



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**¿ES LA VARIACIÓN GEOGRÁFICA EN EL CANTO DE *Hyla eximia* RESULTADO DE  
DESPLAZAMIENTO DE CARACTERES REPRODUCTIVOS?**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**RUTH ELIZABETH RODRÍGUEZ TEJEDA**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. CONSTATINO DE JESÚS MACÍAS GARCIA

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

COMITÉ TUTOR: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

DR. ENRIQUE MARTÍNEZ MEYER

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

**MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2014**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**¿ES LA VARIACIÓN GEOGRÁFICA EN EL CANTO DE *Hyla eximia* RESULTADO DE  
DESPLAZAMIENTO DE CARACTERES REPRODUCTIVOS?**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**RUTH ELIZABETH RODRÍGUEZ TEJEDA**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. CONSTATINO DE JESÚS MACÍAS GARCIA

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

COMITÉ TUTOR: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

DR. ENRIQUE MARTÍNEZ MEYER

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

**MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2014**

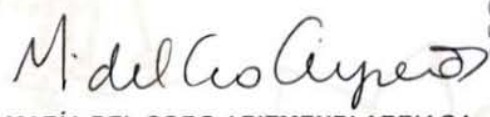
**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**P r e s e n t e**

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática en su sesión ordinaria del día 10 de febrero de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **RODRÍGUEZ TEJEDA RUTH ELIZABETH** con número de cuenta **504008728** con la tesis titulada: **"¿Es la variación geográfica en el canto de Hyla eximia resultado de desplazamiento de caracteres reproductivos?"** bajo la dirección del **DR. CONSTANTINO DE JESÚS MACÍAS GARCÍA**:

- |             |                                  |
|-------------|----------------------------------|
| Presidente: | DR. CARLOS RAFAEL CORDERO MACEDO |
| Vocal:      | DR. JOSÉ JAIME ZÚNIGA VEGA       |
| Secretario: | DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU |
| Suplente:   | DR. JULIO LEMOS ESPINAL          |
| Suplente    | DRA. CARLA GUTIÉRREZ RODRÍGUEZ   |

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F. a 04 de septiembre de 2014



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



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

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Agradecimientos institucionales**

Me gustaría comenzar por agradecer al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por ser el principal impulsor del desarrollo de este trabajo. De igual manera, agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México porque juega un papel importante en nuestra formación gracias a su diversidad de oportunidades académicas, culturales e infraestructura, que nos brindan la oportunidad de mejorar y crecer como personas. Además de ofrecermelo, como alumna externa al distrito federal, la oportunidad de realizar estudios de posgrado en una institución de prestigio a nivel internacional.

Agradezco profundamente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México, quien me proporcionó una beca económica para impulsar la dedicación completa al doctorado. Sin este gran apoyo la realización de la tesis y el artículo hubieran sido imposibles, ya que de cierta manera la estabilidad económica nos proporciona tranquilidad y mejor enfoque hacia las actividades académicas. Sin la existencia de este estímulo académico los biólogos no podríamos formarnos como científicos ni realizar ciencia en nuestro país. Aunado a mi beca de doctorado, esta dependencia mediante el fomento de Ciencia Básica, otorgó un apoyo económico al proyecto “Desplazamiento de caracteres reproductivos en zonas de contacto de *Hyla* en el neártico mexicano” con número 83779, del cual se pudieron realizar salidas de campo para la colecta de datos, se pudo comprar equipo de grabación, de cómputo y material de laboratorio para el desarrollo de la tesis y de otras más.

Agradezco también a la dirección general de estudios de posgrado (DGEP) quien financió el transporte aéreo para realizar una estancia de investigación en el Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid, España. Sin esta aportación las pruebas de elección de pareja no hubieran sido posibles.

Además de los apoyos económicos, cabe señalar que el comité tutor jugó un papel importante en el desarrollo de la tesis. Gracias a la retroalimentación recibida en los exámenes tutorales por parte del Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau y del Dr. Enrique Martínez Meyer, la tesis pudo encaminarse correctamente hacia su culminación. A pesar de que hubo algunos factores ambientales que dificultaron el término de este trabajo, ellos siempre estuvieron al pendiente y con la mejor disposición para ayudar.

Finalmente agradezco a mi tutor principal de tesis, el Dr. Constantino Macías García, quien además de proponer una hipótesis interesante de la cual surgieron dos tesis de doctorado (una de ellas la mía), ha sido un excelente director de tesis. Siempre estuvo disponible para cualquier duda o problema que surgiera en el desarrollo del proyecto, y antes de contar con el apoyo de CONACyT, él dispuso del dinero de su presupuesto operativo para que las primeras salidas de campo se realizaran. Aunque todas estas son

características de cualquier tutor principal, la diferencia recae en que él siempre se ha preocupado por despertar el interés académico y cultural tanto de sus alumnos, como de los alumnos adjuntos (alumnos de Rox y en algún momento de Hugh). Además, Tino ha procurado que haya integración y armonía en el ambiente del laboratorio, ha mostrado con el ejemplo que una vida de arduo trabajo rinde frutos, y sobre todo ha sido una persona desprendida y generosa con todos nosotros. No recuerdo ni un solo momento en que haya negado su ayuda a alguien que la necesitara, o que nunca se haya preocupado por algún alumno enfermo; al contrario, siempre tengo presente que además de ser un investigador responsable, es un gran amigo, que te tiende la mano cuando lo necesitas y te apoya en los momentos en que el camino comienza a nublarse.

## **Agradecimientos personales**

Esta sección la iniciaré agradeciendo a todas las personas que de manera amable y desinteresada brindaron ayuda en las localidades de estudio. Muchos de los pobladores se desconcertaban cuando uno les preguntaba si habían escuchado ranas, pero una vez que les explicaba el proyecto, siempre mostraban interés y hasta nos invitaban a comer. Para el desarrollo de esta tesis fue muy importante contar con su apoyo y el que nos sintiéramos en confianza, pues bien nuestro muestreo era arriesgado porque se realizaba durante la noche.

En el estado de San Luis Potosí, el Sr. Jerónimo Ávila y su esposa Angélica Archundia siempre nos recibieron con mucho gusto y fue muy agradable ver que todavía hay personas que se preocupan por conocer qué especies de plantas y animales hay en su localidad, pero sobre todo por los deseos de conservar la diversidad. También debo agradecer al Sr. Marcelino Borjaz por permitir el acceso a la Laguna de Gerardo. El Sr. Antonio Briones y su esposa Josefina Carillo, encargados del invernadero de la localidad Km 58, siempre nos brindaron alojamiento en sus propiedades y nos permitieron convivir con su familia, además de dejarnos participar en las actividades de reforestación que desempeñaban los pobladores del lugar. Así mismo la familia de su sobrino nos compartió de sus alimentos, lo cual demuestra la sencillez de las personas y el desinterés por lo material.

En Jalisco también tuvimos la suerte de encontrar a buenas personas, como la Sra. Martha J. Godínez, quien al estar a cargo del departamento de Ecología del municipio de Valle de Juárez nos mostró lugares donde podíamos encontrar ranas. También nos abrió las puertas de su casa y nos compartió de su comida, permitiéndonos pasar una tarde agradable en compañía de ella y de su hijo. En la localidad de Magdalena, el cuerpo policial a cargo estuvo al pendiente de nuestra seguridad mientras grabábamos los cantos, realizando varios rondines para asegurarse de que no tuviéramos ningún percance.

En el Estado de México, contamos con el apoyo del técnico Melesio Núñez, octavo regidor municipal de Ixtapan de la Sal, quien mediante la ayuda del “Sr. Tomás” nos mostró lugares y nos acompañó en diversas ocasiones a realizar grabaciones durante la noche.

Para finalizar esta parte de agradecimientos, pero no menos importante sino porque Hidalgo fue el último estado que visitamos, agradezco el apoyo incondicional brindado por Martha Cecilia Chávez Peón y el Dr. Miguel Ángel Martínez, responsables del Rancho Santa Elena, quiénes a través de la ardua tarea de preservar este lugar, hicieron una amplia invitación al Instituto de Ecología para desarrollar estudios en su rancho. Sin esa invitación nosotros nos hubiéramos perdido la oportunidad de conocer tan maravilloso lugar y sobre todo de trabajar en una zona completamente segura.



