2) en *D. ebraccatus* (Cuadro 2). Por población, el número de alelos promedio fue de 4.6 (SE=0.4) para *A. callidryas* y 3.1 (SE=0.3) para *D. ebraccatus* (Cuadro 3).

La diversidad genética representada como la heterocigosis esperada ( $H_E$ ) fue mayor que la heterocigosis observada ( $H_O$ ) en la mayoría de las poblaciones. Se detectó un déficit de heterocigos en los cinco loci de cada especie, siendo significativo en tres poblaciones de *A. callidryas* (EZAC, REAL y JACS) y en dos poblaciones de *D. ebraccatus* (PODA y CRUZ). El número total de alelos únicos (privados) fue de 23 y 12 alelos para cada especie, respectivamente. Tres poblaciones de *A. callidryas* de RBLT tuvieron de 4 a 5 alelos únicos. En el PEJ sólo la población JAGC tuvo presencia de alelos únicos con un total de nueve. En *D. ebraccatus*, el número mayor está en NANC con cinco alelos y CRUZ y JAGS con tres (Cuadro 3).

Los parámetros de diversidad genética se muestran en el Cuadro 3. La población de *A. callidryas* que se encuentra en el continuo (EZAC) tuvo los valores promedio de diversidad mayores, sin embargo las diferencias respecto a las demás poblaciones no fueron significativas (KW-H<sub>(7,40)</sub> = 14.4439; p>0.001). En *D. ebraccatus* EZAC tuvo de los valores más altos de diversidad, pero PODA y DSJS tuvieron valores igualmente altos, sin embargo, como en *A. callidryas* las diferencias entre los valores promedio de los patrones de diversidad no son significativos (KW-H<sub>(10,55)</sub> = 9.3448, p = 0.0438, p>0.001).

### **Endogamia y parentesco genético (*relatedness*)**

El índice de endogamia ( $F_{IS}$ ) resultó positivo en la mayoría de los sitios, sin embargo sólo fue significativo para *A. callidryas* en dos poblaciones (EZAC y REAL) así como en dos localidades para *D. ebraccatus* (PODA y CRUZ) lo cual indica que hay un déficit de heterócigos debido a apareamientos no aleatorios.

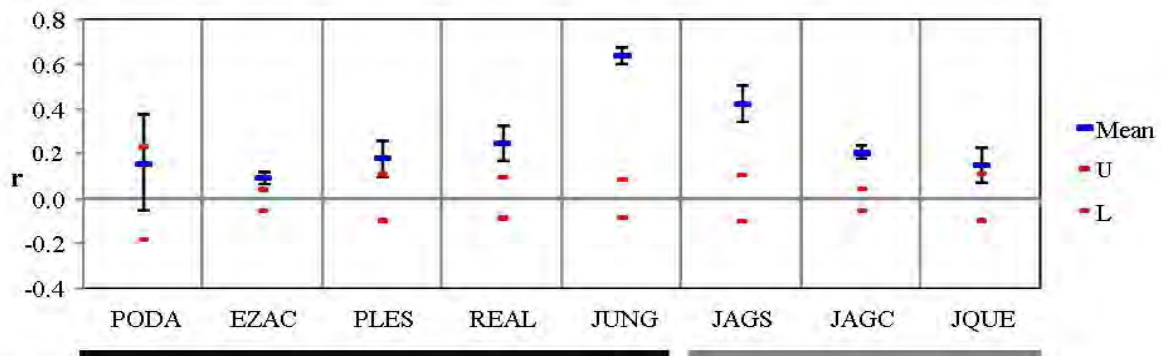
El coeficiente de parentesco  $r_{qg}$  promedio (Queller y Goodnight (1989) resultó por arriba de los intervalos de confianza esperados en la mayoría de las poblaciones de *A. callidryas*. Sin embargo, solo en dos poblaciones el parentesco entre individuos fue significativamente mayor (JUNG y JAGS) con valores de  $r_{qg}$  igual a 0.64 y 0.42, mientras que el resto está por debajo de 0.25 (Figura 2). En *D. ebraccatus*, tres poblaciones tuvieron un parentesco dentro de los intervalos de confianza esperados (PODA, EZAC, CAPE) y fue particularmente alto en las poblaciones NANC, MARG JAGS con valores promedio de  $r_{qg}$  de 0.36, 0.33 y 0.45 respectivamente. En el resto de las poblaciones, el parentesco estuvo por debajo de 0.12. Excepto en REV que fue de 0.34, aunque puede ser por el tamaño de muestra pequeño (Cuadro 3, Figura 2).

Cuadro 3. Patrones de diversidad genética de las poblaciones de *A. callidryas* y *D. ebraccatus* de la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas (RBLT) y del Parque Ecológico Jaguarundi, (PEJ).

Población	n	$N_A$	$N_E$	$P$	$H_O$	$H_E$	$R$	$A_R$	$P_A$	$F_{IS}$
<i>A. callidryas</i>										
RBLT										
2. PODA	5	3.4	2.7	1	0.600	0.612	0.690	4.37	0	0.130
3. EZAC†	24	7.0	3.8	1	0.644	0.707	0.725	3.92	4 (0.8)	<b>0.112*</b>
5. PLES	10	4.4	3.4	1	0.653	0.673	0.712	4.05	0	0.083
6. REAL†	11	5.4	3.1	1	0.530	0.624	0.661	2.30	5 (0.8)	<b>0.199**</b>
9. JUNG	13	2.6	1.8	0.8	0.374	0.385	0.402	3.08	5 (0.2)	0.071
<i>Promedio</i>		4.6	3.0	1.0	0.560	0.600	0.638	3.54	2.8	0.119
<i>SE</i>		0.8	0.34	0.04	0.05	0.06	0.06	0.38	1.16	0.02
PEJ										
12. JAGS	10	3.8	2.5	1	0.546	0.495	0.52	3.51	0	-0.051
13. JAGC†	26	5.8	3.3	1	0.553	0.594	0.607	3.41	9 (1.0)	0.089
14. JQUE	11	4.4	3	1	0.549	0.598	0.631	4.52	0	0.13
<i>Promedio</i>		4.7	2.9	1.0	0.549	0.562	0.586	3.81	3.0	0.056
<i>SE</i>		0.6	0.2	0.0	0.00	0.03	0.03	0.35	3.0	0.05
<i>D. ebraccatus</i>										
RBLT										
1. REV	4	2.4	2	0.6	0.3	0.369	0.442	3.67	0	0.3121
2. PODA	27	6.8	4.4	1	0.526	0.612	0.625	3.60	1 (0.2)	<b>0.159**</b>
3. EZAC	26	6.6	3.8	1	0.62	0.62	0.585	3.23	0	0.019
4. CAPE	6	4	2.8	1	0.667	0.611	0.667	3.32	0	0
5. PLES	10	4.2	3.4	1	0.72	0.605	0.632	3.55	0	-0.139
7. DSJS	21	6.4	3.4	1	0.596	0.637	0.654	2.86	1 (0.2)	0.089
8. NANC	13	4	2.7	0.8	0.415	0.466	0.488	3.52	5	0.148
10. CRUZ†	15	5.4	3.6	1	0.569	0.634	0.66	2.49	3	<b>0.138*</b>
11. MARG	17	3.4	2.1	0.8	0.420	0.430	0.445	2.81	0	0.056
<i>Promedio</i>		4.8	3.1	0.911	0.54	0.55	0.58	3.23	1.11	0.09
<i>SE</i>		0.5	0.3	0.0	0.05	0.03	0.03	0.1	0.6	0.04
PEJ										
12. JAGS	25	4.8	2.3	1	0.573	0.499	0.508	3.33	0	0.128
14. JQUE†	32	6	4	1	0.553	0.566	0.575	3.72	3 (0.4)	0.039
<i>Promedio</i>		5	3	1	0.563	0.533	0.542	3.53	1.5	0.0835
<i>SE</i>		0.4	0.75	0	0.01	0.03	0.03	0.19	1.50	0.04

n, tamaño promedio de muestra.  $N_A$ , número promedio de alelos.  $N_E$ , número de alelos efectivos.  $P$ , proporción de polimorfismos.  $H_O$ ,  $H_E$  heterocigosidad observada y esperada.  $R$ , diversidad genética de Nei (1987).  $A_R$ , riqueza alélica,  $P_A$ , alelos únicos, en paréntesis las frecuencias totales por población.  $F_{IS}$ , coeficiente de endogamia. †Poblaciones fuera de equilibrio HW. En negritas los valores que resultaron significativos. Déficit significativo de heterócigos significativo \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

*A. callidryas*



*D. ebraccatus*

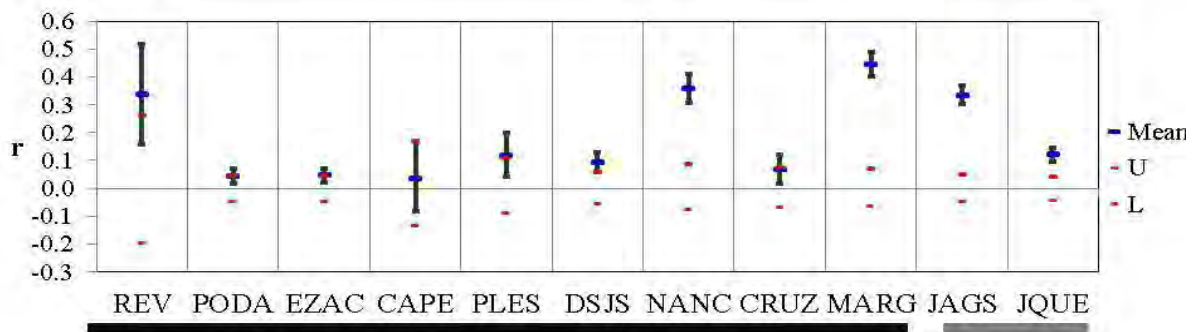


Figura 2. Valores promedio de parentesco dentro de cada población de *A. callidryas* y *D. ebraccatus* la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas (barra negra) y Parque Jaguarundi (barra gris). Las barras rojas son los valores superior e inferior de los intervalos de confianza con 95% generado con 9999 permutaciones. Las barras azules son los valores promedio de parentesco realizado con 999 réplicas de *bootstrap*.

## Cuellos de botella

Los resultados del análisis de BOTTLENECK mostraron diferencias con los modelos de mutación empleados (Cuadro 4). En *A. callidryas*, la mayoría de las poblaciones (excepto JUNG y JAGS) mostraron indicios de cuello de botella. En las poblaciones PODA, PLES y JQUE la reducción poblacional está asociada a un exceso significativo de heterócigos lo que confirma que estas poblaciones han pasado por eventos de cuellos de botella recientes (Cuadro 4). En *D. ebraccatus* sólo PLES mostró signos de cuello de botella recientes asociados a un exceso de heterócigos significativo (Cuadro 5). Respecto a la distribución de las frecuencias alélicas, tres poblaciones de *A. callidryas* (PODA, PLES y JUNG) y dos para *D. ebraccatus* (REV y PLES) mostraron cambios en la distribución normal de la distribución de alelos de baja frecuencia ( $<0.1$ ) respecto a los alelos de frecuencia “intermedia” (Storfer *et al.* 2014). Dado que los cuellos de botella pueden causar cambios transitorios en menos de una docena de generaciones el cambio en la distribución alélica sugiere que las poblaciones han pasado por eventos de cuello de botella pasados (Luikart *et al.* 1998). En el caso de JUNG, el cambio en la distribución de las frecuencias alélica sólo sugiere que dichos eventos ocurrieron, mientras que en REV puede tener un sesgo, por el bajo tamaño de muestra de esta población (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resultados del análisis de cuellos de botella para las poblaciones de *A. callidryas* y *D. ebraccatus* de la Reserva de la Biosfera los Tuxtlas y Parque Ecológico Jaguarundi (en gris)

TPM			SMM		Distribución de la frecuencia de alelos
Población	Dirección	* <i>P</i>	Dirección	* <i>P</i>	
<i>A. callidryas</i>					
<b>PODA</b>	<b>Exceso</b>	<b>0.016</b>	<b>Exceso</b>	<b>0.031</b>	<b>Shifted mode</b>
<b>EZAC</b>	No hay desviación	0.406	<b>Deficiencia</b>	<b>0.031</b>	Normal L-shaped
<b>PLES</b>	<b>Exceso</b>	<b>0.016</b>	<b>Exceso</b>	<b>0.047</b>	<b>Shifted mode</b>
<b>REAL</b>	No hay desviación	0.109	<b>Deficiencia</b>	<b>0.031</b>	Normal L-shaped
JUNG	No hay desviación	0.125	No hay desviación	0.875	<b>Shifted mode</b>
JAGS	No hay desviación	0.813	No hay desviación	1.000	Normal L-shaped
<b>JAGC</b>	No hay desviación	0.594	<b>Deficiencia</b>	<b>0.047</b>	Normal L-shaped
<b>JQUE</b>	<b>Exceso</b>	<b>0.047</b>	Exceso	0.406	Normal L-shaped
<i>D. ebraccatus</i>					
REV	No hay desviación	0.250	No hay desviación	0.375	<b>Shifted mode</b>
<b>PODA</b>	No hay desviación	0.813	<b>Deficiencia</b>	<b>0.047</b>	Normal L-shaped
<b>EZAC</b>	No hay desviación	0.156	<b>Deficiencia</b>	<b>0.016</b>	Normal L-shaped
CAPE	No hay desviación	0.813	No hay desviación	0.813	Normal L-shaped
<b>PLES</b>	<b>Exceso</b>	<b>0.016</b>	<b>Exceso</b>	<b>0.016</b>	<b>Shifted mode</b>
DSJS	No hay desviación	1.000	No hay desviación	0.625	Normal L-shaped
NANC	No hay desviación	0.875	No hay desviación	1.000	Normal L-shaped
CRUZ	No hay desviación	0.219	No hay desviación	0.813	Normal L-shaped
<b>MARG</b>	No hay desviación	0.875	<b>Deficiencia</b>	<b>0.031</b>	Normal L-shaped
<b>JAGS</b>	No hay desviación	0.625	<b>Deficiencia</b>	<b>0.016</b>	Normal L-shaped
QUEJ	No hay desviación	0.625	No hay desviación	0.625	Normal L-shaped

\* Valores de probabilidad de la prueba de Wilcoxon para las desviaciones del equilibrio mutación-migración medidas como un exceso de heterócigos (cuello de botella) deficiencia de heterócigos (expansión poblacional) o que no exista desviación (no hay ni exceso y déficit significativo de heterócigos,  $P > 0.05$ ). TPM: modelo mutacional de dos fases, SMM: modelo mutacional paso a paso.