La segunda sección de agradecimientos es para todas las personas que hicieron el favor de acompañarme y ayudarme durante las salidas de campo, sin su apoyo me hubiera sido imposible ubicar las poblaciones de estudio y obtener datos. Debo mencionar que durante el primer año de muestreo fue vital contar con su esfuerzo, ya que requerí de todo su apoyo para visitar la variedad de estados y localidades en dónde se había reportado la presencia de las especies de estudio. Con esto no pretendo demeritar la ayuda de todos aquellos que me acompañaron en años posteriores, también contribuyeron fuertemente al proyecto. De todos valoro mucho que hayan soportado las desveladas, los constantes aguaceros, el frío, las incomodidades cuando teníamos que acampar y sufrir el asalto de los perros hacia nuestra despensa, las veces en que la Hilux se atascó en el lodo, y muchas más aventuras que nos ocurrieron en el campo. Siguiendo el orden de las salidas de campo, les agradezco infinitamente a: Georgina Cortés, Beatriz Peña, Edgar Ávila, Roberto, Irene Barbosa, Raúl Ruíz, Evelyn Quiróz, Natalia Lifshitz, Christian Montes, Sergio Ancona, René Beamonte, Alejandro Méndez, Erick García, Miguel Maldonado, Eira Bermúdez, Iván Delgado, Araceli Flores, Monserrat Suárez, Nguyen Miranda, Fabiola Flores, Ma. Guadalupe Méndez, Alejandro Ríos, Marcela Méndez, Gonzalo Ramírez, Alejandro Freyermuth, Ma. Fernanda Mendieta, César Ríos, Erwin Vázquez y Atziri García. Cabe mencionar que muchos de ellos asistieron más de una vez, dejando a un lado sus actividades académicas, y en una ocasión proporcionándome su valioso apoyo mientras enfrentaba la candidatura, por lo que mi agradecimiento es doble para: Georgina, Christian, Natalia, Irene, Monserrat y Marce.

Un apartado especial de esta sección es para las personas que me auxiliaron en el uso del programa acústico, me refiero a Alejandro Ríos y Georgina Cortés. Así mismo, agradezco a Ma. Guadalupe Méndez y a Valentina Islas por su valioso apoyo y asesoría en la obtención e interpretación de la información molecular. También agradezco la paciencia y los útiles consejos estadísticos de Santiago Benitez- Vieyra. Y aunque en la tesis ya no incluimos el análisis de variación fenotípica, le doy las gracias a Paula Sosenski por su tiempo y dedicación para enseñarme el análisis de matrices.

También quiero agradecer a los integrantes de la Fonoteca Zoológica del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid (CSIC), España. En especial al Dr. Rafael Márquez que me aceptó para realizar una estancia de investigación con él, que contribuyó a mi aprendizaje en el amplio campo de la bioacústica y que me mostró cómo se realizan las pruebas de fonotaxia en el campo, lo cual me brindó la oportunidad de conocer algunas localidades de dicho país. A su vez gracias a Diego Llusia por ser una persona amable, por dedicar parte de su tiempo a enseñarme una técnica de bioacústica, pero sobre todo por brindarme su amistad y hacerme sentir en confianza en un país extraño. Dentro de este bloque, quiero agradecer también a Ana Cecilia, Lorenzo, Eliana, los dos Juan Carlos, Carolina, Juan Esteban y Lety, por ser excelentes personas, generosas y cariñosas. Desde mi llegada a Madrid me hicieron sentir como en casa y me incluyeron en las actividades

familiares. Aprendí muchas cosas de ellos, en especial a no darse por vencidos y alcanzar todo lo que se propongan, aún cuando esto implique grandes sacrificios como abandonar su país natal, pero manteniendo junta a la familia y mirando positivamente hacia el futuro.

Así mismo agradezco los valiosos comentarios de los sinodales que formaron mi jurado de examen, los cuales permitieron componer y perfeccionar el escrito de la tesis. Ellos fueron: Dr. Carlos Cordero Macedo, Dr. Jaime Zúñiga Vega, Dr. Daniel Piñero Dalmau, Dr. Julio Lemos Espinal y Dra. Carla Gutiérrez Rodríguez.

La tercera sección de agradecimientos corresponde a todas aquellas personas del instituto de ecología que me brindaron soporte en trámites, emergencias y dudas para mejorar el desarrollo del proyecto. Inicio con el Lic. Daniel Zamora quien siempre estuvo al tanto de cualquier contratiempo que tuviéramos en el campo. La Lic. Lizbeth Palacios que también fue una pieza clave al apoyarnos constantemente con el manejo del apoyo económico de CONACyT y soportando de buena manera las prisas y cambios que surgían por los cambios en la disposición del dinero. Por supuesto, también agradezco a Socorro Ortega, Patricia Martínez y Erika Rodríguez por su amabilidad y disponibilidad hacia cualquier emergencia que me surgía con el papeleo. De igual manera agradezco al M. en I. Alejandro González y al Ing. Daniel Valle porque siempre tuvieron una solución a los problemas técnicos que se me presentaban, así como por la disponibilidad de software y equipo. Esta sección quedaría inconclusa sino agradeciera a la Dra. Ma. Del Rocío Cruz por el préstamo de camioneta para realizar una salida de campo.

Por supuesto, no puedo dejar de agradecer a todos mis compañeros y amigos del laboratorio de conducta animal, los cuales hicieron muy agradable la convivencia cotidiana, misma que nos encaminó hacia una valiosa amistad. Cómo olvidar todas las horas de comida que compartimos tanto en la antigua “salita” como en las mesas del jardín, o las ocasiones que festejábamos el cumpleaños de alguien, incluso la difícil etapa en que tuvimos que separarnos por los cambios en la remodelación del laboratorio. También quedan en mi memoria las veces que acudimos al curso de Tlaxcala, las reuniones de GT (Grupo Tino), las desveladas para ir a capturar aves, las fiestas de titulación y sobre todo la oportunidad de convivir con personas de diversos estados y países. Ahora sí (más o menos por orden de aparición en el laboratorio), gracias a: Eira, Bety, Aressia, Christian, Irene, Chelén, Ale Valero, Omar, Ceci, Oscar, Momo, Natalia, René, Ale Ramos, Pablo, Georgina, Elvia, Checko, Isabel, Fabrice, Yoli, Ania, Marce, Mary, Evelyn, Víctor, Nadia, Bibiana, Monse, Nuri, Iluminada, Natalia G., Luisa, Gustavo, Jaime, Melissa, Miguel, Sayuri, Diana, Jocelyn, Daianna y Alejandro. Especialmente agradezco a Christian, Eira, Irene, Yoli, Marce, Nadia y Monse por darme la oportunidad de conocerlos, por tener el gusto de construir día a día una amistad y por contar con su apoyo y alegría en los momentos difíciles.

Finalmente agradezco a mi familia quienes han sido un constante ejemplo para mi formación como persona y como profesionalista. Gracias a mi mamá porque siempre ha estado conmigo apoyándome bajo cualquier circunstancia (aún cuando no esté en completo acuerdo conmigo), preocupándose por mi bienestar y enseñándome, tal vez de manera inconsciente, a ser una persona sencilla, agradecida, responsable y capaz de lograr cualquier objetivo, pero sobre todo le agradezco que sea una mujer fuerte, que nunca desistió ante las adversidades de la vida y nos sacó adelante, mostrándonos que la vida tiene sus momentos difíciles pero desaparecen con una gran sonrisa. A mis hermanos, Alfredo y Víctor, les agradezco en primer lugar, porque siempre han cumplido el papel de hermanos mayores, brindándome ayuda tanto moral como económica y aunque existe una gran diferencia de años entre nosotros, uno o el otro han estado presentes en diversas etapas de mi desarrollo y sé que siempre estarán ahí. En segundo lugar les agradezco porque al ser buenos estudiantes influyeron en mis hábitos de estudio y me vi obligada a no dejar mal el apellido, ja ja, más aún cuando acudimos a las mismas escuelas y los profesores siempre me recordaban lo buenos alumnos que habían sido. Gracias a Víctor por las incontables ocasiones que me asesoró con mis problemas de matemáticas, cálculo y probabilidad, al final sus regaños sirvieron mucho, quién iba pensar que yo daría clases de estadística. Gracias a Alfredo por tener la casa llena de libros, éstos me entretuvieron durante las largas vacaciones y lograron que adquiriera el buen hábito de leer. Además, el hecho de que por él siempre hubiera mascotas en casa repercutió en mi decisión por estudiar la carrera de biología. En general, gracias a los dos por ser tan buenos hermanos, por guiarme y acompañarme en esta aventura de la vida. Finalmente gracias a Marilú y Silvana, quiénes se incorporaron a nuestro núcleo familiar y han traído nuevas alegrías a nuestras vidas.

Para cerrar esta larga sección de agradecimientos, agradezco a mi primo Alejandro y su esposa Lili por auxiliarme en varias ocasiones, como la vez que me llevaron al aeropuerto. El tenerlos cerca es una satisfacción para mí porque me permite disfrutar de su compañía y recordar los momentos familiares.

# ÍNDICE

## Resumen.

1. Introducción General.	
1. Aislamiento reproductivo.....	1
2. Reconocimiento y preferencia de pareja.....	7
3. Comunicación animal.....	9
4. Planteamiento del problema.....	12
5. Literatura citada.....	14
2. Capítulo I. Desplazamiento de caracteres reproductivos en <i>Hyla eximia</i> .	
1. Resumen.....	20
2. Introducción.....	21
3. Objetivos.....	23
2.3.1 Objetivo general.....	23
2.3.2 Objetivos particulares.....	23
4. Hipótesis.....	23
5. Materiales y métodos.....	24
2.5.1 Elección de las localidades.....	24
2.5.2 Registro del canto.....	26
2.5.3 Análisis del canto.....	27
2.5.4 Desplazamiento de caracteres reproductivos.....	29
6. Resultados.....	30
2.6.1 Descripción del canto.....	30
2.6.2 Desplazamiento de caracteres reproductivos.....	35
2.6.2.1 Correlaciones.....	35
2.6.2.2 ANCOVA <i>Hyla eximia</i> .....	39
2.6.2.3 ANCOVA <i>Hyla arenicolor</i> .....	39
2.6.2.4 ANCOVA <i>Tlalocohyla smithii</i> .....	40

2.6.2.5 MANOVA.....	41
2.6.2.6 Análisis discriminante.....	42
7. Discusión.....	47
2.7.1 Descripción del canto.....	47
2.7.2 Desplazamiento de caracteres reproductivos.....	49
Literatura citada.....	55
3. Capítulo II. Diferenciación genética entre poblaciones de <i>Hyla eximia</i> .	
1. Resumen.....	64
2. Introducción.....	65
3. Objetivos.....	68
3.3.1 Objetivo general.....	68
3.3.2 Objetivos particulares.....	68
4. Hipótesis.....	69
5. Materiales y métodos.....	69
3.5.1 Extracción de ADN y amplificación.....	69
3.5.2 Alineaciones y análisis filogenético.....	70
3.5.3 Diversidad, diferenciación genética y patrones filogeográficos.....	71
3.5.4 Correlación entre distancias genéticas, acústicas y geográficas.....	72
6. Resultados.....	72
3.6.1 Análisis filogenético.....	72
3.6.2 Diversidad, diferenciación genética y patrones filogeográficos.....	80
3.6.2.1 Genes mitocondriales.....	80
3.6.2.2 Genes nucleares.....	82
3.6.3 Correlación de distancias genéticas, acústicas y geográficas.....	88
7. Discusión.....	89
3.7.1 Análisis filogenético.....	89
3.7.2 Diversidad, diferenciación genética y patrones filogeográficos.....	90
3.7.3 Correlación de distancias genéticas, acústicas y geográficas.....	92
3.7.4 Literatura citada.....	95
4. Discusión general.....	108
Literatura citada.....	113

Apéndice A. Elección de pareja en <i>Hyla eximia</i> .	
A.1 Resumen.....	115
A.2 Introducción.....	116
A.3 Objetivos.....	118
A.3.1 Objetivo general.....	118
A.3.2 Objetivos particulares.....	119
A.4 Hipótesis.....	119
A.5 Materiales y métodos.....	119
A.5.1 Elección y creación del estímulo.....	120
A.5.2 Arena experimental.....	120
A.5.3 Prueba de elección.....	121
A.6 Resultados.....	123
A.6.1 Estímulos.....	123
A.6.2 Prueba de elección.....	125
A.7 Discusión.....	128
A.7.1 Estímulos.....	128
A.7.2 Prueba de elección.....	129
Literatura citada.....	132
Apéndice B. Artículo publicado en PeerJ.....	133

## ÍNDICE DE CUADROS

### Capítulo I.

Cuadro 1. Poblaciones muestreadas de <i>H. eximia</i> , <i>H. arenicolor</i> y <i>T. smithii</i> .....	25
Cuadro 2. Estadística descriptiva de los atributos del canto, tamaño y temperatura corporal.....	34
Cuadro 3. Correlaciones de los atributos del canto de <i>Hyla eximia</i> en alopatria.....	36
Cuadro 4. Correlaciones de los atributos del canto de <i>Hyla eximia</i> en simpatria con <i>Hyla arenicolor</i> y con <i>Tlalocohyla smithii</i> .....	37
Cuadro 5. Correlaciones de los atributos del canto de <i>Hyla arenicolor</i> y de <i>Tlalocohyla smithii</i> .....	38
Cuadro 6. Análisis de covarianza de los atributos de los cantos de <i>H. eximia</i> , <i>H. arenicolor</i> y <i>T. smithii</i> .....	41
Cuadro 7. Análisis discriminante.....	43
Cuadro 8. Comparación entre cuencas de las funciones discriminantes del canto de <i>H. eximia</i> .....	45

### Capítulo II.

Cuadro 1. Identificación del tejido colectado para la extracción de ADN de las poblaciones de <i>Hyla eximia</i> .....	74
Cuadro 2. Número de individuos amplificados y secuenciados para cada gen mitocondrial y nuclear.....	77
Cuadro 3. Diversidad haplotípica ( <i>h</i> ) y nucleotídica ( $\pi$ ) de cada sub-región de las cuencas.....	83
Cuadro 4. Coeficiente de diferenciación poblacional ( $F_{ST}$ ) para genes mitocondriales y nucleares.....	84
Cuadro 5. Correlaciones y correlaciones parciales de Mantel.....	88

### Apéndice A.

Cuadro 1. Hembras de <i>Hyla eximia</i> sometidas a las pruebas de elección de dos estímulos.....	126
---	-----

## ÍNDICE DE FIGURAS.

### Introducción general.

- Figura 1. Modelos de reforzamiento y desplazamiento de caracteres reproductivos..... 6
- Figura 2. Representación gráfica del desplazamiento de caracteres reproductivos en una especie con un rango geográfico amplio..... 7

### Capítulo I.

- Figura 1. Poblaciones de muestreo de *Hyla eximia*, *Hyla arenicolor* y *Tlalocohyla smithii*..... 26
- Figura 2. Atributos del canto de anuncio de *Hyla eximia*..... 28
- Figura 3. Cantos de anuncio divididos por composición del coro... .. 33
- Figura 4. Comparación de las funciones discriminantes 1 y 2 entre las cuencas hidrológicas de *H. eximia*..... 44
- Figura 5. Funciones discriminantes de *H. eximia* por cuenca..... 46
- Figura 6. Comparación de las funciones discriminantes 1 y 2 entre las cuencas hidrológicas de *H. eximia*, *H. arenicolor* y *T. smithii*..... 47
- Figura 7. Espectrograma de cantos sobrepuestos en Magdalena.....52
- Figura 8. Espectrograma de cantos sobrepuestos en Balsas.....53

### Capítulo II.

- Figura 1. Filogenias de genes mitocondriales y nucleares concatenados por separado..... 79
- Figura 2. Red de haplotipos de genes mitocondriales concatenados..... 81
- Figura 3. Número de grupos genéticos encontrados para los genes nucleares..... 86
- Figura 4. Estructura poblacional de los individuos muestreados de *Hyla eximia*..... 87
- Figura 5. Distribución de haplotipos mitocondriales..... 91

### Discusión general.

- Figura 1. Hipótesis filogeográfica basada en clados mitocondriales..... 111



## **Apéndice A.**

Figura 1. Arena experimental.....	123
Figura 2. Secciones de los estímulos creados.....	125
Figura 3. Porcentajes de no elección emitidos por las hembras de <i>Hyla eximia</i> .....	127
Figura 4. Porcentajes de elección emitidos por las hembras de <i>Hyla eximia</i> .....	127