## Diferenciación genética

Los valores de  $F_{ST}$  globales fueron de 0.208 (SE= 0.034) y 0.145 (SE= 0.019) para *A. callidryas* y *D. ebraccatus*, respectivamente. Los valores más altos en ambas especies se dan entre las dos regiones RBLT y PEJ, siendo significativos en ambas especies (Cuadro 5). En las poblaciones de RBLT más de la mitad de las comparaciones de  $F_{ST}$  resultaron significativas con valores que van de 0.077 a 0.447 en *A. callidryas* y 0.011 a 0.351 en *D. ebraccatus*. Particularmente las poblaciones que se encuentran asociadas al Lago Catemaco (JUNG, NANC, MARG, CRUZ, DSJS), fueron las más estructuradas, ya que los valores de diferenciación genética fueron mayores y resultaron significativos (Cuadro 5). La población JUNG de *A. callidryas*, fue la que mostró una estructura genética alta ya que presentó los valores más altos y significativos de diferenciación genética respecto a las demás (0.282-0.447). Mientras que NANC y MARG son las poblaciones de *D. ebraccatus* con los valores de  $F_{ST}$  mayores (0.64-0.332) respecto a las demás. Las poblaciones de PEJ presentan los valores de  $F_{ST}$  menores (-0.004 a 0.028) en *A. callidryas*, sin embargo en *D. ebraccatus* aunque es baja la diferenciación entre las dos poblaciones muestreadas es significativa ( $F_{ST}= 0.087$ ,  $p<0.001$ ). Respecto al análisis de AMOVA, el 66 y 81% de la variación molecular está en los individuos de *A. callidryas* y *D. ebraccatus*, respectivamente. En *A. callidryas* el 19% está distribuido entre los individuos y el 16% entre poblaciones. En *D. ebraccatus* la varianza entre individuos es de 9% y 10% entre poblaciones.

Cuadro 5. Comparaciones pareadas de diferenciación genética ( $F_{ST}$ , debajo de la diagonal) y distancias geográficas entre poblaciones (km, arriba de la diagonal). En blanco las poblaciones de la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas. En gris las poblaciones del Parque Ecológico Jaguaroundi. En negritas, los valores significativamente diferentes de cero ( $p < 0.01$ )

*A. callidryas*

	PODA	EZAC	PLES	REAL	JUNG	JAGS	JAGC	JQUE
PODA	0	5.5	0.3	11.9	20.8	96.8	96.3	99.0
EZAC	0.077	0	5.7	8.6	15.3	93.2	92.7	95.5
PLES	<b>0.072</b>	<b>0.079</b>	0	12.0	21.0	96.8	96.4	99.1
REAL	0.119	0.068	<b>0.135</b>	0	13.5	85.0	84.5	87.2
JUNG	<b>0.447</b>	<b>0.282</b>	<b>0.291</b>	<b>0.418</b>	0	83.5	82.9	85.8
JAGS	<b>0.160</b>	<b>0.150</b>	<b>0.250</b>	<b>0.193</b>	<b>0.460</b>	0	0.6	2.4
JAGC	<b>0.126</b>	<b>0.112</b>	<b>0.208</b>	<b>0.162</b>	<b>0.366</b>	0.021	0	3.0
JQUE	0.063	<b>0.063</b>	<b>0.149</b>	<b>0.136</b>	<b>0.375</b>	0.028	-0.004	0

*D. ebraccatus*

	REV	PODA	EZAC	CAPE	PLES	DSJS	NANC	CRUZ	MARG	JAGS	JQUE
REV	0	10.3	14.4	16.7	10.2	37.8	28.7	31.4	38.4	107.1	102.7
PODA	0.090	0	5.5	6.6	0.3	31.4	20.7	22.6	30.2	96.8	99.0
EZAC	0.100	<b>0.024</b>	0	3.3	5.7	26.0	15.3	17.3	24.8	93.2	95.5
CAPE	0.112	0.045	0.023	0	6.8	26.4	26.4	16.4	16.4	90.5	90.0
PLES	0.077	<b>0.047</b>	0.011	0.016	0	31.6	20.9	22.8	30.4	96.8	99.1
DSJS	<b>0.138</b>	<b>0.081</b>	<b>0.042</b>	-0.019	<b>0.041</b>	0	11.7	13.0	7.9	83.7	86.1
NANC	<b>0.332</b>	<b>0.198</b>	<b>0.177</b>	<b>0.198</b>	<b>0.220</b>	<b>0.203</b>	0	4.2	9.7	83.6	86.0
CRUZ	0.094	0.023	<b>0.042</b>	0.029	<b>0.039</b>	<b>0.069</b>	<b>0.197</b>	0	8.1	79.6	81.9
MARG	<b>0.351</b>	<b>0.194</b>	<b>0.190</b>	<b>0.222</b>	<b>0.227</b>	<b>0.216</b>	0.064	<b>0.163</b>	0	77.0	73.6
JAGS	0.040	<b>0.127</b>	<b>0.100</b>	0.080	<b>0.070</b>	<b>0.094</b>	<b>0.266</b>	<b>0.107</b>	<b>0.258</b>	0	2.4
JQUE	<b>0.077</b>	<b>0.051</b>	<b>0.018</b>	0.020	<b>0.027</b>	<b>0.049</b>	<b>0.203</b>	<b>0.054</b>	<b>0.220</b>	<b>0.087</b>	0



## Estructura genética y aislamiento por distancia

El aislamiento genético por distancia geográfica tuvo un efecto significativamente positivo en *A. callidryas* ( $Z=8.078$ ,  $r=0.393$ ,  $p= 0.0002$ ,  $n = 28$ ; Figura 3), mientras que en *D. ebraccatus* la relación no fue significativa ( $Z=8.079$ ,  $r = 0.098$ ,  $p = 0.2745$ ,  $n =55$ ; Figura 3). Los resultados de estructura poblacional obtenidos en STRUCTURE, en *A. callidryas* no arrojaron resultados consistentes con los modelos probados. Aplicando el método  $\Delta K$  de Evanno *et al.* (2005) bajo un modelo de *admixture* con las frecuencias alélicas correlacionadas y no correlacionadas se obtuvieron seis y cuatro grupos respectivamente ( $K=6$ ,  $K=4$ ). Bajo un modelo de *No admixture* se obtuvieron valores de  $K=6$  y  $K=5$  cuando las frecuencias están correlacionadas (Figura 4). Por otro lado, los resultados fueron consistentes con los diferentes modelos, al separar las dos áreas (RBLT y PEJ) las cuales muestran una estructura genética distinta. Al interior de cada área, la estructura genética entre poblaciones es baja y por tanto un flujo génico alto, excepto en JUNG, la cual se observa como un grupo completamente distinto y con bajos indicios de flujo génico respecto al resto de las poblaciones (Figura 4). Para *D. ebraccatus*, la estructura genética fue baja, ya que el número de grupos fue de tres para todos los modelos probados ( $K=3$ ). El primer grupo está bien definido y formado por las poblaciones NANC y MARG (RBLT). El segundo grupo es JAGS (PEJ) y el tercero estaría formado por el resto de las poblaciones. Lo anterior parece mostrar un flujo génico relativamente alto a pesar de la distancia geográfica que hay entre las localidades de RBLT y PEJ.

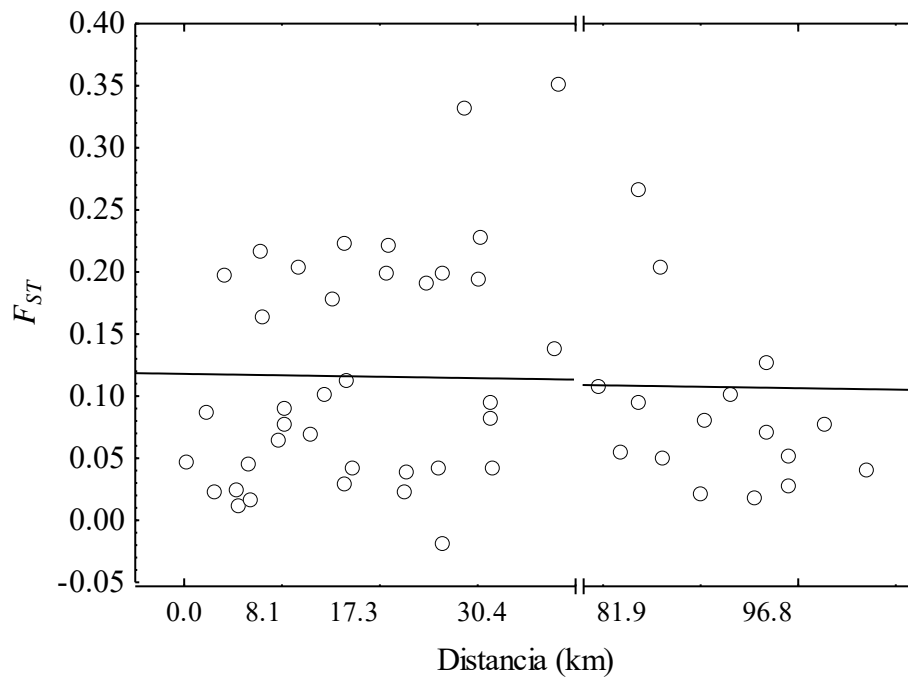
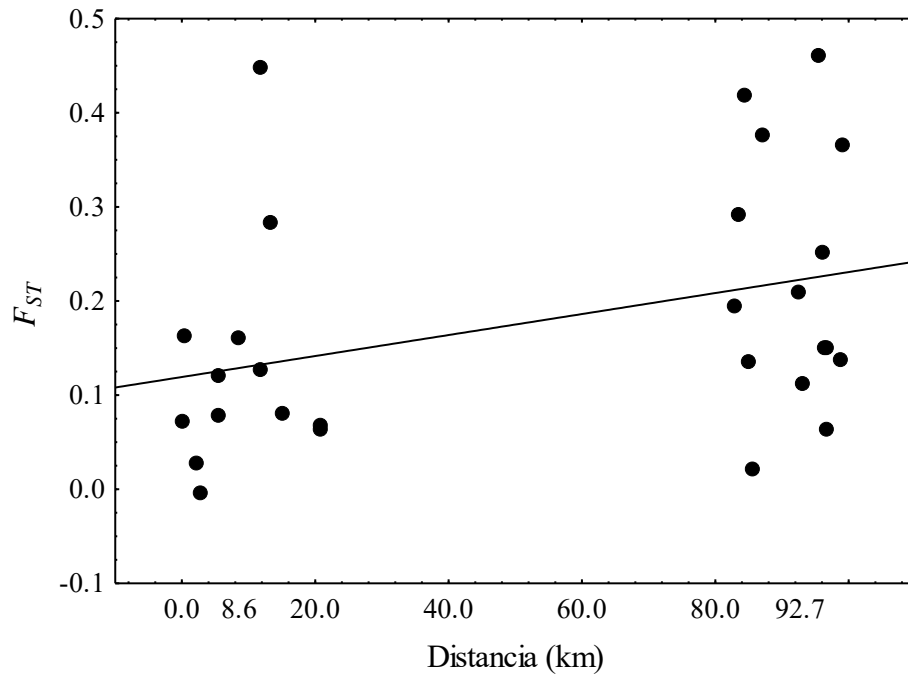
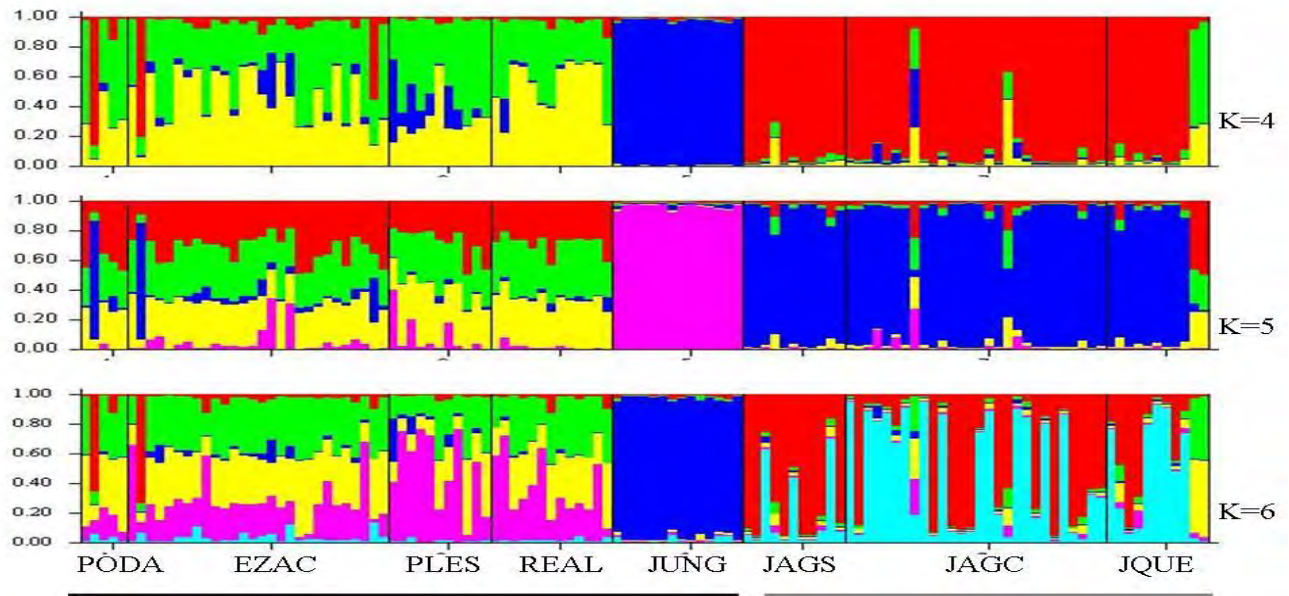


Figura 3. Aislamiento por distancia entre las poblaciones de *A. callidryas* (arriba) y *D. ebraccatus* (abajo) de la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas y Parque Ecológico Jaguaroundi.