## **ÍNDICE DE ANEXOS.**

### **Capítulo I.**

Anexo 1. Colecciones revisadas para la elección de las localidades.....	60
Anexo 2. Total de localidades revisadas para obtener los sitios de muestreo.....	61

### **Capítulo II.**

Anexo 1. Haplotipos de genes mitocondriales y nucleares.....	103
Anexo 2. Secuencias obtenidas de la base de datos del GenBank.....	106

**Rodríguez-Tejeda R. E. 2014. ¿Es la variación geográfica en el canto de *Hyla eximia* resultado de desplazamiento de caracteres reproductivos? Tesis doctoral. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 135 pp.**

## **Resumen**

Las poblaciones de especies que ocupan áreas geográficas grandes a menudo son fenotípicamente diversas como consecuencia de la variación en las presiones selectivas y la deriva. Esto aplica a atributos involucrados en la elección de pareja, particularmente cuando la distribución geográfica y la biología reproductiva de las especies relacionadas se sobreponen. Esta condición puede conducir a interferencia de señales de apareamiento, la cual podría promover el desplazamiento de caracteres reproductivos (RCD). Investigamos si la variación en el canto de anuncio de la rana arborícola de montaña (*Hyla eximia*) está vinculada a la distribución geográfica con respecto a las principales cuencas de los ríos mexicanos (Pánuco, Lerma, Balsas y Magdalena), o a la coexistencia con la especie hermana (la rana arborícola de cañón, *Hyla arenicolor*) u otra especie relacionada (la rana arborícola enana, *Tlalocohyla smithii*). También evaluamos si la divergencia del canto a través de las principales cuencas hidrológicas podría estar vinculada a la estructura genética. Encontramos que el espacio acústico multidimensional de los cantos de dos cuencas donde *H. eximia* actualmente interactúa con *T. smithii*, fue diferente del espacio acústico de los cantos de *H. eximia* de las otras partes. Los individuos de estas dos cuencas también se distinguían del resto por la filogenia inferida a partir de las secuencias mitocondriales y la estructura genética inferida de los marcadores nucleares. La divergencia discordante de los cantos de anuncio de *H. eximia* en las dos cuencas separadas donde su distribución geográfica se sobrepone con la de *T. smithii*, puede ser interpretada como resultado de dos eventos independientes de RCD, probablemente como consecuencia de interferencia acústica en los coros de apareamiento, aunque se requieren más datos para evaluar esta posibilidad.

Palabras clave: *Hyla eximia*, cantos de anuncio, interferencia acústica, variación geográfica.

## Abstract

Populations of species occupying large geographic ranges are often phenotypically diverse as a consequence of variation in selective pressures and drift. This applies to attributes involved in mate choice, particularly when both geographic range and breeding biology overlap between related species. This condition may lead to interference of mating signals, which would in turn promote reproductive character displacement (RCD). We investigated whether variation in the advertisement call of the mountain treefrog (*Hyla eximia*) is linked to geographic distribution with respect to major Mexican river basins (Panuco, Lerma, Balsas and Magdalena), or to coexistence with its sister (the canyon treefrog, *Hyla arenicolor*) or another related species (the dwarf treefrog *Tlalocohyla smithii*). We also evaluated whether call divergence across the main river basins could be linked to genetic structure. We found that the multidimensional acoustic space of calls from two basins where *H. eximia* currently interacts with *T. smithii*, was different from the acoustic space of calls from *H. eximia* elsewhere. Individuals from these two basins were also distinguishable from the rest by both the phylogeny inferred from mitochondrial sequences, and the genetic structure inferred from nuclear markers. The discordant divergence of *H. eximia* advertisement calls in the two separate basins where its geographic range overlaps that of *T. smithii* can be interpreted as the result of two independent events of RCD, presumably as a consequence of acoustic interference in the breeding choruses, although more data are required to evaluate this possibility.

Keywords: *Hyla eximia*, advertisement calls, acoustic interference, geographic variation.

## 1. INTRODUCCION GENERAL

Las especies que se reproducen sexualmente se distinguen de las demás porque mantienen identidad genética, lo cual les confiere características apomórficas (evolutivamente novedosas) que pueden ser utilizadas para la clasificación. Estos supuestos constituyen la parte central del concepto de especie biológica, que considera a las especies como grupos de poblaciones que se aparean y que están reproductivamente aisladas de los otros grupos (Mayr, 1963 en Coyne y Orr, 2004).

El concepto de especie biológica ha sido punto de discusión entre los científicos, sin embargo, de todos los conceptos descritos, es el adecuado para organismos con reproducción sexual y que viven en simpatria (Mayr, 1982 en Luna-Vega, 1994. Coyne y Orr (2004) recomiendan que más que preocuparse por qué concepto elegir, importa reconocer que la especiación conlleva a la adquisición de barreras reproductivas, originando estados intermedios en los que no es aplicable ningún concepto de especie. Una vez que se ha elegido el concepto de especie biológica y una población simpátrica, lo siguiente es determinar qué barreras reproductivas están interviniendo en el flujo genético y conocer qué fuerzas evolutivas actúan sobre ellas.

### 1.1. Aislamiento reproductivo

Una forma en la que se originan nuevas especies es mediante la evolución de caracteres que previenen a los individuos de la reproducción con grupos de entrecruzamiento previo, provocando aislamiento reproductivo (Pickles y Grahame, 1999). El aislamiento como causante de especiación ha generado mucha controversia. Por ejemplo, Paterson (1985) consideraba que en las poblaciones alopátricas las barreras intrínsecas eran irrelevantes para la especiación, de tal forma que propuso a los mecanismos de aislamiento como mecanismos que *facilitan* la reproducción en una población. Esta idea le surgió a partir de las observaciones realizadas por Tinbergen (1953, en Templeton, 1989), según las cuales los mecanismos de aislamiento pre-cigótico tendrían funciones adicionales al aislamiento. Finalmente, Paterson reconoció a la especie como campo para la recombinación genética, y enfatizó que los mecanismos permiten el *reconocimiento* entre los individuos de una especie. Posteriormente, Templeton (1989) agregó que los mecanismos además de apoyar

el reconocimiento permiten la *cohesión* de la especie, e incorporó el criterio de intercambio demográfico para enfatizar las interacciones ecológicas (Harrison, 1998).

El aislamiento entre especies generalmente es ocasionado por “*barreras de aislamiento*” (Coyne y Orr, 2004), término que comprende a aquellas características biológicas de los organismos, que impiden el intercambio de genes con miembros de otras poblaciones y se basan en las diferencias genéticas entre poblaciones. De acuerdo con la clasificación propuesta por Dobzhansky (1937 en White 1978) se dividen en: a) *Barreras de aislamiento pre-apareamiento* (o pre-cigótico), las cuales impiden el flujo genético evitando la transferencia del espermatozoides o polen a los individuos de otra especie (a su vez son clasificadas como: aislamiento conductual, ecológico, mecánico y por sistema de apareamiento); b) *Barreras de aislamiento pre-cigótico, post-apareamiento*, aquellas que impiden el flujo genético después de que el espermatozoides o polen ha sido transferido pero antes de la fertilización (clasificadas como: aislamiento conductual copulatorio, elección crítica de pareja y aislamiento gamético); y c) *Barreras de aislamiento post-cigótico*, son aquellas que provocan esterilidad de los híbridos e inviabilidad. En éste caso el aislamiento puede ser *extrínseco* (causado por el ambiente) o *intrínseco* (independiente del ambiente).

Las barreras de aislamiento suelen actuar de manera conjunta, de tal forma que cada una va reduciendo el flujo genético que ha escapado de las anteriores. Generalmente, las barreras que actúan primero reducen el flujo genético proporcionalmente más que las barreras que actúan después o al final (Coyne y Orr, 2004). Pero la fuerza de cada barrera no corresponde con el orden de aparición, una barrera que actúa al final puede incluso tener mayor fuerza que una que actúa al principio (e. g. Ramsey *et al.*, 2003).