*A. callidryas*



*D. ebraccatus*

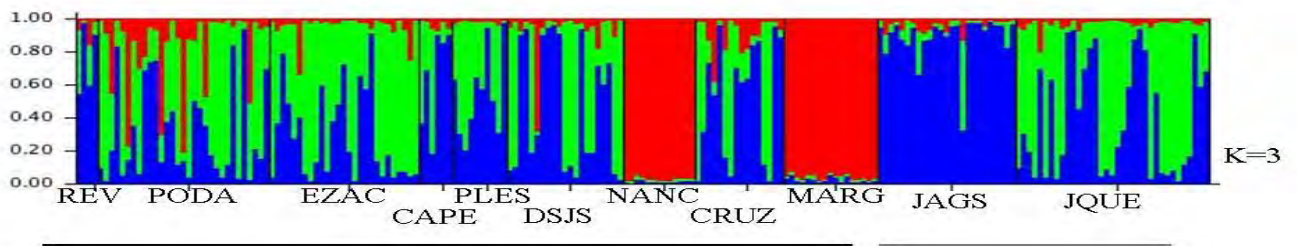


Figura 4. Análisis Bayesiano de las poblaciones de *A. callidryas* y *D. ebraccatus*. Cada línea vertical representa un individuo. Los colores representan los diferentes grupos genéticos (K) al que pertenece cada sitio de la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas (barra negra) y Parque Jaguaroundi (barra gris) Las escala de la izquierda representa la probabilidad de asignación de cada individuo.

## Discusión

En este estudio se observó que las alteraciones de la vegetación primaria por actividades antropogénicas, como la deforestación, ganadería, urbanización y petroleras han llevado a la erosión de la diversidad genética en poblaciones de *A. callidryas* y *D. ebraccatus* al encontrarse indicios de reducciones poblacionales y del flujo génico.

La variación genética para ambas especies es menor a la reportada para poblaciones de Costa Rica y Panamá (Robertson *et al.* 2009). Una baja diversidad genética puede ser resultado de la historia biogeográfica de estas especies como ocurre con otras de afinidad tropical y amplio intervalo de distribución (Cortés-Ortiz *et al.* 2003, Dunn *et al.* 2014). Una baja diversidad genética también puede estar influenciada por la escala geográfica, que en este estudio fue mucho menor que el empleado en Centroamérica. Sin embargo, los valores de diversidad genética en las poblaciones de ambas especies están en el rango de bajo a intermedio, lo cual es similar a los reportes de otros estudios de anfibios en zonas fragmentadas y perturbadas (e.g. Beebee y Rowe 2001, Andersen *et al.* 2004, Spear y Storfer 2010, 2012, Krug y Pröhl 2013, Sunny *et al.* 2014, Dias *et al.* 2015).

En este trabajo, solamente se tuvo un sitio de referencia, el cual está dentro del continuo de selva (EZAC) en la RBLT. EZAC fue el sitio con los valores de diversidad genética mayores para ambas especies y corresponde a una laguna semitemporal con una extensión de 958.9 x 267.8 m. Por su magnitud, y grado de conservación puede mantener poblaciones grandes y estables, y por lo tanto, presenta una diversidad genética mayor. Sin embargo, y contrario a lo esperado, la población de *A. callidryas* mostró signos de endogamia, así como la presencia de alelos privados (alelos únicos), por lo que esta población ha pasado por reducciones y aislamiento poblacionales. Particularmente de esta laguna se extraían de forma ilegal individuos de esta especie para la venta en mercados de macotas de la Ciudad de México (Matías-Ferrer y Escalante

2015), sin embargo se desconoce la magnitud de la extracción, pero podría ser la causante del declive de la población. Por otro lado, el análisis de BOTTLENECK indica que EZAC tiene un déficit de heterocigos significativo, tanto en *A. callidryas* como en *D. ebraccatus*, lo cual indica que está en expansión poblacional.

En ambientes donde las poblaciones se han reducido y han estado aisladas por un tiempo prolongado, la probabilidad de que alelos de baja frecuencia se fijen en la población por deriva génica es mayor (Allendorf y Luikart 2007). Lo cual incrementa la divergencia genética de las poblaciones. Los efectos de la deriva génica parecen ser mayores en *A. callidryas* que en *D. ebraccatus* debido a que la mitad de las poblaciones mostraron más de cuatro alelos privados, y en una de ellas hasta nueve alelos (Cuadro 3). Los efectos de la deriva génica no sólo implica la pérdida de la heterocigosidad sino también el aumento en la homocigosis, lo que se traduce en un incremento en la endogamia (Allendorf y Luikart 2007). En dos poblaciones de cada especie se observó un coeficiente de endogamia significativo (*A. callidryas*: EZAC y REAL; *D. ebraccatus*: PODA y CRUZ). Mientras que otras tres poblaciones (JUNG, DSJS, y JQUE) con presencia de alelos privados pudieron no estar aisladas el tiempo suficiente como para que tanto los efectos de la deriva y la endogamia se observen.

En cuanto al parentesco entre individuos dentro de cada población (*relatedness*), los valores promedio en la mayoría fueron mayores a los intervalos de confianza esperados principalmente en *A. callidryas* (Figura 2). En especies de anfibios que se congregan en estanques para la reproducción, se espera que el parentesco entre individuos sea alto debido a que generalmente se trata de especies con alta fidelidad a los sitios de reproducción (Jehle *et al.* 2005), particularmente los machos (Kraaijeveld *et al.* 2005). Sin embargo, también se espera en especies con un sesgo reproductivo (Zamudio y Wiczorek 2007). En este sentido, las hembras de *A. callidryas* prefieren machos de mayor talla (Briggs 2008) lo cual puede explicar que el

parentesco observado sea mayor que en *D. ebraccatus*, en donde no hay una preferencia de las hembras por un fenotipo determinado de los machos (Blackwell y Jennions 1993).

Otros procesos como efecto fundador también pueden incrementar el parentesco entre las poblaciones (Allendorf y Luikart 2007). Después de una nueva colonización por un número pequeño de individuos (efecto fundador), las frecuencias alélicas pueden ser diferentes a las frecuencias de la población de origen así como mostrar una heterocigosidad reducida (Lowe *et al.* 2005). En dos poblaciones de *A. callidryas* (JUNG y JAGS) y tres de *D. ebraccatus* (NANC, MARG y JAGS) el parentesco entre individuos (*relatedness*) es particularmente alto y con índices de diversidad bajos (Figura 2, Cuadro 3). Además, en JUNG, NANC y MARG hubo un menor polimorfismo (0.8) asociado a una heterocigosidad baja (<0.466). En estas poblaciones, el alto parentesco puede ser reflejo de un efecto fundador, el cual también produce un cambio en la distribución de las frecuencias alélicas respecto a la normalidad (Luikart *et al.* 1998), similar a un cuello de botella (Cuadro 3).

Los resultados del análisis de BOTTLENECK indican que algunas poblaciones (*A. callidryas*: PODA, PLES, y JQUE; *D. ebraccatus*: REV y PLES) han pasado por eventos de cuellos de botella recientes y asociados a un exceso de heterócigos (Cuadro 4). Aunque los cuellos de botella pueden implicar la pérdida de la diversidad genética (Frankham *et al.* 2002, Reed y Frankham 2003, Cushman 2006), no se observó una reducción significativa de esta (Cuadro 1) pero sí cambios en las frecuencias alélicas que pueden estar incrementando la diferenciación genética respecto a las demás poblaciones (Cuadros 3 y 4).

La diferenciación genética fue significativa para ambas especies, principalmente entre las dos áreas, RBLT y PEJ (Cuadro 5), que puede explicarse en términos de la distancia entre ambas áreas (45 km aprox.) y que se espera por tratarse de especies con un bajo potencial de dispersión como las ranas. Por otro lado, en *A. callidryas*, las distancias genéticas tienen una relación

positivamente significativa con las distancias geográficas, lo cual indica que la dispersión está limitada por la distancia geográfica. Por el contrario en *D. ebraccatus*, la prueba de Mantel no fue significativa, por lo que la dispersión estaría limitada por barreras relacionadas con la talla corporal (Robertson et al. 2009) o el hábitat puede reunir los requerimientos de hábitat por lo que no requieren de grandes desplazamientos.

La diferenciación genética encontrada en ambas especies puede haberse incrementado por los factores demográficos que se han mencionado anteriormente (deriva génica, endogamia, filopatría, efecto fundador y cuellos de botella). Estos pueden provocar cambios en las frecuencias alélicas debido a la reducción y aislamiento poblacional con la consecuente pérdida del flujo génico. Lo anterior se ha observado en paisajes fragmentados en donde el aislamiento provoca la pérdida de la conectividad y entonces el incremento de la diferenciación genética entre las poblaciones remanentes (Hitchings y Beebee 1997, 1998). Además, una diferenciación genética significativa también puede evidenciar barreras físicas al flujo génico. En este sentido, en RBLT una población tuvo una diferenciación genética significativa en ambas especies (PLES) que puede estar asociada a la pendiente, que estudios previos han documentado como una limitante a la dispersión de anuros (Funk *et al.* 2005). Esta población se encuentra a nivel del mar, mientras que el resto están por arriba de los 10 msnm. Entre las poblaciones del norte de la RBLT y las poblaciones asociadas al lago de Catemaco, la diferenciación genética fue significativa, lo cual puede deberse a la distancia geográfica y a que se encuentran en cuencas diferentes. Las poblaciones de *D. ebraccatus* asociadas al Lago Catemaco, mantienen una diferenciación genética significativa a pesar de la corta distancia que hay entre ellas. Lo anterior puede ser debido al efecto fundador encontrado en dos poblaciones (NANC y MARG). Por otro lado, el sitio DSJS se encuentra en la parte alta del lago y aislada por una carretera (Figura 1). Entre las poblaciones del PEJ, no hay una diferenciación genética significativa en *A. callidryas*

mientras que en *D. ebraccatus* las dos poblaciones del PEJ están genéticamente diferenciadas (Cuadro 5). En PEJ es un área más pequeña (1040 ha) y plana, por lo que la distancia entre los estanques no limita el flujo génico en una especie de talla mediana como es *A. callidryas*. En cambio, *D. ebraccatus*, por ser más pequeña parece no estar limitada por la distancia geográfica como se observó en la prueba de Mantel. Además, la diferenciación genética entre las poblaciones de *D. ebraccatus* parece incrementarse por el alto parentesco observado en JAGS (Cuadro 5, Figura 2).

En paisajes fragmentados, se ha detectado una estructura genética alta causada por la pérdida o reducción del flujo génico entre poblaciones (Kraaijeveld-Smit *et al.* 2003, Andersen *et al.* 2004, Aguilar *et al.* 2013, Krug y Pröhl 2013). Sin embargo, los resultados de STRUCTURE muestran que sólo en *A. callidryas* el flujo génico se ha interrumpido, entre las dos áreas evaluadas (RBLT y PEJ), lo cual también coincide con los resultados de diferenciación genética. En *D. ebraccatus*, la estructura genética con STRUCTURE fue baja, inclusive entre las dos áreas, siendo sólo marcada en las poblaciones con efecto fundador (NANC y MARG) en JAGS a pesar de la diferenciación genética encontrada. Por lo anterior, el aislamiento entre las dos áreas puede ser reciente o bien los efectos de la perturbación aún no alcanzan a reflejarse en la estructura poblacional.

Una baja estructura genética puede ser resultado de procesos microevolutivos que alteran la frecuencia de ciertos alelos y entonces los cambios se mantienen a lo largo del tiempo (Zamudio y Wiczorek 2007). Sin embargo, también puede deberse a un flujo génico alto o que ha sido relativamente reciente. La abundancia de anfibios está íntimamente relacionada con las precipitaciones, por lo que en lluvias intensas la conectividad se puede restablecer o incrementar entre poblaciones (Neckel-Oliveira y Gascón 2006) y por tanto el flujo génico. En 2009 la región sufrió una sequía intensa en donde la mayoría de los estanques estaban secos o no tenían



suficiente agua para que estas especies se congregaran para la reproducción. En el 2010 ocurrieron severas inundaciones que no sólo favorecieron la formación y permanencia de los estanques sino también de la vegetación circundante. Considerando que la mayoría de los estanques se encuentran en sitios con alto disturbio (e.g. potreros), las lluvias intensas podrían proporcionar un ambiente menos estresante para el desplazamiento de los individuos, así como un incremento en el número de estanques, lo cual puede favorecer la conectividad entre las poblaciones.