El estudio de las barreras conductuales se enfoca en cómo los procesos evolutivos influyen en los patrones conductuales, provocando que sus cambios sean los primeros en manifestarse y en causar especiación. Ejemplo de ello, es el sistema de señales de apareamiento (Butlin y Ritchie, 1994) cuya función principal es que los individuos identifiquen a parejas potenciales de la misma especie para tener un apareamiento exitoso. Mediante este sistema los individuos emplean algún tipo de comunicación para identificarse como parejas apropiadas, pero cuando ocurre alguna divergencia en el sistema,

ya sea en la señal o en los componentes (e. g. emisor o receptor), el apareamiento no tiene lugar, dando como resultado el aislamiento reproductivo. El sistema de señales de apareamiento puede estar sujeto a una variedad de presiones de selección, provocadas por el ambiente o por la distribución de las especies. Por ésta razón es importante no sólo enfocarse en el estudio de las poblaciones alopátricas, que podrían reflejar respuestas plásticas a las condiciones ambientales, sino también en las poblaciones simpátricas para detectar el aislamiento actual.

Cuando dos taxa tienen una distribución simpátrica, el sistema de señales de apareamiento va a estar más propenso a la presión de selección, que cuando la distribución de los dos taxa es alopátrica. En simpatría, las especies se enfrentan a un riesgo alto de apareamiento cruzado (heteroespecífico), que probablemente dará origen a híbridos no fértiles o no viables. Esta posibilidad es mayor en especies relacionadas cercanamente, debido a que las características de la señal son similares (Stanley, 2001). Por ello, es común que en poblaciones simpátricas surjan mecanismos que actúen en la divergencia del sistema de señales de apareamiento, como el reforzamiento y el desplazamiento de caracteres reproductivos (RCD por sus siglas en inglés; Figura 1). Así, la selección natural promueve estos mecanismos ocasionando que las especies conserven sus diferencias y se mantengan aisladas reproductivamente (Howard 1993; Butlin y Ritchie, 1994; Noor 1999; Turelli *et al.*, 2001; Coyne y Orr, 2004).

El desplazamiento de caracteres es la divergencia fenotípica entre especies que comparten el mismo ambiente y que son similares ecológica o reproductivamente; generalmente ocurre entre especies cercanamente relacionadas y es promovido por la selección natural y selección sexual. Estas fuerzas actúan directamente en las interacciones entre las especies (Brown y Wilson, 1956; Grant, 1972; Howard, 1993; Hoskin y Higgie, 2010) y dentro de la especie, reduciendo así la competencia (ver Darwin en Pfennig y Pfennig, 2010). El desplazamiento de caracteres al ser dirigido por las fuerzas de selección, es un conductor de especiación (Marie, Curie SPECIATION Network *et al.*, 2012) y permite explicar por qué las especies tienden a ser fenotípicamente diferentes de otras (Pfennig y Pfennig, 2010). Las características que pueden variar son morfológicas, ecológicas, conductuales o fisiológicas (Brown y Wilson, 1956). El desplazamiento de

caracteres reproductivos es un proceso común en la naturaleza porque se expresa como un patrón de variación geográfica, en el que las características de apareamiento de las especies son más diferentes en simpatria que en alopatría (Butlin, 1987; Butlin y Ritchie, 1994; Gerhardt y Huber, 2002; Hoskin y Higgie, 2010). En diversos estudios se ha encontrado que las especies cercanamente emparentadas, al compartir similitud en alguna característica, son más competitivas por lo que tienden a divergir, pero también cuando una especie del par está en alopatría converge hacia la otra especie, presentándose una característica intermedia entre las dos (Grant, 1972). Otros estudios han evidenciado que la divergencia puede ocurrir aún entre especies que no comparten similitud en la característica (Pfennig y Ryan, 2006). La competencia entre las especies como precursor de la divergencia fue propuesta desde Darwin, quien consideró como formas cercanamente aliadas, a las variedades de la misma especie, especies del mismo género o géneros relacionados, que comparten la misma estructura, constitución y hábitat, lo que las enfrenta a una competencia severa (revisado por Pfennig y Pfennig, 2010).

El reforzamiento es la evolución de las señales de apareamiento y la preferencia que incrementa el aislamiento sexual entre taxas cuyas áreas se superponen, debido a que la selección actúa contra la hibridación o el intento de hibridación (Dobzhansky, 1951 en Hoskin y Higgie, 2010; Howard, 1993; Servedio y Noor, 2003). El reforzamiento ha sido el mecanismo de aislamiento más discutido. Primero se creía que abarcaba sólo a las barreras post-cigóticas (Butlin y Ritchie, 1994); que consideraba que las especies que se entrecruzaban producirían híbridos completamente estériles o no viables, ignorando por completo la existencia de zonas híbridas en donde los híbridos podían producir especiación (Noor, 1999); que suponía que el vigor híbrido bajo resultaba de la acumulación aleatoria de mutaciones que afectaban la viabilidad de los híbridos, por lo que se trataba de un mecanismo de especiación lento y dirigido sólo por el azar (González-Zuarth y Macías-García 2006); y sobre todo que carecía de evidencia en la naturaleza. Como resultado de este reforzamiento habría un incremento en la divergencia de las señales de apareamiento evitando así los apareamientos heteroespecíficos. De ésta manera los individuos que lograran identificar a los de su propia especie dejarían más hijos y por ende, las

características sexuales que los diferenciaban como especie serían seleccionadas más a menudo por las hembras de su propio taxón (Higgin y Blows, 2008).

Sin embargo, la definición del reforzamiento cambió a partir de que se probó que los aislamientos pre-cigótico y post-cigótico no son independientes y ocurren a tasas similares (Coyne y Orr, 1989), es decir, el reforzamiento se produce desde que la selección actúa contra la hibridación permitiendo la evolución del aislamiento pre-cigótico (Brown y Wilson, 1956; Howard, 1993; Noor, 1999; Coyne y Orr, 2004). Esto supone que las especies al entrar por primera vez en contacto se cruzan, por lo que la selección natural actúa reforzando el aislamiento post-cigótico evitando la producción de híbridos estériles o inviábiles. Posteriormente las especies quedan separadas por algún tipo de barrera (e. g. geográfica), de tal manera que la selección natural promueve la evolución de mecanismos de aislamiento pre-cigótico, los cuales jugarían un papel importante en un contacto secundario futuro. Como el reforzamiento incluye a las barreras pre y post-cigóticas, la especiación producida es originada en un plazo más corto, debido a que el aislamiento pre-cigótico es más fuerte y eficiente para aislar a las especies (Lemmon *et al.*, 2004), e incrementa más rápidamente a una distancia genética corta (especialmente en especies simpátricas), aunque ambos tipos de aislamiento se nivelan a distancias mayores (Coyne y Orr, 1989).

En este trabajo nos basaremos en la definición propuesta por Butlin y Ritchie (1994), quienes consideran al reforzamiento y al RCD (desplazamiento de caracteres reproductivos) como " *mecanismos de aislamiento reproductivo*" que utilizan diferentes barreras de aislamiento, permitiendo diferenciar la dirección y el proceso evolutivo que actúa en el carácter reproductivo. Butlin y Ritchie consideran que en el RCD no existe ningún intercambio genético entre las especies, debido a que se encuentran reproductivamente aisladas desde que entran en contacto, y una vez en simpatría las diferencias se acentúan. En realidad no importa si el RCD es considerado como un proceso evolutivo o como un patrón derivado del reforzamiento, la evidencia en la naturaleza es contundente e indica que las especies se mantienen reproductivamente aisladas mediante del desplazamiento de las características de apareamiento (ver ejemplos en Brown y Wilson, 1956). Este proceso ha sido ampliamente estudiado en especies con distribución geográfica



amplia, que presentan zonas de contacto con especies hermanas lo cual impulsa al desarrollo de un mecanismo de aislamiento reproductivo para evitar la interferencia en el cortejo (Figura 2). Aunque ésta diferencia puede deberse a las condiciones ambientales de cada población, solo podrían ser resultado de algún mecanismo reproductivo si la característica reproductiva de una especie varía en zonas de contacto, y no en alopatría.