Respecto a las diferencias encontradas entre ambas especies, estudios previos han hecho énfasis en la importancia de las características de las especies, como la especialización del hábitat, su potencial de dispersión, la tolerancia ecológica y la disponibilidad del hábitat (Peakall y Lindenmayer 2006) como determinantes en la respuesta a las alteraciones del hábitat. En este sentido, se esperaría que *A. callidryas* fuera la menos susceptible a los cambios producidos por la pérdida y fragmentación de la selva, debido a que potencialmente se puede desplazar distancias mayores y entonces podría mantener el flujo génico. Sin embargo, la diferenciación genética alta parece estar estrechamente relacionada con la reducción del hábitat, ya que fueron muy pocos los sitios en donde esta especie se encontró (solo en cinco estanques) en toda la RBLT, mientras que en PEJ los estanques mantienen una baja perturbación y cobertura del dosel, el cual es un elemento básico para la reproducción y permanencia de los individuos (Matías-Ferrer y Escalante 2015).

Finalmente, se deben implementar estrategias de manejo para el restablecimiento del flujo génico mediante la creación de estanques con el fin de asegurar la conectividad entre sitios con alta y baja perturbación. Estos esfuerzos de conservación son necesarios y deben ser acompañados por el monitoreo genético (Reed y Frankham 2003), para prevenir futuras reducciones poblacionales que puedan incrementar la erosión genética.

## Literatura citada

- Aguilar, A., R. B., Douglas, E. Gordon, J. Baumsteiger y M. O Goldsworthy. 2013. Elevated genetic structure in the coastal tailed frog (*Ascaphus truei*) in managed redwood forests. *Journal of Heredity*, 104: 202-216.
- Allendorf, F. W. y G. Luikart. 2007. Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing, Malden, Massachusetts, USA.
- Allentoft, M. E., H. R. Siegismund, L. Briggs y L. W. Andersen. 2009. Microsatellite analysis of the natterjack toad (*Bufo calamita*) in Denmark: populations are islands in a fragmented landscape. *Conservation Genetics*. 10: 15-28.
- Andersen, L. W., K. Fog y C. Damgaard. 2004. Habitat Fragmentation Causes Bottlenecks and Inbreeding in the European Tree Frog (*Hyla arborea*). *Proceedings Biological Sciences the Royal Society*. 271: 1293–1302.
- Arens, P. T., W. P. C. van't Westende, B. Vosman, C. C. Vos y M. J. M. Smulders. 2007. Genetic population differentiation and connectivity among fragmented Moor frog (*Rana arvalis*) populations in The Netherlands. *Landscape Ecology*. 22: 1489-1500.
- Backwell, P. R. y M. D. Jennions. 1993. Mate choice in the neotropical frog, *Hyla ebraccata*: sexual selection, mate recognition and signal selection. *Animal behavior*. 45: 1248-1250.
- Becker, C. G., C. R. Fonseca, C. F. B. Haddad, R. F. Batista y P. I. Prado. 2010. Habitat Split as a Cause of Local Population Declines of Amphibians with Aquatic Larvae. *Conservation Biology*. 24: 287–294.
- Beebee, T. J. C. 2005. Conservation genetics of amphibians. *Heredity*, 95: 423-427.

- Beebee, T. J. C. y G. Rowe. 2000. Microsatellite analysis of natterjack toad *Bufo calamita* Laurenti populations: consequences of dispersal from a Pleistocene refugium. *Biological Journal of the Linnean Society*. 69: 367-381.
- Beebee, T. J. C. y G. Rowe. 2001. Application of Genetic Bottleneck Testing to the Investigation of Amphibian Declines: A Case Study with Natterjack Toads. *Conservation Biology*. 15: 266-270.
- Briggs, V. S. 2008. Mating patterns of red-eyed treefrogs, *Agalychnis callidryas* and *A. moreletii*. *Ethology*. 114: 489-498.
- Cabrera-Guzmán, E. y V. H. Reynoso. 2012. Amphibian and reptile communities of rainforest fragments: minimum patch size to support high richness and abundance. *Biodiversity Conservation*. 21: 3267–3268.
- Castillo-Campos, G. y J. D. Laborde. 2004. La Vegetación. Pp: 231-270. In: Los Tuxtlas. El Paisaje de la Sierra. (Eds. Guevara S. S., J. Laborde D. y G. Sánchez-Ríos). Instituto de Ecología A. C.-Unión Europea. México 288 pp.
- Cedeño-Vázquez, J. R., R. Calderón-Mandujano y C. Pozo. 2006. Anfibios de la Región de Calakmul Campeche, México. CONABIO/ECOSUR/CONANP/PNUD-GEF/SHM A. C. México. 104 pp.
- Cortés-Ortiz, L., E. Bermingham, C. Rico, E. Rodríguez-Luna, I. Sampaio y M. Ruiz-García. 2003. Molecular systematics and biogeography of the Neotropical monkey genus, *Alouatta*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 26: 64-81.
- Challenger, A., y J. Soberón. 2008. Los ecosistemas terrestres. In, Capital natural de México vol. I. Pp. 87-108. Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México,
- Cornuet, J. M. y G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two test for detecting recent population bottleneck from allele frequency data. *Genetics*. 144: 2001-2014.

- Crump, M. L. 2003. Conservation of amphibians in the New World tropics. , Pp. 53-69. *In*: Semlitsch, R.D. (edt.) Amphibian Conservation. Smithsonian Institution. USA.
- Cushman, S. A. 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological Conservation*. 128:231-240.
- Dias, G., J. F. Beltrán, M. Tejedo, M. Benítez , E. González Miras, N. Ferrand y H. Gonçalves 2015. Limited Gene Flow and High Genetic Diversity in the Threatened Betic Midwife Toad (*Alytes dickhilleni*): Evolutionary and Conservation Implications. *Conservation Genetics*. 16: 459-476.
- Dirzo, R. y M. C. Garcia. 1992. Rates of deforestation in Los Tuxtlas, a Neotropical area in southeast Mexico. *Conservation Biology*. 6: 84-90.
- Dixo, M., J. P. Metzger, J. S. Morgante y K. R. Zamudio. 2009. Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. *Biological Conservation*. 142: 1560–1569.
- Donnelly, M. A. y C. Guyer. 1994. Patterns of reproduction and habitat use in an assemblage of Neotropical hylid frogs. *Oecologia*. 98: 291–302.
- Duellman, W. E. 1970. The hylid frogs of Middle America. Monograph. *Museum Natural University of Kansas*. (1, 2): 1-753.
- Dunn, J. C., A. Shedden-González, J. Cristóbal-Azkarate, L. Cortés-Ortiz, E. Rodríguez-Luna y L. A. Knapp. 2014. Limited genetic diversity in the critically endangered Mexican howler monkey (*Alouatta palliata mexicana*) in the Selva Zoque, Mexico. *Primates*, 55: 155-160.
- Emel, S. y A. Storfer. 2012. A decade of amphibian population genetic studies: synthesis and recommendations. *Conservation Genetics*. 13: 1685-1689.
- Evanno, G., S. Regnaut y J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14: 2611-2620.

- Fischer, J. y D. B. Lindenmayer. 2007. Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. *Global Ecology Biogeography*. 16:265–280.
- Frankham, R., J. D. Ballou y D. A. Briscoe. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge.
- Funk, W. C., M. Blouin, P. Stephen, B. Maxell, D. Pilliod, S. Amish, y F. Allendorf. 2005. Population structure of Columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) is strongly affected by the landscape. *Molecular Ecology*. 14: 483-496.
- Gardner, T. A., J. Barlow, N. S. Sodhi, y C. A. Peres. 2010. A multi-region assessment of tropical forest biodiversity in a human-modified world. *Biological Conservation*. 143: 2293-2300.
- Goudet, J. 2002. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> .
- Green, D. M. 2003. The ecology of extinction: population fluctuation and decline in amphibians. *Biological Conservation*. 111: 331–343.
- Guo, S. W. y E. A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiples alleles. *Biometrics*. 48: 361-372.
- Herrera, L. G., V. H. Reynoso, D. Curiel, N. Ramírez, M. Rodríguez, L. Mirón, R. Sánchez, S. Aguilar, F. Carmona, J. Urbina y A. González. 2008. La riqueza faunística en un ambiente perturbado: el caso del Parque Ecológico Jaguaroundi. Pp: 79-100. In, El Parque Ecológico Jaguaroundi. Conservación de la selva tropical veracruzana en una zona industrializada. (Eds. Y. Nava e I. Rosas). PUMA-UNAM, SEMARNAT, INSTITUTO DE ECOLOGIA
- Henle, K., D. B. Lindenmayer, C. R. Margules, D. A. Saunders, y C. Wissel. 2004. Species survival in fragmented landscapes: where are we now? *Biodiversity and Conservation*. 13: 1–8.

- Hernández-Ordóñez, O., M. Martínez-Ramos, V. Arroyo-Rodríguez, A. González-Hernández, A. González-Zamora, D. Zárate y V. H. Reynoso. 2014. Checklist, distribution and conservation status of the amphibians and reptiles in the Lacandona rainforest, Mexico: an update after 20 years of research. *Tropical Conservation Science*. 7:1-25.
- Hitchings, S. P. y T. J. C. Beebee. 1997. Genetic substructuring as a result of barriers to gene flow in urban common frog (*Rana temporaria*) populations: Implications for biodiversity conservation. *Heredity*. 79: 117–27.
- Hitchings, S. P. y T. J. C. Beebee. 1998. Loss of genetic diversity and fitness in common toad (*Bufo bufo*) populations isolated by inimical habitat. *Journal of Evolutionary Biology*. 11: 269–83.
- Jehle, R., G. A. Wilson, J. W. Arntzen y T. Burke. 2005. Contemporary gene flow and the spatio-temporal genetic structure of subdivided newt populations (*Triturus cristatus*, *Triturus marmoratus*). *Journal of Evolutionary Biology*. 18: 619–628.
- Jensen, J. L., A. J. Bohonak, y S. T. Kelley. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6: 13. v.3.23 <http://ibdws.sdsu.edu/>.
- Johansson, M., C. R. Primmer y J. Merila. 2007. Does habitat fragmentation reduce fitness and adaptability? A case study of the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Ecology* 16: 2693–2700.
- Jungfer, K. H., J. Lynch, M. Morales, F. Solís, R. Ibáñez, G. Santos-Barrera, G. Chaves y F. Bolaños. 2008. *Dendropsophus ebraccatus*. In: IUCN 2008. 2008 IUCN Red List of Threatened Species. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Keller, L. F. y D. M. Waller. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution*. 17:230–241.

- Kraaijeveld-Smit, F. J. L., T. J. C. Beebee, R. A. Griffiths, R. D. Moore y L. Schley. 2005. Low Gene Flow but High Genetic Diversity in the Threatened Mallorcan Midwife Toad *Alytes muletensis*. *Molecular Ecology*. 14: 3307–15.
- Krug, A. y H. Pröhl. 2013. Population genetics in a fragmented population of the European tree frog (*Hyla arborea*). *Amphibia-Reptilia*. 34: 95 – 107.
- Lesbarrères, D., C. R. Primmer, T. Lode, y J. Merila. 2006. The effects of 20 years of highway presence on the genetic structure of *Rana dalmatina* populations. *Ecoscience*. 13: 531-538.
- Lowe, W. H., G. E. Likens, B. J. Cosentino. 2006. Self-organisation in streams: the relationship between movement behavior and body condition in a headwater salamander. *Freshwater Biology*. 51: 2052–2062.
- Luikart, G., F. W. Allendorf, J. M. Cornuet y W. B. Sherwin. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity*. 89:238-247.
- Matías-Ferrer, N. y P. Escalante. 2015. Size, body condition, and limb asymmetry in two hylid frogs at different habitat disturbance levels in Veracruz, Mexico. *The Herpetological Journal*, 25: 169-176.
- Matschiner, M. y W. Salzburger. 2009. TANDEM: integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. *Bioinformatics*. 25: 1982-1983.
- Nava-Cruz Y. y I. Rosas. 2008. El Parque Ecológico Jaguaroundi. Conservación de la selva veracruzana en una zona industrializada. INE, PUMA-UNAM.
- Neckel-Oliveira, S. y C. Gascon. 2006. Abundance, body size and movement patterns of a tropical treefrog in continuous and fragmented forests in the Brazilian Amazon. *Biological Conservation*. 128: 308–315.

- Oosterhout, V. C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills y P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 4:535–538.
- Peakall, R. y D. Lindenmayer. 2006. Genetic insights into population recovery following experimental perturbation in a fragmented landscape. *Biological Conservation*. 132: 520–532.
- Peakall, R. y P. E. Smouse. 2012. Genalex 6: Genetic Analysisi in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6: 288–295.
- Pritchard, J. K., M. Stephens y P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945–959.
- Queller, D. C. y K. F. Goodnight. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*. 43: 258–275.
- Raymond, M. y F. Rousset. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 86:248–249.
- Reed, D. H. y R. Frankham. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*. 17: 230–237.
- Robertson, J. M., M.C. Duryea y K. R. Zamudio. 2009. Discordant patterns of evolutionary differentiation in two Neotropical treefrogs. *Molecular Ecology*. 18: 1375–1395.
- Rodríguez-Mendoza, C. y E. Pineda. 2010. Importance of riparian remnants for frog species diversity in a highly fragmented rainforest. *Biology Letters*. 6: 781–784.
- Rovito, S. M., G. Parra-Olea, C. R. Vásquez-Almazán, T. J. Papenfuss y D. B. Wake. 2009. Dramatic declines in Neotropical salamander populations are an important part of the global amphibian crisis. *PNAS*. 106: 3231–3236.