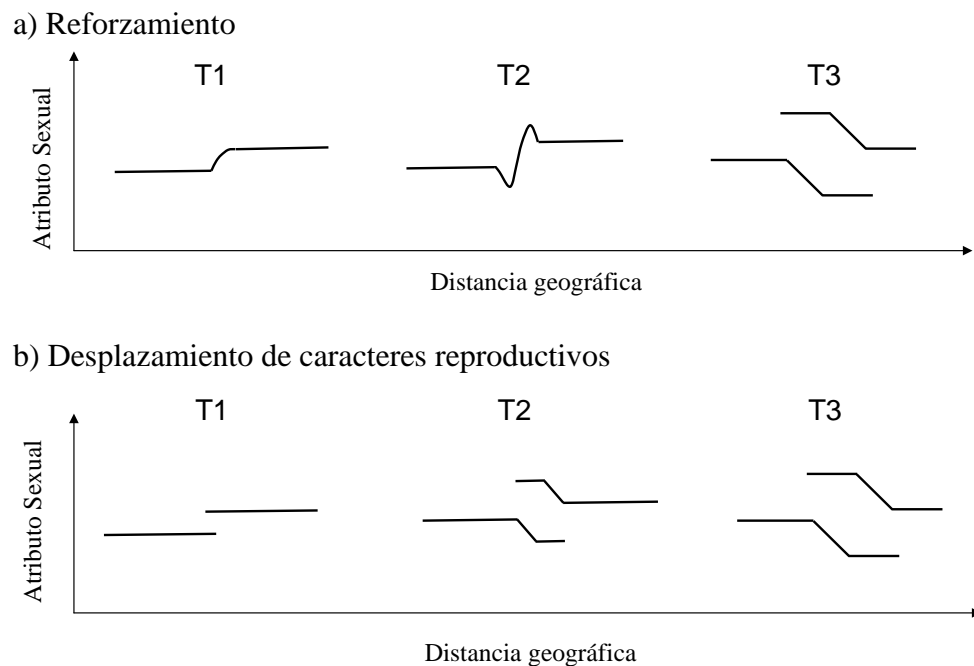


Figura 1. Los modelos de reforzamiento (a) y desplazamiento de caracteres reproductivos (b) difieren en que el primero no requiere que haya inicialmente (T1) diferencias sustanciales en los atributos usados en el reconocimiento de pareja (abscisa), ya que éstas evolucionan subsecuentemente (T2) como consecuencia de la inviabilidad de los híbridos, hasta producir un patrón de diferenciación completa en la zona de contacto en T3. El modelo de desplazamiento no requiere que se penalicen los híbridos, pero supone que las diferencias iniciales se amplifican para evitar interferencia.

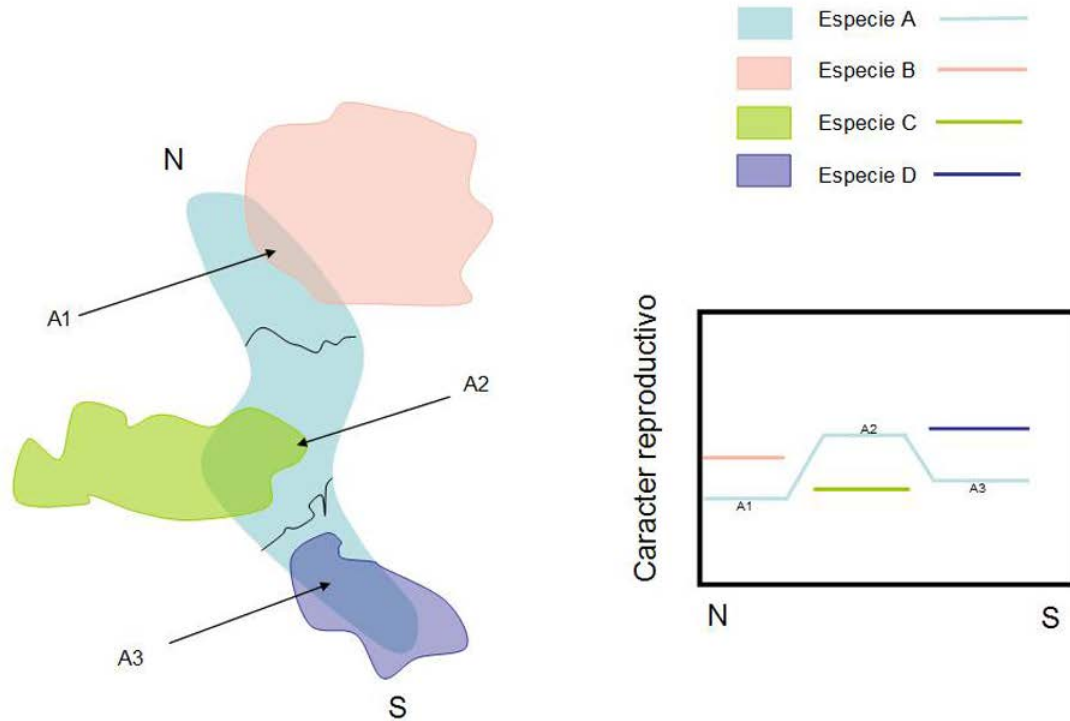


Figura 2. Representación gráfica del desplazamiento de caracteres reproductivos en una especie A con un rango geográfico amplio, cuyos atributos reproductivos se distribuyen a manera de mosaico (A1, A2, A3), bajo la hipótesis de que las diferencias locales en atributos reproductivos resultan de estar en contacto con otras especies (B, C y D).

### 1.2. Reconocimiento y preferencia de pareja

En los organismos con reproducción sexual debe existir un proceso de reconocimiento que permita la localización de un compañero sexual (Kelley *et al.*, 2001). Este reconocimiento, va acompañado de una respuesta conductual que indica que un individuo considera a otro como una pareja apropiada. Una vez que los individuos identifican a las parejas, la selección sexual incorpora varianza en el éxito reproductivo, es decir, agrega variación en la habilidad de adquirir parejas (Ryan y Rand, 1993), indicando la coevolución entre el reconocimiento y la selección sexual. Por ejemplo, una hembra puede reconocer a los machos coespecíficos como parejas apropiadas y la selección sexual actúa en el momento en que la hembra prefiere a algunos machos coespecíficos sobre otros. Generalmente, el reconocimiento y la preferencia de pareja son interpretados como el mismo término (ver

Sullivan, 2009), la diferencia recae en que la preferencia implica una comparación entre los individuos de la misma especie, que son considerados como parejas potenciales (Ryan y Rand, 1993) aunque ambos resultan de la interacción entre variación de las señales y respuestas a la variación de la señal (Wagner, 1998; Castellano *et al.*, 2002).

Si la hembra usa los mismos criterios en la identificación y la comparación, es posible aducir que la diferenciación entre las especies involucradas, es la consecuencia de divergencia entre poblaciones debida a diferencias cada vez mayores en los criterios de elección de pareja. Esto precisamente es resultado del desplazamiento de caracteres reproductivos, aunque es vulnerable frente a cambios ambientales que dificulten la elección de pareja, pues al no ocurrir ésta, y siendo que no ha evolucionado la heterosis negativa, los apareamientos entre organismos de especies emparentadas cercanamente producirán híbridos viables y eliminarán las diferencias entre especies (Panhuis *et al.*, 2001).

Los sexos están bajo diferentes presiones de selección, para reconocer y responder a la señal sexual. De acuerdo con Bernal *et al.*, (2009) existen dos tipos de errores de reconocimiento: a) error tipo I conocido como “*oportunidad perdida*”, ocurre cuando una señal apropiada es rechazada falsamente por ser confundida como inapropiada y, b) error tipo II, “*mala identificación*”, surge cuando una señal inapropiada es aceptada falsamente como apropiada. Ambos perjudican al sexo que los comete. En los machos la presión de selección es fuerte para evitar una oportunidad perdida, si fuera débil podrían perder su territorio, ser engañados por sus parejas o fracasarían para atraer a una pareja. En las hembras, la presión de selección es más fuerte para evitar una mala identificación, un error de este tipo provocaría aparearse con la especie incorrecta o con una pareja de baja calidad. Por ello las hembras son más discriminantes que los machos, pues el error implica un costo mayor (Searcy y Brenowitz, 1988). En resumen, cualquier error en el reconocimiento de pareja implica costos de pérdida de tiempo, energía y gametos (Pfennig y Pfennig, 2005).

Los estudios de los criterios de elección de las hembras son imprescindibles, principalmente en zonas simpátricas, donde los mecanismos de aislamiento deberían ocasionar mayor divergencia para evitar los errores entre machos y una fuerte preferencia de las hembras por machos de su misma especie. En estas zonas, esperamos que la

selección sea más fuerte para evitar cualquier apareamiento heteroespecífico que provoque cualquier pérdida en el individuo.