- Rowe, G., T. J. C. Beebee y T. Burke. 1999. Microsatellite heterozygosity, fitness and demography in natterjack toads *Bufo calamita*. *Animal Conservation*. 2: 85-92.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2002. Norma Oficial Mexicana. (NOM-059- SEMARNAT-2001). Protección ambiental. Especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, Instituto Nacional de Ecología, México.
- Solís, F., R. Ibáñez, G. Santos-Barrera, K. H. Jungfer, J. M. Renjifo y F. Bolaños. 2008. *Agalychnis callidryas*. In: IUCN 2008. 2008 IUCN Red List of Threatened Species. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Spear, S. F. y A. Storfer. 2010. Anthropogenic and natural disturbance lead to differing patterns of gene flow in the Rocky Mountain tailed frog, *Ascaphus montanus*. *Biological Conservation*. 143: 778–786.
- StatSoft, Inc. 2004. STATISTICA (data analysis software system), version 7. Available from: <<http://www.statsoft.com>>.
- Storfer, A., S. G. Mech, M. W. Reudink y K. Lew. 2014. Inbreeding and strong population subdivision in an endangered salamander. *Conservation Genetics*. 15: 137–51.
- Sunny, A., O. Monroy-Vilchis , V. Fajardo y U. Aguilera-Reyes. 2014. Genetic Diversity and Structure of an Endemic and Critically Endangered Stream River Salamander (Caudata: *Ambystoma leorae*) in Mexico. *Conservation Genetics*. 15: 49–59.
- Urbina-Cardona, J. N. y V. H. Reynoso. 2005. Recambio de anfibios y reptiles en el gradiente potrero-borde-interior en Los Tuxtlas, Veracruz, México. Pp: 191–207. In *Sobre Diversidad Biológica: El significado de las Diversidades Alfa, Beta y Gamma*. Halffter,

G., Soberón, J., Koleff, P. & Melic, A. (eds.). México: CONABIO/SEA/CONACyT/  
DIVERSITAS.

Urbina-Cardona, J. N., M. Olivares-Pérez y V. H. Reynoso. 2006. Herpetofauna diversity and microenvironment correlates across a pasture–edge–interior ecotone in tropical rainforest fragments in the Los Tuxtlas Biosphere Reserve of Veracruz, Mexico. *Biological Conservation*. 32: 61–75.

Vogt, R. C. 1997. Las ranas de Laguna del Zacatal. Pp. 500-503. *In*: Historia Natural de Los Tuxtlas. González-Soriano E., R. Dirzo y R. C. Vogt eds. UNAM. México.

Warkentin, K. M. 2000. Environmental and Developmental Effects on External Gill Loss in the Red-Eyed Tree Frog, *Agalychnis callidryas*. *Physiological and Biochemical Zoology*. 73:557–565.

Warkentin, K. M., M. S. Caldwell, T. D. Siok, A. T. D'Amato y J. G. McDaniel. 2007. Flexible information sampling in vibrational assessment of predation risk by red-eyed treefrog embryos. *Journal of Experimental Biology*. 210: 614-619.

Weir, B. S. y C. C. Cockerman. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38: 1358-1370.

Zamudio, K. R. y A. M. Wiczorek. 2007. Fine-scale spatial genetic structure and dispersal among spotted salamander (*Ambystoma maculatum*) breeding populations. *Molecular Ecology*, 16: 257–274.

Zar, J. H. 1999. Biostatistical analysis. New Jersey Prentice Hall.

ANEXO 1. Lista de microsatélites probados en *Agalychnis callidryas* (ACA) y *Dendrosophus . ebraccatus* (HEB) en poblaciones de la Reserva de la Biosfera los Tuxtlas (RBLT) y del Parque Ecológico Jaguaroundi (PEJ). \*a Microsatélites diseñados y publicados por Robertson *et al.* 2009. b Primers diseñados por Robertson y que fueron estandarizados en este trabajo. Primers amplificados con la secuencia M13. SALT, microsatélites diseñados para *A. saltator*. Hyre, microsatélites diseñados para *Hyla regilla*. c Call 1998. Ta: temperatura de alineamiento obtenida.  $N_A$ : Número total de alelos. NA: No hubo amplificación. NP: No se obtuvieron perfiles alélicos. AN: Presencia de alelos nulos.

Locus	Fluoróforo	Unidad de repetición	Ta (°C)	Rango Alélico	$N_A$	Artefactos
<i>A. callidryas</i>						
ACA07 <sup>a</sup>	HEX	(TG) <sub>16</sub>	64	268-348	10	
ACA24 <sup>b</sup>	PET*	(CTTT) <sub>22</sub>	60	158-230	19	AN
ACA36 <sup>a</sup>	FAM*	(TG) <sub>12</sub>	64	384-402	6	
ACA126 <sup>a</sup>	TET	(TG) <sub>16</sub>	56	105-305	7	
ACA127 <sup>a</sup>	FAM	(TGTC) <sub>13</sub>	63.8	172-260	10	
ACA29 <sup>a</sup>	HEX	(TG) <sub>26</sub>	54		-	Dímeros
ACA148 <sup>a</sup>	FAM	(TG) <sub>4</sub> (N) <sub>23</sub> (TG) <sub>2</sub> (N) <sub>11</sub> (TG) <sub>3</sub> (N) <sub>10</sub> (TG) <sub>3</sub> (N) <sub>24</sub> (TG) <sub>4</sub>	60	239	1	
ACA02 <sup>b</sup>	NED*	(CTTT) <sub>9</sub> (GTTT) <sub>1</sub> (CTTT) <sub>2</sub> (CNTT) <sub>1</sub> (CTTT) <sub>13</sub>	50	NP	-	
ACA35 <sup>b</sup>	VIC*	(CA) <sub>6</sub> (CT) <sub>1</sub> (CA) <sub>23</sub>	56.7	197	1	
SALT05 <sup>b</sup>	FAM*	(TG) <sub>28</sub>	60	119	1	
SALT7 <sup>b</sup>	NED*	(CT) <sub>16</sub>	60	164	1	
SALT20 <sup>b</sup>	NED*	(TC) <sub>16</sub> (N) <sub>1</sub> (TC) <sub>10</sub>	na	-	-	
Hyre 58 <sup>c</sup>	VIC*	(GT) <sub>8</sub> (TGTGT) <sub>6</sub>	57.5	NP		
Hyre 43 <sup>c</sup>	VIC*	(CT) <sub>18</sub> (AT) <sub>12</sub>	50	183	1	
<i>D. ebraccatus</i>						
HEB 165 <sup>a</sup>	HEX	(GT) <sub>8</sub> (AT) <sub>1</sub> (GT) <sub>4</sub> G (GT) <sub>3</sub>	65	173-181	3	
HEB 226 <sup>a</sup>	FAM	(TG) <sub>23</sub>	58	252-290	18	
HEB 231 <sup>a</sup>	FAM	(TG) <sub>32</sub>	60	222-252	16	
HEB 310 <sup>a</sup>	HEX	(TG) <sub>15</sub> (N) <sub>8</sub> (TG) <sub>6</sub> (N) <sub>8</sub> (TG) <sub>6</sub>	60	248-290	1	
HEB 337 <sup>a</sup>	TET	(CA) <sub>14</sub>	56	144-156	7	
HEB 161 <sup>a</sup>	TET	(TG) <sub>12</sub> (N) <sub>25</sub> (TG) <sub>6</sub>	60	NP	-	
Hyre 58 <sup>c</sup>	VIC*	(GT) <sub>8</sub> (TGTGT) <sub>6</sub>	na	-	-	
Hyre 43 <sup>c</sup>	VIC*	(CT) <sub>18</sub> (AT) <sub>12</sub>	50	143	1	

## DISCUSIÓN GENERAL

---

Las modificaciones del hábitat causadas por actividades antrópicas son consideradas como los principales factores de riesgo para los anfibios (Semlitsch 2003, Beebee y Griffiths 2005, Cushman 2006) y que han impactado al 88% de los anfibios amenazados (Baillie *et al.* 2004). En este sentido, en el **Capítulo 1** se encontró que el grado de perturbación del hábitat resulta en individuos con una talla y condición corporal bajas en *D. ebraccatus* pero no en *A. callidryas*. Por otro lado, en ninguna de las dos especies los índices de asimetría fluctuante se incrementaron a una perturbación mayor. Los resultados obtenidos pueden atribuirse a las diferencias en talla que de manera indirecta reflejan los requerimientos de hábitat de cada especie. Por un lado *D. ebraccatus* al ser de talla pequeña no requiere de estanques con dosel como *A. callidryas*, por lo que fue posible encontrarla en sitios con alto disturbio. A pesar del grado de perturbación, los parches de hábitat pueden reunir las características básicas para su sobrevivencia. Sin embargo, estos sitios no dejan de ser un riesgo ya que representan un mayor factor de estrés y afectar la talla y condición corporal. En el largo plazo, las poblaciones en hábitats con disturbio pueden afectar el rendimiento de los individuos como la reproducción y sobrevivencia (Altwegg y Reyer 2003). Por ejemplo, la talla pequeña puede conllevar una menor masa, volumen y número de puestas (Funk y Mills 2003), así como afectar el tamaño y cantidad de nutrientes del huevo (Kaplan 1992 y Laugen *et al.* 2002). Esto resultará en un número bajo de crías y metamórficos (Semlitsch *et al.* 1998), con repercusiones en la talla de los adultos y en consecuencia en los caracteres de historia de vida de los mismos (Smith, 1987, Semlitsch *et al.* 1988, Beachy 1995 y Stahlberg *et al.* 2001).

En ambientes adversos, individuos pequeños pueden tener una menor sobrevivencia debido a que son más susceptibles a cambios en el microclima (Mazerolle 2001, Urbina-Cardona

y Reynoso 2005). Mientras que individuos de mayor talla en ambientes perturbados son más propensos a la depredación (Touchon y Warkentin 2009). La baja condición corporal de los machos puede afectar el desempeño para la reproducción. En *D. ebraccatus*, la selección de las hembras por los machos está determinada por el canto (Miyamoto y Cane 1980). Ante un desempeño bajo, los eventos reproductivos se pueden omitir o postergar.

La condición corporal representa la cantidad de reserva de grasa de los individuos por lo que también se utiliza como una medida indirecta de la calidad del hábitat, ya que dicha reserva está en función de la demanda metabólica y de la disponibilidad de presas que existen en el hábitat. Entonces, un hábitat de calidad alta puede presentar mayores recursos que se obtengan como reserva, o bien que los individuos gasten menos energía para cubrir otras demandas como su sustento, crecimiento, reproducción y sobrevivencia (Speakman 2001). Una población de individuos vulnerables tienen menor probabilidad de resistir los efectos de un hábitat de baja calidad, o depender excesivamente de la inmigración para que la población permanezca (Homyac 2010).

En este estudio, los individuos con una condición corporal baja de *D. ebraccatus* se observaron en los sitios con las categorías de perturbación mayor como potreros, parches de vegetación secundaria y zonas urbanas, en los cuales la disponibilidad de recursos puede ser baja (i.e. presas), sino también presentan cambios en la estructura del hábitat (Karraker 2013, Touchon y Warkentin 2009) poco favorable para los individuos. Por ejemplo, sitios con menor o nula cobertura de dosel están menos sombreados por lo que tienen un mayor periodo de exposición solar, lo que implican un mayor estrés ambiental que puede afectar la sobrevivencia de huevos y metamórficos (Touchon y Warkentin 2009) debido a que son más propensos a la desecación y a los depredadores (Touchon y Warkentin 2009). Así como afectar a individuos jóvenes, ya que se ha registrado que son menos abundantes en sitios sin dosel (Urbina-Cardona *et al.* 2006).

Por tanto, la cobertura del dosel representa un factor fundamental para un hábitat de buena calidad (Peres *et al.* 2006), especialmente para *A. callidryas*, que estuvo ausente en estanques sin cobertura arbórea (Matias-Ferrer y Escalante 2015).

Los factores que afectan los caracteres de historia de vida pueden producir cambios en la estructura y dinámica de las poblaciones con consecuencias en los patrones de variación genética. En el **Capítulo 2** se observó que las modificaciones en el hábitat han llevado a la erosión de la diversidad genética, ya que se detectaron indicios de reducción y aislamiento poblacional, asociado a endogamia, deriva génica y cuellos de botella recientes, siendo *A. callidryas* la mayormente afectada.

Una diferenciación genética como la observada en este estudio es similar a lo reportado en paisajes fragmentados que han resultado por la agricultura y urbanización, en donde el flujo génico se reduce y se observa en una estructura genética poblacional alta (Crosby *et al.* 2009, Noel *et al.* 2007, Spear y Storfer 2008, Apodaca *et al.* 2012, Scherer *et al.* 2012). Sin embargo, sólo se observó una estructura genética alta entre áreas principalmente en *A. callidryas*. Aparentemente, existe un flujo génico alto relativamente reciente, siendo aparentemente mayor en *D. ebraccatus*. Esto se puede atribuir a que las alteraciones del hábitat sobre la variación genética aún no son del todo evidentes o bien a eventos de flujo génico relativamente recientes.

Un factor que puede ser determinante en la dinámica de las poblaciones de anuros y en la conectividad es la intensidad y frecuencia de las lluvias. Años con baja precipitación están asociados con grandes declives poblacionales de anfibios (Pechman *et al.* 1991, Berven 1995), los que pueden resultar en cuellos de botella recientes debido a un incremento en la mortalidad, por ejemplo de los huevos, los cuales quedan expuestos a una desecación y depredación mayores (Touchon y Warkentin 2009). Además, el número de puestas (Neckel-Oliveira 2004) y la mortalidad de los renacuajos (Santos *et al.* 2007) también están determinados por el hidroperiodo

de los estanques (Vonesh y De la Cruz 2002). Por tanto, la intensidad de las lluvias es clave histórica en la reproducción ya que la estimulan y crean un ambiente adecuado para el desarrollo de los huevos (Touchon y Warkentin 2009).