### **1.3. Comunicación animal**

En un contexto reproductivo la evolución de la comunicación animal se enfoca principalmente en dos funciones, el reconocimiento de especie y la elección de pareja (Paterson, 1985), demostrando por qué el estudio de la comunicación animal permite entender mejor la conducta de los individuos y la manera en que evolucionan las especies (Dugatkin, 2004). En términos comunes, la comunicación está basada en un sistema de emisor, señal y receptor (Stanley, 2001 en Ryan, 2001), que permite transferir la información hacia los demás individuos. Ésta definición clásica indica que dos componentes del sistema (emisor y receptor) se benefician de la información intercambiada, es decir, domina la cooperación entre ellos por lo que hay poca presión de selección para cualquiera que engañe (Dugatkin, 2004). Sin embargo, existen sistemas donde solo se beneficia uno de los dos componentes, en este caso el emisor manipula al receptor obteniendo un beneficio de éste (Ryan y Cummings, 2005), por lo tanto el receptor debe desarrollar la capacidad de discernir entre lo que es honesto y lo que no lo es (Dugatkin, 2004). En el primer escenario (cuando ambos se benefician) la señal involucra algún costo y la selección favorece minimizar ese costo. Mientras que en el segundo escenario, el emisor exagera la señal para embaucar al receptor (Krebs y Dawkins, 1978 en Dugatkin, 2004).

La comunicación es relevante en el contexto de la reproducción, porque las señales de los animales sirven principalmente para atraer a la pareja. Sin embargo, las señales también tienen otras funciones, sirven para la defensa de los territorios y la competencia intrasexual (Wilczynski y Chu, 2001), proporcionan información sobre la identificación y ubicación de las especies, dan a conocer el sexo e incluso el estado reproductivo de los individuos de la misma especie, así como anuncian sobre la calidad genética del emisor (Forester y Czarowsky, 1985; Emerson, 2001). En ésta última función, se han establecido hipótesis importantes como la de “buenos genes”, ésta sugiere que la característica sexual del macho es una señal honesta de la calidad genética del individuo, así las hembras eligen

a algunos machos con características específicas, que brindarán un beneficio indirecto en la viabilidad de los hijos (Zahavi, 1975 en Forsman y Hagman, 2006).

La producción de la señal, puede ser una actividad sumamente costosa, depende de las características del organismo encargado de transmitir la información, por ejemplo, en las aves las señales son menos costosas que en los anuros (organismos ectotermos), a pesar de que emiten señales estructuralmente más complejas (Bradbury y Vehrencamp, 1998; Gerhardt y Huber, 2002). Las aves están capacitadas con características morfológicas y fisiológicas que les permiten realizar señales costosas, mientras que los anuros, por ser organismos ectotermos, dependen más de factores extrínsecos. Aunado a los costos que implica emitir una señal, están los costos impuestos por el ambiente, debido a que cualquier señal debe ser propagada en un medio cuyas características atenuarán o acentuarán la información transmitida (Bradbury y Vehrencamp, 1998). Por ejemplo, la estructura de la vegetación, las corrientes de aire y el sonido de las cascadas, son algunas de las características ambientales que influyen en la propagación del sonido. Los individuos enfrentan estas limitantes de diversas maneras, algunas usando resonadores secundarios (cavidades bucales, sacos vocales, oquedades o madrigueras) para incrementar la eficiencia de radiación de sonidos altos o resonadores primarios (cuerdas vocales en anuros), que producen un sonido que puede ser significativamente modificado por el resonador secundario. Cantar desde una depresión o madriguera permite un sonido más direccional (Bradbury y Vehrencamp, 1998; Gerhardt y Huber, 2002).

En los anuros la comunicación acústica es usada para establecer territorios, repeler a los rivales y atraer a parejas potenciales (Zug, 1993; Cocroft y Ryan, 1995; Bernal *et al.*, 2009). También se ha reportado que el canto logra estimular la fisiología reproductiva de las hembras (Lea *et al.*, 2001), lo cual refuerza la importancia de la función reproductiva. Al igual que la mayoría de las señales, el canto es considerado una de las actividades más costosas de producir (Steven y Josephson, 1977), el costo energético recae en la tasa, duración del canto y la intensidad (nivel de presión del sonido) (Prestwich, 1994). Por ejemplo, un canto largo será producido por una sola contracción de los músculos del tronco, mientras que un canto corto requerirá varias contracciones de los músculos (Duble y Rand, 1991), es decir, para un individuo sería más costoso producir cantos con tasa de

repetición mayor, por lo que la reducción del costo conlleva a que los cantos sean de duración corta, mientras que los cantos largos sólo podrán ser producidos a tasas bajas, ya que el costo energético incrementaría si fueran producidos con repetición mayor.

En anuros, los machos emiten el canto de anuncio durante la época de apareamiento, éste es una señal de intervalo amplio que sirve para atraer a las hembras a las pozas de reproducción (Wells, 1977; Arak, 1983). La producción y variación de los cantos de anuncio depende de características fisiológicas y morfológicas. Por ejemplo, el tamaño corporal se relaciona inversamente con la frecuencia del canto (energía emitida en el canto), como regla general los individuos grandes producen sonidos graves, mientras que los individuos pequeños producen sonidos agudos (Sullivan, 1982; Zug, 1993; Gerhardt y Huber, 2002).

Debido a que los anuros son organismos ectotermos, la temperatura influye en las características de sus cantos que son controladas por el sistema neuromuscular (Gerhardt y Huber, 2002). La temperatura afecta a las propiedades temporales del canto, como la duración del pulso y la tasa de pulsos (Gerhardt y Davis, 1988; Wilczynski y Chu, 2001; Gerhardt y Huber, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2008). La frecuencia del canto, aunque no es una propiedad temporal, también aumenta o disminuye con la temperatura. Otro factor que influye en el canto, es la presencia de otros individuos (coespecíficos o heteroespecíficos), ocasiona que los machos incrementen la tasa, duración, complejidad, o bien el número de notas del canto (Wells, 2001). La intensidad de la luz ambiental y la depredación por murciélagos también pueden afectar las características del canto, sobre todo de aquellos anuros que no forman agregaciones o coros durante la época de reproducción (Tuttle y Ryan, 1982).

A pesar de todos los factores que pueden intervenir en el canto, los atributos del canto mantienen a los individuos identificables y evaluables para las hembras. En las ranas arborícolas de la familia *Hylidae*, se ha reportado que el pulso y la frecuencia dominante son importantes para el reconocimiento de la especie (Gerhardt y Davis, 1988; Gerhardt, 1991). La variación escasa en esta familia, le ha permitido la denominación de “canto estereotipado” (Gerhardt, 1992).

#### 1.4. Planteamiento del problema

Los anuros se caracterizan por presentar cantos estereotipados, pero algunas especies como *Hyla eximia* no poseen un canto típico, lo cual probablemente se debe a la distribución geográfica amplia, ocasionando que las poblaciones estén sujetas a factores ambientales y ecológicos diferentes, o bien es provocado por alguna(s) barrera(s) de aislamiento reproductivo.

Blair (1960) fue el primero en reportar variación en el canto de anuncio de *H. eximia*, encontró que los machos de Tlaxcala, Morelos, México y Jalisco producían cantos lentos, mientras que en Michoacán los cantos eran rápidos. Posteriormente Duellman (2001) encontró variación en nueve poblaciones de *H. eximia*. Con base en estos resultados se ha estudiado variación morfológica y acústica en algunas poblaciones, encontrando diferenciación en la población de Omiltemi, Guerrero (Eliosa, 2002). Cortés-Soto (2003) estudió poblaciones alopátricas y simpátricas de *H. eximia* e *H. plicata* encontrando que en simpatría las dos especies utilizaron cantos diferentes para atraer a las hembras, por lo que las diferencias en el número de pulsos y la duración del canto probablemente evitan apareamientos heteroespecíficos.

En zonas simpátricas los machos enfrentan interferencia de sus señales por machos heteroespecíficos, por lo que se favorecerían modelos de aislamiento evitando el apareamiento entre especies, creando alguna barrera conductual, como es la diferencia en alguna característica del canto de anuncio. Cabe esperar que en poblaciones simpátricas de *Hyla eximia* el canto difiera en función del de otras especies con las que coexista, evitando así la interferencia en el cortejo. Hasta ahora no se ha evaluado la posibilidad de que la variabilidad en el mosaico de cantos de *H. eximia* reportado por Duellman (2001), sea una función de la naturaleza del canto de las especies congéneres con las que es simpátrica en diferentes zonas de su distribución geográfica. En el capítulo I investigamos si la superposición en la distribución geográfica amplia, con otra especie hermana (rana arborícola de cañón, *Hyla arenicolor*) y la especie relacionada (rana arborícola enana, *Tlalocohyla smithii*) también permite un desplazamiento de caracteres reproductivos que pueda explicar la variación en los cantos de anuncio de *H. eximia*.