En cuanto a la conectividad, en la época de lluvias el movimiento de los individuos en la matriz de pastizal y vegetación secundaria se incrementa, principalmente entre estanques que se encuentran a corta distancia (Neckel-Oliveira y Gascon 2006). La humedad producida por las lluvias amortigua los efectos de la incidencia de la luz, la pérdida de humedad del suelo y del aire (Camargo y Kapos 1995), lo cual favorece el movimiento de los individuos y entonces, el aislamiento entre poblaciones disminuye al favorecerse el entrecruzamiento de subpoblaciones distintas (De Lima y Gascón 1999).

En ambas especies se constató que la intensidad de las lluvias promueve la formación de los estanques reproductivos de las especies estudiadas. El 2009 fue un año de intensa sequía en la región como consecuencia del fenómeno de El Niño (Null 2016). En este periodo, sólo las poblaciones asociadas a cuerpos de agua grandes como la Laguna El Zacatal y el Lago Catemaco tuvieron actividad reproductiva. En el 2010, debido a las lluvias intensas como consecuencia del fenómeno de La Niña (Null 2016), se obtuvieron la mayor parte de las muestras incluso de estanques que estaban secos en el año anterior, los cuales se localizaron principalmente en potreros (REV, PODA, REAL, DSJS y CRUZ).

Otro factor importante en paisajes perturbados y que puede ayudar a mantener cierta conectividad, son los remanentes de vegetación riparia, los cuales mantienen una humedad alta. En estos remanentes, se ha registrado a *A. callidryas* (Rodríguez-Mendoza y Pineda 2010), por lo que dicha especie puede estar utilizando estos cuerpos de agua para llegar a los estanques reproductivos y con ello mantener cierto flujo génico entre las poblaciones. Sin embargo, el mantenimiento de la conectividad también depende de que los eventos reproductivos ocurran y si

no existen estanques con las características para la reproducción, la permanencia de las poblaciones se compromete. En esta especie, sólo se obtuvieron cinco estanques en toda la RBLT, comparado con PEJ en el que se encontró a esta especie en tres estanques en un área menor.

Entre los objetivos de la conservación, está mantener de poblaciones saludables y genéticamente robustas para asegurar su persistencia (Daszak *et al.* 2000, Redford *et al.* 2011), mediante el mantenimiento de las funciones ecológicas (e.g. interacciones) que promuevan la resistencia natural a los factores de estrés y el potencial evolutivo para ello (Smith *et al.* 2009). Por tanto, es necesario recuperar y mantener el hábitat con la creación de estanques reproductivos principalmente, tanto en el continuo como en la matriz del paisaje.

Uno de los problemas principales con especies de ranas que se reproducen en estanques, es que los cuerpos de agua tienen que estar en sitios abiertos y planos, por lo que llegan a ser más numerosos en zonas de disturbio o en la matriz que en el continuo de vegetación (Neckel-Oliveira y Gascon 2006, obs. pers.). Mientras que los individuos que se reproducen dentro del continuo no tienen mucha movilidad hacia el borde o hacia la matriz y viceversa (Neckel-Oliveira y Gascon 2006). Por tanto, especies como *A. callidryas* y *D. ebraccatus* están obligados a reproducirse en estanques de baja calidad. Por lo anterior, es necesaria la implementación de estrategias que permitan la recuperación de los estanques que se encuentran en la matriz. Además, se debe asegurar la conectividad entre los cuerpos de agua remanentes, principalmente de los que se encuentran en la matriz hacia los que están en el continuo y fragmentos de selva. Se sugiere la creación y mantenimiento de estanques con vegetación temporal cerca de zonas forestadas con reservas de agua (Da Silva *et al.* 2011), asociados a zonas riparias con la finalidad de garantizar el movimiento de los individuos entre los estanques.



Este estudio permitió detectar otros factores de riesgo para las poblaciones de ambas especies. Los estanques que se encuentran en la matriz están bajo un disturbio continuo por parte de los propietarios de los terrenos. La vegetación de los cuerpos de agua se remueve de forma constante como una medida de “limpieza” y para evitar la proliferación de serpientes y de mosquitos transmisores de enfermedades. Sin embargo, esta medida puede resultar contraproducente. En la región hay un gran desconocimiento sobre la importancia de los anuros que tienen en el control de plagas. Se ha documentado, que renacuajos de anuros se alimentan de las larvas de mosquitos transmisores de dengue (Mokany y Shine 2003, Bowatte *et al.* 2013 y Murugan *et al.* 2015) por lo que al eliminar la vegetación pueden contribuir a incrementar el problema, ya que se está eliminando a un depredador natural de las larvas de los mosquitos.

Otros de los problemas detectados en la región fue la extracción de individuos de *A. callidryas* para los mercados de mascotas, particularmente del único sitio encontrado en el continuo de selva, la Laguna El Zacatal (EZAC), en donde la población de esta especie se observó que tiene signos de endogamia, aunque parece mostrar indicios de crecimiento poblacional. Se desconoce, si la intensidad de extracción pudo reducir la población, al grado de incrementar el parentesco entre los individuos. Esta población es de gran importancia para la parte norte de la RBLT, dada la extensión de este cuerpo de agua, la población residente podría estar sirviendo como fuente, por lo que se requiere continuar con acciones que fortalezcan la conservación de este sitio.

Finalmente las estrategias de conservación y el manejo del hábitat deben dirigirse hacia la reforestación de áreas degradadas que permitan ofrecer un ambiente menos adverso para la dispersión de los individuos, y que además favorezcan la conectividad entre los diferentes hábitats. La creación de estanques en zonas conservadas podría asegurar los eventos

reproductivos cuando las sequías son prolongadas, y en zonas perturbadas permitirían mantener la conexión en un área mayor.

Se recomienda que el monitoreo continúe una vez que las medidas de conservación se apliquen. En este sentido consideramos que la talla y condición corporal pueden ser útiles ya que proporcionan información de forma rápida sobre los cambios en el ambiente y poco invasiva para el monitoreo poblacional. De cualquier forma el monitoreo genético es esencial para determinar si el flujo génico de las poblaciones remanentes se ha recuperado.

## LITERATURA CITADA

---

- Alford, R. A., K. S. Bradfield y S. J. Richards. 2007. Ecology global warming and amphibian losses. *Nature* 447:E3–E4.
- Allendorf, F. W. y G. Luikart. 2007. Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing, Malden, Massachusetts, USA
- Allentoft, M. E. y J. O'Brien. 2010. Global amphibian declines, loss of genetic diversity and fitness: A review. *Diversity Distribution*. 2: 47–71.
- Altwegg, R. y H. U. Reyer. 2003. Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution*. 57: 872–882.
- Anciães, M. y M. Â. Marini. 2000. The effects of fragmentation on fluctuating asymmetry in passerine birds of Brazilian tropical forest. *Journal of Applied Ecology*. 37:1013-1028.
- Andrén, H. 1994. Effects of habitat fragmentation on birds and mammals in landscapes with different proportions of suitable habitat: A review. *Oikos*. 71:355–366.
- Apodaca, J. J., L. J. Rissler y J. C. Godwin. 2012. Population structure and gene flow in a heavily disturbed habitat: implications for the management of the imperilled Red Hills salamander (*Phaeognathus hubrichti*). *Conservation Genetics*. 13:913–923.
- Baguette, M. y N. Schtickzelle. 2003. Local population dynamics are important to the conservation of metapopulations in highly fragmented landscapes. *Journal of Applied Ecology*. 40: 404–412.
- Baillie, J. E. M., C. Hilton-Taylor y S. N. Stuart 2004. IUCN Red List of threatened species. A global species assessment. *IUCN, Gland/Cambridge*.
- Bates, J. M. 2000. Allozymic genetic structure and natural habitat fragmentation: data for five species of Amazonian forest birds. *Condor*. 102: 770–783.

- Beachy, C. K., 1995. Effects of larval growth history on metamorphosis in a stream-dwelling salamander (*Desmognathus ochrophaeus*). *Journal of Herpetology*. 29: 375–382.
- Becker, C. G., C. R. Fonseca, C. F. B. Haddad, R. F. Batista, P. I. Prado. 2007. Habitat split and the global decline of amphibians. *Science* 318: 1775–1777.
- Becker, C. G., C. R. Fonseca, C. F. B. Haddad, R. F. Batista y P. I. Prado. 2010. Habitat Split as a Cause of Local Population Declines of Amphibians with Aquatic Larvae. *Conservation Biology*. 24: 287–294.
- Beebee, T. J. C. y R. A. Griffiths. 2005. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology?. *Biological Conservation*. 125: 271-285.
- Bender, D. J., T. A. Contreras, y L. Fahrig. 1998. Habitat loss and population decline: a meta-analysis of the patch size effect. *Ecology*. 79:517–533.
- Berven, K. A. 1995. Population regulation in the wood frog, *Rana sylvatica*, from three diverse geographic localities. *Australian Journal of Ecology*. 20: 385-392.
- Biek, R., W. C. Funk, B. A. Maxell, y L. S. Mills. 2002. What Is Missing in Amphibian Decline Research: Insights from Ecological Sensitivity Analysis. *Conservation Biology*, 16: 728-734.
- Blanchet, S., O. Rey, R. Etienne, S. Lek, y G. Loot 2010. Species-specific responses to landscape fragmentation: implications for management strategies. *Evolutionary Applications* 3: 291–304.
- Blaustein, A. R. y D. B. Wake. 1990. Declining amphibian populations: a global phenomenon. *Trends in Ecology and Evolution*. 5: 203– 204.
- Blaustein, A. R., D. B. Wake y W. P. Sousa. 1994. Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation Biology*. 8: 60-71.

- Bowatte, G. P. Perera, G. Seneviratne, S. Meegaskumbura y M. Meegaskumbura. 2013. Tadpoles as dengue mosquito (*Aedes aegypti*) egg predators. *Biological Control*, 67: 469-474.
- Bowie, R. C. K. 2011. The utility of contemporary and historical estimates of dispersal in determining response to habitat fragmentation in a tropical forest-dependent bird community. *Molecular Ecology*. 20:1799-1802.
- Bowne, D.R., M. A. Bowers. 2004. Interpatch movements in spatially structured populations: a literature review. *Landscape Ecology* 19: 1–20.
- Briggs, V. S. 2008. Mating patterns of red-eyed treefrogs, *Agalychnis callidryas* and *A. moreletii*. *Ethology*. 114: 489-498.
- Brown, J. H. y A. Kodric-Brown. 1977. Turnover rates in insular biogeography: effect of immigration on extinction. *Ecology*. 58:445–449.
- Buckley, C. R., S. F. Michael y D. J. Irschick. 2005. Early hatching decreases jumping performance in a direct-developing frog, *Eleutherodactylus coqui*. *Functional Ecology*. 19: 67–72.
- Burton, T. M. y G. E. Likens. 1975. Energy flow and nutrient cycling in salamander populations in the Hubbard Brook Experimental Forest, New Hampshire. *Ecology* 56: 1068–80.
- Cabrera-Guzmán, E. y V. H. Reynoso. 2012. Amphibian and reptile communities of rainforest fragments: minimum patch size to support high richness and abundance. *Biodiversity Conservation*. 21: 3267–3268.
- Calderón-Mandujano R., H. Bahena Basave y S. Calmé. 2005. Anfibios y Reptiles de la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an y zonas aledañas. México. COMPACT-ECOSUR-CONABIO-SIAN 'KAN. 111 pp.

- Callens, T., P. Galbusera, E. Matthysen, E. Y. Durand, M. Githiru, *et al.* 2011. Genetic signature of population fragmentation varies with mobility in seven bird species of a fragmented Kenyan cloud forest. *Molecular Ecology*. 20:1829-1844.
- Camargo, J. L. C. y V. Kapos. 1995. Complex edge effects on soil moisture and microclimate in central Amazonian forest. *Journal of Tropical Ecology*. 11: 205–221.
- Cedeño-Vázquez, J. R., R. Calderón-Mandujano y C. Pozo. 2006. Anfibios de la Región de Calakmul Campeche, México. CONABIO/ECOSUR/CONANP/PNUD-GEF/SHM A. C. México. 104 pp.
- CESPEDES. 2005. Contexto general de la deforestación en México. [En línea]. <http://www.cce.org.mx/cespedes>.
- Cheng T. L., S. M. Rovito, D. B. Wake y V. T. Vredenburg. 2011. Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108: 9502–9507.
- Clarke, G. M. 1993. Fluctuating asymmetry of invertebrate populations as a biological indicator of environmental quality. *Environmental Pollution*. 82: 207–211.
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas y Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (CONANP y SEMARNAT). 2006. Programa de Conservación y Manejo Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas. México: Comisión de Áreas Naturales Protegidas/Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Cook, W. M., K. T. Lane, B. L. Foster y R. D. Holt. 2002. Island theory, matrix effects and species richness in habitat fragments. *Ecological Letters*. 5: 619–623.

- Cortés-Ortiz, L., E. Rodríguez-Luna, I. Sampaio, M. Ruiz-García. 2003. Molecular systematics and biogeography of the Neotropical monkey genus *Alouatta*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 26:64–81
- Cronin, J. T. 2004. Host–parasitoid extinction and recolonization in a fragmented prairie landscape. *Oecologia*. 139: 503–514.
- Crosby, M. K. A, L. E. Licht, J. Fu. 2009. The effect of habitat fragmentation on finescale population structure of wood frogs (*Lithobates sylvatica*). *Conservation Genetics* 10:1707–1718.
- Crump, M. L. 2003. Conservation of amphibians in the New World tropics. , Pp. 53-69. *In*: Semlitsch, R. D. (Edits.) *Amphibian Conservation*. Smithsonian Institution. USA.
- Cushman S. A. 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological Conservation*. 128:231-240.
- Da Silva, F. R., J. P. Gibbs, y D. de Cerqueira Rossa-Feres. 2011. Breeding habitat and landscape correlates of frog diversity and abundance in a tropical agricultural landscape. *Wetlands*. 31: 1079-1087.
- Daszak P., A. A. Cunningham y A. D. Hyatt. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife—threats to biodiversity and human health. *Science*. 287: 443–449.
- Delgado-Acevedo, J. y C. Restrepo. 2008. The contribution of habitat loss to changes in body size, allometry, and bilateral asymmetry in two *Eleutherodactylus* frogs from Puerto Rico. *Conservation Biology*. 22: 773–782.
- Didham, R. K. y J. H. Lawton. 1999. Edge structure determines the magnitude of changes in microclimate and vegetation structure in tropical forest fragments. *Biotropica*. 31:17–30.

- Di Leo, M. F., J. R. Row, y S. C. Loughheed .2010. Discordant patterns of population structure for two co-distributed snake species across a fragmented Ontario landscape. *Diversity and Distributions*. 16:571–581.
- De Lima, M. G., y C. Gascon. 1999. The conservation value of linear forest remnants in central Amazonia. *Biological Conservation*. 91: 241-247.
- Dirzo, R., y M. C. Garcia. 1992. Rates of deforestation in Los Tuxtlas, a Neotropical area in southeast Mexico. *Conservation Biology*. 6: 84-90.
- Dirzo, R., y P. Raven. 2003. Global state of biodiversity and loss. *Annual Review of the Environment and Resources*. 28: 137-167.
- Dodd, C. K., y L. L. Smith 2003. Habitat destruction and alteration: historical trends and future prospects for amphibians. Pp: 94-112. *In*: R. D. Semlitsch, Editor. Amphibian Conservation. Smithsonian Institution, Washington.
- Donnelly, M.A y C. Guyer. 1994. Patterns of reproduction and habitat use in an assemblage of Neotropical hylid frogs. *Oecologia*. 98: 291–302.
- Duellman, W. E. 1970. The hylid frogs of Middle America. Monograph. *Museum Natural University of Kansas*. (1, 2): 1-753.
- Duellman, W. y E. L. Trueb. 1986. Biology of amphibians. McGraw-Hill, New York.
- Eckert, C. G., K. E. Samis y S. C. Loughheed. 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, 17: 1170-1188.
- Fahrig, L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 34: 487-515.
- Fahrig L, J. H. Pedlar, S. E. Pope S, P. D. Taylor y J. F. Wegner J. F. 1995. Effect of road traffic on amphibian density. *Biological Conservation*. 73:177–182



- FAO, 2011. Situación de los bosques del mundo. Organización de las Naciones Unidas, Roma.
- Floate, K. y A. Fox. 2000. Flies under stress: a test of fluctuating asymmetry as a biomonitor of environmental quality. *Ecological Applications*. 10: 1541–1550.
- Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation*. 126:131–140.
- Frías-Alvarez P, J. J. Zúñiga-Vega y O. Flores-Villela. 2010. A general assessment of the conservation status and decline trends of Mexican amphibians. *Biodiversity Conservation* 19: 3699–3742.
- Funk, W. C. y L. Mills. 2003. Potential causes of population declines in forest fragments in an Amazonian frog. *Biological Conservation*. 111: 205–214.
- Gardner, T. A. 2010. Monitoring Forest Biodiversity: Improving Conservation. through Ecologically Responsible Management. Earthscan, London, UK.
- Gascon, C., T. E. Lovejoy, R. O. Jr. Bierregaard, J. R. Malcolm, P. C. Stouffer, H. L. Vasconcelos, *et al.* 1999. Matrix habitat and species richness in tropical forest remnants. *Biological Conservation*. 91: 223–229.
- Gibbons, J. W., C. T. Winne, D. E. Scott, J. D. Willson, X. Glandas, K. M. Andrews, B. D. Todd, L. A. Fedewa, L. Wilkinson, R. N. Tsaliagos, S. J. Harper, J. L. Greene, T. D. Tuberville, B. S. Metts, M. E. Dorcas, J. P. Nestor, C. A. Young, T. Akre, R. N. Reed, K. A. Buhlmann, J. Norman, D. A. Croshaw, C. Hagan, y B. B. Rothermel. 2006. Remarkable amphibian biomass and abundance in an isolated wetland: with implications for wetland conservation. *Conservation Biology*. 20:1457–1465.
- Gibbs, H. *et al.* 2010. Tropical forests were the primary sources of new agricultural land in the 1980s and 1990s. *Proceeding of the National of Academy of Science*. 107: 16732–16737.
- Gibbs, J. P. 1998. Amphibian movements in response to forest edges, roads, and streambeds in southern New England. *Journal of Wildlife Management*. 62. 584–589.

- González-Sierra, J. 1991. Los Tuxtlas Veracruz: Imágenes de su historia. Archivo General del Estado de Veracruz.
- Guevara, S. 1995. Conectivity: key in maintaining tropical rainforest landscape diversity: A case study in Los Tuxtlas, México. Pp. 63-94. *In*: Halladay, P y A Glimour (Eds.) Conserving biodiversity outside protected areas. The role of traditional agro-ecosystems. IUCN Forest Conservation Programme.
- Guevara, S. S., G. Sánchez-Ríos, y R. R. Landgrave. 2004a. La Deforestación. Pp: 85-110. *In*: Los Tuxtlas. El Paisaje de la Sierra. (Eds. Guevara S. S., J. Laborde D. y G. Sánchez-Ríos). Instituto de Ecología A. C.-Unión Europea. México.
- Guevara, S., J. Laborde y G. Sánchez-Ríos. 2004b. La Fragmentación. Pp: 111-134. *In*: El paisaje de la sierra. Unión Europea e Instituto de Ecología A.C. Xalapa, Veracruz. México.
- Hamer, A. J. y M. J. McDonnell. 2008. Amphibian ecology and conservation in the urbanizing world: A review. *Biological Conservation*. 141: 2432–2449.
- Hanski I, y O. Ovaskainen. 2000. The metapopulation capacity of a fragmented landscape. *Natura*. 404: 755-758.
- Harrison, S. 1991. Local extinction in a metapopulation context: an empirical evaluation. *Biological Journal Linnean Society*. 42: 73–88.
- Herrera, L. G., V. H. Reynoso, D. Curiel, N. Ramírez, M. Rodríguez, L. Mirón, R. Sánchez, S. Aguilar, F. Carmona, J. Urbina y A. González. 2008. La riqueza faunística en un ambiente perturbado: el caso del Parque Ecológico Jaguaroundi. Pp: 79-100. *In*, El Parque Ecológico Jaguaroundi. Conservación de la selva tropical veracruzana en una zona industrializada. (Eds. Y. Nava e I. Rosas). PUMA-UNAM, SEMARNAT, INSTITUTO DE ECOLOGIA

- Holderegger, R., U. Kamm, y F. Gugerli. 2006. Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. *Landscape Ecology*, 21(6), 797-807.
- Homyack, J. A. 2010. Evaluating habitat quality of vertebrates using conservation physiology tools. *Wildlife research*. 37: 332-342.
- INEGI. 1988. Síntesis geográfica, nomenclator y anexo cartográfico del estado de Veracruz. Aguascalientes, México. 69. pp.
- Johansson, M., C. R. Primmer, y J. Merila. 2007. Does habitat fragmentation reduce fitness and adaptability? A case study of the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Ecology* 16: 2693–2700.
- Jungfer, K. H., J. Lynch, M. Morales, F. Solís, R. Ibáñez, G. Santos-Barrera, G. Chaves y F. Bolaños. 2008. *Dendropsophus ebraccatus*. In: IUCN 2008. 2008 IUCN Red List of Threatened Species. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Kaplan, R. H. 1992. Greater maternal investment can decrease offspring survival in the frog *Bombina orientalis*. *Ecology*. 73: 280–288.
- Kapos, V., E. Wandelli, J. L. Camargo, G. Ganade. 1997. Edge related changes in environment and plant responses due to forest fragmentation in central Amazonia. In: Laurance, W.F., Bierregaard, R.O. (Eds.), *Tropical Forest Remnants: Ecology, Management, and Conservation of Fragmented Communities*. University of Chicago Press, Chicago.
- Karraker, N. E. 2013. Shading Mediates the Interaction Between an Amphibian and a Predatory Fly. *Herpetologica*. 69: 257-264.
- Keller, L. F. y D. M. Waller. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution*. 17:230–241.
- Keyghobadi, N. 2007. The genetic implications of habitat fragmentation for animals. *Canadian Journal Zoology*. 85:1049–1064.

- Laborde, J. 2004. La Reserva de la Biosfera. Pp. 271-279. *In: Los Tuxtlas: El paisaje de la Sierra.*
- Guevara, S., J. Laborde & G. Sánchez (eds.). Instituto de Ecología, A. C., Unión Europea.
- Lande, R. y S. Shannon. 1996. The role of genetic variation in adaptation and population persistence in changing environment. *Evolution* 50: 434-437.
- Lange, R., W. Durka, S. I. J. Holzhauer, V. Wolters, y T. Diekötter 2010. Differential threshold effects of habitat fragmentation on gene flow in two widespread species of bush crickets. *Molecular Ecology*. 19:4936–4948.
- Laugen, A. T., A. Laurila, y J. Merila. 2002. Maternal and genetic contributions to geographical variation in *Rana temporaria* larval life-history traits. *Biological Journal of the Linnean Society*. 76: 61–70.
- Lauk, B. 2006. Fluctuating asymmetry of the frog *Crinia signifera* in response to logging. *Wildlife Research*. 33, 313– 320.
- Laurance, W. 2010. Habitat destruction: death by a thousand cuts. *In: Conservation Biology for All.* Oxford University Press.
- Laurance, W.F., J. Sayer y K. G. Cassman. 2014. Agricultural expansion and its impacts on tropical nature. *Trends in Ecology and Evolution*. 29: 107–116.
- Leamy, L. J. y C. P. Klingenberg. 2005. The genetics and evolution of fluctuating asymmetry. *Annual Review of Ecology and Systematics* 36: 1-21.
- Lee, J. C. 1996. The Amphibians and Reptiles of the Yucatan Peninsula. Cornell University Press. 512p.
- Lens, L., S. van Dongen, C. M. Wilder, T. M. Brooks y E. Matthysen. 1999. Fluctuating asymmetry increases with habitat disturbance in seven bird species of a fragmented afro-tropical forest. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*. 266:1241.

- Lens, L., S. Van Dongen, S. Kark, y E. Matthysen. 2002. Fluctuating asymmetry as an indicator of fitness: can we bridge the gap between studies? *Biological Reviews*. 77: 27–38.
- Levy, E., J. L. Tomkins, N. R. LeBas, y W. J. Kennington. 2013. Contrasting effects of landscape features on genetic structure in different geographic regions in the ornate dragon lizard, *Ctenophorus ornatus*. *Molecular Ecology*. 22:3904–3915.
- Lips, K. R. 1999. Mass mortality of the anuran fauna at an upland site in Panama. *Conservation Biology*. 13: 117–125
- Lynch, M. 1996. A quantitative-genetic perspective on conservation issues. Pp: 471–501. In: J. Avise and J. Hamrick, editors. Conservation genetics: case histories from nature. Chapman and Hall, New York.
- Matías-Ferrer, N. y P. Escalante. 2015. Size, body condition, and limb asymmetry in two hylid frogs at different habitat disturbance levels in Veracruz, Mexico. *The Herpetological Journal*, 25: 169-176.
- Mazerolle, M. J. 2001. Amphibian activity, movement patterns, and body size in fragmented peat bogs. *Journal of Herpetology*. 35: 13–20.
- Méndez, M., M. Vogeli, J. L. Tella, y J. A. Godoy. 2014. Joint effects of population size and isolation on genetic erosion in fragmented populations: finding fragmentation thresholds for management. *Evolutionary Applications*. 7:506–518.
- Meyer, F. J., K.V. Kalko, y G. Kerth. 2008. Small-scale fragmentation effects on local genetic diversity in two phyllostomid bats with different dispersal abilities in Panama. *Biotropica* 69: 17–32.
- Meza-Parral, Y. y E. Pineda . 2015. Amphibian Diversity and Threatened Species in a Severely Transformed Neotropical Region in Mexico. *PLoS ONE*. 10: e0121652.

- Minor, E. S. y D. Urban. 2008. A graph-theory framework for evaluating landscape connectivity and conservation planning. *Conservation Biology*. 31:297–307.
- Mittermeier, R. y C. Goettsch. 1992. La importancia de la diversidad biológica de México. *In*: Sarukhán, J. y R. Dirzo (comps.). México ante los retos de la biodiversidad. Conabio. México.
- Miyamoto, M. M. y J. H. Cane. 1980. Notes on the reproductive behavior of a Costa rican population of *Hyla ebraccata*. *Copeia*, (4): 928-930.
- Mokany, A. y R. Shine. 2003. Oviposition site selection by mosquitoes is affected by cues from conspecific larvae and anuran tadpoles. *Austral Ecol.* 28, 33–37.
- Moreno-Sanchez, R., F. Moreno-Sanchez y J. M. Torres-Rojo. 2012. National assessment of the evolution of forest fragmentation in Mexico. *Journal of Forestry Research*. 22: 167–174.
- Murcia, C. 1995. Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. 10: 58–62.
- Murugan, K., V. Priyanka, D. Dinesh, P. Madhiyazhagan, C. Panneerselvam, J. Subramaniam, U. Suresh, B. Chandramohan y M. Roni, M. Nicoletti, A. A. Alarfaj, A. Higuchi., M. A. Munusamy, H. F. Khater, R. H. Messing, G. Benelli G. *et al.* 2015. Predation by Asian bullfrog tadpoles, *Hoplobatrachus tigerinus*, against the dengue vector, *Aedes aegypti*, in an aquatic environment treated with mosquitocidal nanoparticles. *Parasitol Resources* 114:3601–3610.
- Nava-Cruz, Y. y I. Rosas. 2008. El Parque Ecológico Jaguaroundi. Conservación de la selva veracruzana en una zona industrializada. INE, PUMA-UNAM.
- Neckel-Oliveira, S. 2004. Effects of landscape change on clutches of *Phyllomedusa tarsius*, a neotropical treefrog. *Biology Conservation*. 118: 109–116. 84–88.

- Neckel-Oliveira, S. y C. Gascon. 2006. Abundance, body size and movement patterns of a tropical treefrog in continuous and fragmented forests in the Brazilian Amazon. *Biological Conservation*. 128: 308–315.
- Noel, S., M. Ouellett, P. Galois y F. J. Lapointe. 2007. Impact of urban fragmentation on the genetic structure of the eastern red-backed salamander. *Conservation Genetics*. 8:599–606.
- Null, J. 2016. El Niño and La Niña Years and Intensities. Based on Oceanic Niño Index (ONI). Updated Golden Gate Weather Services 2015. [http://www.cpc.noaa.gov/products/analysis\\_monitoring/ensostuff/ensoyears.shtml](http://www.cpc.noaa.gov/products/analysis_monitoring/ensostuff/ensoyears.shtml).
- Ochoa-Ochoa, L. M. y O. Flores-Villela . 2006. Áreas de Diversidad y Endemismo de la Herpetofauna Mexicana. *Universidad Nacional Autónoma de México-Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México*.
- Ouborg, N. J., P. Vergeer y C. Mix. 2006. The rough edges of the conservation genetics paradigm for plants. *Journal of Ecology*. 94:1233–1248.
- Palmer, A. R. 1994. Fluctuating asymmetry analyses: a primer. Pp: 335–364. *In: Developmental Instability: its origin and Evolutionary Implications*. Markow, T.A. (ed.). Dordrecht The Netherlands: Kluwer Academic.
- Palmer, A. R. y C. Strobeck, C. 1992. Fluctuating asymmetry as a measure of developmental stability: Implications of non normal distributions and power of statistical tests. *Acta Zoologica Fennica*. 191: 57–72.
- Palmer, A. R. y C. Strobeck. 2003. Fluctuating asymmetry analyses revisited. Pp: 279–319. *In: Developmental Instability. Causes and Consequences*. Polak, M. (ed.). New York: Oxford.

- Parra-Olea, G., M. García-París, y D. B. Wake. 1999. Status of some populations of Mexican salamanders (Amphibia: Plethodontidae). *Revista de Biología Tropical*. 47: 217-223.
- Pechmann, J. H. K., D. E. Scott, R. D. Semlitsch, J. P. Caldwell, L. J. Vitt, y J. W. Gibbons. 1991. Declining amphibian populations: The problem of separating human impacts from natural fluctuations. *Science* 253:892-895.
- Peig, J. y A. J. Green. 2009. New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos* 118: 1883–1891.
- Peig, J. y A. J. Green. 2010. The paradigm of body condition: a critical reappraisal of current methods based on mass and length. *Functional Ecology*. 24: 1323–1332.
- Peres, C.A., J. Barlow, J. y W. F. Laurance. 2006. Detecting anthropogenic disturbance in tropical forests. *Trends in Ecology and Evolution*. 21: 227– 229.
- Pineda E. y G. Halffter. 2004. Species diversity and habitat fragmentation: frogs in a tropical montane landscape in Mexico. *Biological Conservation*. 117:499–508.
- Pineda, E. y C. A. Rodríguez Mendoza. 2010. Distribución y abundancia de *Craugastor vulcani*: una especie de rana en riesgo de Los Tuxtlas, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 81: 133-141.
- Pollock, H.S., Z. A. Cheviron, T. J. Agin, y J. D. Brawn. 2015. Absence of microclimate selectivity in insectivorous birds of the Neotropical forest understory. *Biological Conservation*. 188: 116–125.
- Porter, K. R. 1972. Herpetology. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania.
- Redford *et al.* 2011. What Does It Mean to Successfully Conserve a (Vertebrate) Species? *BioScience*. 61: 39–48.
- Reed, D. H. y R. Frankham. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*. 17: 230–237.



- Reh, W. y A. Seitz. 1990. The influence of land use on the genetic structure of populations of the common frog *Rana temporaria*. *Biological Conservation*. 54:239–249.
- Revilla, E. y T. Wiegand. 2008. Individual movement behavior, matrix heterogeneity, and the dynamics of spatially structured populations. *Proceedings of National Academy of Science* 105:19120–19125.
- Richardson, J. L. 2012. Divergent landscape effects on population connectivity in two co-occurring amphibian species. *Molecular Ecology*. 21: 4437–4451.
- Rodríguez-Mendoza, C. y E. Pineda. 2010. Importance of riparian remnants for frog species diversity in a highly fragmented rainforest. *Biology Letters*. 6: 781–784.
- Rovito, S. M., G. Parra-Olea, C. R. Vásquez-Almazán, T. J. Papenfuss y D. B. Wake. 2009. Dramatic declines in Neotropical salamander populations are an important part of the global amphibian crisis. *PNAS*. 106: 3231–3236.
- Santos, T. G., D. C. Rossa-Feres y L. Casatti. 2007. Diversidade e distribuição espaço-temporal de anuros em região com pronunciada estação seca no sudeste do Brasil. *Iheringia*. 97:37–49.
- Saunders, D. A., R. J. Hobbs, y C. R. Margules. 1991. Biological consequences of ecosystem fragmentation: A review. *Conservation Biology*. 5: 18–32.
- Scherer R. D., E. Muths, B. R. Noon y S. J. Oyler-McCance. 2012. The genetic structure of a relict population of wood frogs. *Conservation Genetics*. 13:1521–1530.
- Sekercioglu, Ç.H., P. R. Ehrlich, G. C. Daily, D. Aygen, D. Goehring, R. F. Sandi. 2002. Disappearance of insectivorous birds from tropical forest fragments. *PNAS*. 99: 263–267.
- Semlitsch, R. D. y J. R. Bodie. 1998. Are small, isolated wetlands expendable? *Conservation Biology*. 12:1129–1133.
- Semlitsch, R. D. 2003. Amphibian conservation. Smithsonian Institution, Washington, D C.

- Shaffer, H. B., M. Gidiş, E. McCartney-Melstad, K. M. Neal, H. M. Oyamaguchi, M. Tellez, y E. M. Toffelmier. 2015. Conservation genetics and genomics of amphibians and reptiles. *Annual Review Animal Bioscience*. 3(ch.1), 113-138.
- Sinsch, U. 1990. Migration and orientation in anuran amphibians. *Ethology and Evolution*. 2: 65-79.
- Smith, D. C. 1987. Adult recruitment in chorus frogs: effects of size and date at metamorphosis. *Ecology*. 68, 344–350.
- Smith, K. F, W. K. Acevedo-Whitehouse, A. B. Petersen. 2009. The role of infectious diseases in biological conservation. *Animal Conservation*. 12: 1–12.
- Solís F., R. Ibáñez, G. Santos-Barrera, K. H. Jungfer, J. M. Renjifo y F. Bolaños. 2008. *Agalychnis callidryas*. In: IUCN 2008. 2008 IUCN Red List of Threatened Species. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Speakman, J. R., T. Ergon, R. Caanagh, K. Reid, D. M. Scantlebury y X. Lambin. 2003. Resting and daily energy expenditures of free-living field voles are positively correlated but reflect extrinsic rather than intrinsic effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 14 057–14 062.
- Spear, S. F. y A. Storfer. 2008. Landscape genetic structure of coastal tailed frogs (*Ascaphus truei*) in protected vs. managed forests. *Molecular Ecology*. 17: 4642–4656.
- Stahlberg, F., M. Olsson y T. Uller. 2001. Population divergence of developmental thermal optima in Swedish frogs, *Rana temporaria*. *Journal Evolutionary Biology*. 14: 755–762.
- Stickel, W. H. y J. B. Cope. 1947. The home ranges and wandering of snakes. *Copeia* 1947: 127-136.
- Stuart, S. N., J. S. Chanson, N. A. Cox, B. E. Young, A. S. L. Rodriguez, *et al.* 2004. Status and trends of amphibian declines extinctions worldwide. *Science*, 306: 1783–1786.

- Stuart, S. N., M. Hoffmann, J. S. Chanson, N. A. Cox, R. J. Berridge, P. Ramani, y B. E. Young 2008. Threatened Amphibians of the World. Lynx Edicions, Barcelona, Spain; IUCN, Gland, Switzerland; Conservation International, Arlington, USA, Barcelona, Spain.
- Taylor, P. D., L. Fahrig, K. Henein y N. G. Merriam. 1993. Connectivity is a vital element of landscape structure. *Oikos* 68: 571–573.
- Toledo, V. M. 1994. La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo*. 14: 17–30.
- Touchon, J. C. y K. M. Warkentin. 2008. Reproductive mode plasticity: Aquatic and terrestrial oviposition in a treefrog. *PNAS*. 105: 7495-7499.
- Touchon, J. C. y K. M. Warkentin. 2009. Negative synergism of rainfall patterns and predators affects frog egg survival. *Journal of Animal Ecology*. 78: 715–723.
- Tucker, D. B., L. D. McBrayer y J. S. Harrison. 2014. Population structure of Florida scrub lizards (*Sceloporus woodi*) in an anthropogenically fragmented forest. *Herpetologica* .70: 266–278.
- Tuff, K. T., T. Tuff, y K. F. Davies. 2016. A framework for integrating thermal biology into fragmentation research. *Ecology letters*. 19: 361–374.
- Urbina-Cardona, J. N. y V. H. Reynoso. 2005. Recambio de anfibios y reptiles en el gradiente potrero-borde-interior en Los Tuxtlas, Veracruz, México. Pp: 191–207. *In* Sobre Diversidad Biológica: El significado de las Diversidades Alfa, Beta y Gamma. Halffter, G., Soberón, J., Koleff, P. & Melic, A. (eds.). México: CONABIO/SEA/CONACyT/DIVERSITAS.
- Urbina-Cardona, J. N, M. Olivares-Pérez y V. H. Reynoso. 2006. Herpetofauna diversity and microenvironment correlates across a pasture–edge–interior ecotone in tropical rainforest fragments in the Los Tuxtlas Biosphere Reserve of Veracruz, Mexico. *Biological Conservation*. 32: 61–75.

- Urbina-Cardona, J. N. y V. H. Reynoso. 2009. Uso del microhábitat por hembras grávidas de la rana de hojarasca *Craugastor loki* en la selva alta perennifolia de Los Tuxtlas, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 80: 571- 573.
- Van Houtan, K. S., S. L. Pimm, J. M. Halley, R. O. Bierregaard, y T. E. Lovejoy. 2007. Dispersal of Amazonian birds in continuous and fragmented forest. *Ecology Letters*. 10:219-229.
- Visco, D. M. y T. W. Sherry. 2015. Increased abundance, but reduced nest predation in the chestnut-backed antbird in Costa Rican rainforest fragments: surprising impacts of a pervasive snake species. *Biological Conservation*. 188: 22–31.
- Vogt, R. C. 1997. Las ranas de Laguna del Zacatal. Pp. 500-503. *In*: Historia Natural de Los Tuxtlas. González-Soriano E., R. Dirzo y R. C. Vogt eds. UNAM. México.
- Vogt, R. C., J. L. Villarreal-Benítez y G. Pérez-Higareda. 1997. Lista anotada de anfibios y reptiles. Pp. 507-522. *In* Historia natural de Los Tuxtlas, E. González-Soriano, R. Dirzo y R. C. Vogt (eds.). UNAM. México,
- Vonesh, J. R. y O. De la Cruz. 2002. Complex life cycles and density dependence: assessing the contribution of egg mortality to amphibian declines. *Oecologia*. 133: 325–333.
- Warkentin, K. M. 2000. Environmental and Developmental Effects on External Gill Loss in the Red-Eyed Tree Frog, *Agalychnis callidryas*. *Physiological and Biochemical Zoology*. 73: 557–565.
- Warkentin, K. M., M. S. Caldwell, T. D. Siok, A. T. D'Amato y J. G. McDaniel. 2007. Flexible information sampling in vibrational assessment of predation risk by red-eyed treefrog embryos. *Journal of Experimental Biology*. 210: 614-619.
- Wells, K. D. 2007. The ecology and behavior of amphibians. The University of Chicago Press, Chicago.

- Wright, A. N. y K. R. Zamudio. 2002. Color pattern asymmetry as a correlate of habitat disturbance in spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*). *Journal of Herpetology*. 36: 129– 133.
- Young, A., T. Boyle, y T. Brown. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution*, 11: 413-418.
- Zuckerberg, B., M. Carling, R. Dor, E. Ferree, G. Spellman y A. Townsend. 2014. Differential relationships between habitat fragmentation and within-population genetic diversity of three forest-dwelling birds. *BioRx*: v 004903.