La mayoría de los estudios de desplazamiento de caracteres reproductivos, se han enfocado en las señales de cortejo de los machos más que en las preferencias de las hembras (Gerhardt, 1994), cuando en realidad la selección opera en ambas partes. La tasa de repetición de los pulsos es un atributo clave que permite distinguir los cantos de anuncio de las poblaciones simpátricas, y a su vez es la base para la discriminación y elección de la pareja (Littlejohn, 1965; Gerhardt, 1994). Cabe esperar que este atributo (o derivados) también sea fundamental en el reconocimiento y elección de pareja en *H. eximia*, e incluso será la característica que permita diferir entre una población alopátrica y una simpátrica. En el apéndice A realizamos pruebas de fonotaxia para determinar la preferencia de las hembras y conocer si la selección sólo ha actuado en las señales del macho o en ambas partes del sistema de señales de apareamiento. Esperamos que las hembras de poblaciones simpátricas muestren una preferencia más fuerte por los estímulos con valores similares a los cantos de machos coespecíficos, que las hembras de poblaciones alopátricas.

Finalmente, como la divergencia en el atributo sexual de especies con distribución amplia, también puede ser resultado de procesos como la deriva genética, adaptación local o interferencia acústica (Pfennig y Pfennig, 2010), en el capítulo II decidimos incorporar un estudio filogeográfico para conocer si había divergencia genética entre las poblaciones, que fuera acorde con la divergencia acústica, y a su vez aclarar la historia de la expansión geográfica por medio de secuencias de ADN mitocondrial y nuclear. Juntando los capítulos I y II presentamos un artículo científico que nos proporcionara una interpretación de mayor sustento entre los datos acústicos, genéticos y geográficos (Apéndice B).



## Literatura citada

- Arak, A. 1983. Male-male competition and mate choice in anuran amphibians. *Mate choice*: 181-210.
- Bernal, X. E., A. S. Rand y M. J. Ryan. 2009. Task differences confound sex differences in receiver permissiveness in Túngara frogs. *Proceedings of the Royal Society* 276: 1323-1329.
- Blair, W. F. 1960. Mating call as evidence of relations in the *Hyla eximia* group. *Southwestern Naturalist* 5 (3):129-135.
- Bradbury, J. W. y S. L., Vehrencamp. 1998. Principles of animal communication. Sinauer Associates Inc., Massachusetts. 882 pp.
- Brown, W. L. y E. O. Wilson. 1956. Character displacement. *Systematic Zoology* 5: 49-64.
- Butlin, R. K. 1987. Speciation by reinforcement. *Trends in Ecology and Evolution* (2) 1: 8-13.
- Butlin, R. K y M. G. Ritchie. 1994. Behavior and speciation. En: Slater, P. J. B y T. R. Halliday (eds.). Behaviour and Evolution. Cambridge University Press, New York, pp. 43-79.
- Castellano, S., B. Cuatto, R. Rinella, A. Rosso y C. Giacoma. 2002. The advertisement call of the European treefrogs (*Hyla arborea*): a multilevel study of variation. *Ethology* 108: 75-89.
- Cocroft, R. B. y M. Ryan. 1995. Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. *Animal Behaviour* 49: 283- 303.
- Cortés-Soto, G. 2003. Diferenciación en el canto de *Hyla eximia* e *Hyla plicata* en zonas de simpatria. Tesis Profesional. Universidad Autónoma del Estado de México, 25 pp.
- Coyne, J. A. y H. A. Orr. 1989. Patterns of speciation in drosophila. *Evolution* 43 (2): 362-381.

- Coyne, J. A. y H. A. Orr. 2004. Speciation. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, U. S. A. 545 pp.
- Duble, R. y A. S. Rand. 1991. Sound production and vocal sac inflation in the Túngara frog, *Physalaemus pustulosus* (Leptodactylidae). *Copeia* (2): 460-470.
- Duellman, W. E. 2001. Hylid frogs of Middle America. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Lawrence, Ks.
- Dugatkin, L. A. 2004. Principles of Animal Behavior. W. W. Norton and Company, New York. 596 pp.
- Emerson, S. 2001. Male advertisement calls: behavioural variation and physiological processes. En: Ryan, M. (ed.). Anuran Communication. Smithsonian Institution Press, Washington y London. 252 pp.
- Forester, D. C. y R. Czarnowsky. 1985. Sexual selection in the spring peeper, *Hyla crucifer* (Amphibia, Anura): role of the advertisement call. *Behaviour* 92 (1):112- 128.
- Forsman, A. y M. Hagman. 2006. Calling is an honest indicator of paternal genetic quality in poison frogs. *Evolution* 60 (10): 2148-2157.
- Gerhardt, H. C. 1991. Female mate choice in treefrogs: static and dynamic criteria. *Animal Behaviour* 42: 615-635.
- Gerhardt, H. C. 1992. Multiple messages in acoustic signals. *Seminars in Neuroscience* 4: 391-400.
- Gerhardt, H. C y M. S. Davis. 1988. Variation in the coding of species identity in the advertisement calls of *Litoria verreauxi* (Anura: Hylidae). *Evolution* 42 (3): 556-565.
- Gerhardt, H. C. y F. Huber. 2002. Acoustic Communication in Insects and Anurans: Common Problems and Diverse Solutions. University of Chicago Press, Chicago.

- González-Zuarth, C. y C. Macías-García. 2006. Phenotypic differentiation and pre-mating isolation between allopatric populations of *Girardinichthys multiradiatus*. *Proceedings of the Royal Society* 273: 301-307.
- Grant, P. R. 1972. Convergent and divergent character displacement. *Biological Journal of the Linnean Society* 4: 39-68.
- Harrison, R. G. 1998. Linking evolutionary pattern and process. The relevance of species concepts for the study of speciation. En: Howard, D. J. y S. H. Berlocher (eds.). *Endless Forms. Species and Speciation*. Oxford University Press, New York, pp. 3-15.
- Higgie, M. y M. Blows. 2008. The evolution of reproductive character displacement conflicts with how sexual selection operates within a species. *Evolution* 62 (5): 1192-1203.
- Hoskin, C. J. y M. Higgie. 2010. Speciation via species interactions: the divergence of mating traits within species. *Ecology Letters* 13: 409-420.
- Howard, D. J. 1993. Reinforcement: origin, dynamics and fate of an evolutionary hypothesis. En: R. G. Harrison (ed.). *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Oxford University Press, New York. pp. 46-69.
- Kelley, D. B, M. L. Tobias y S. Horng. 2001. Producing and perceiving frog songs: dissecting the neural bases for vocal behaviors in *Xenopus laevis*. En: Ryan, M. (ed.). *Anuran Communication*. Smithsonian Institution Press, Washington y London, pp: 156-166.
- Lea, J., M. Dyson y T. Halliday. 2001. Calling by male midwife toads stimulates females to maintain reproductive condition. *Animal Behaviour* 61: 373-377.
- Lemmon, A. R., C. Smadja y M. Kirkpatrick. 2004. Reproductive character displacement is not the only possible outcome of reinforcement. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 177-183.

- Littlejohn, M. J. 1965. Premating isolation in the *Hyla ewingi* complex (Anura: Hylidae). *Evolution* 19: 234-243.
- Luna-Vega, I. 1994. Los conceptos de especie evolutiva y filogenética. En: Llorente-Bousquets, J. y I. Luna-Vega (eds.). *Taxonomía Biológica*. Ediciones Científicas Universitarias, México, pp. 53-82.
- Marie, C. S. N., R. Butlin, A. Debelle, C. Kerth, R. Snook, *et al.* 2012. What do we need to know about speciation? *Trends in Ecology and Evolution* 27(1): 27-39.
- Noor, M. A. F. 1999. Reinforcement and other consequences of sympatry. *Heredity* 83: 503- 508.
- Panhuis, T. M., R. Butlin, M. Zuk y T. Tregenza. 2001. Sexual selection and speciation. *TRENDS in Ecology and Evolution* 16 (7): 364-371.
- Paterson, H. E. H. 1985. The recognition concept of species. En: E. S. Vrba (ed.). *Species and Speciation*, Transvaal Museum Monograph No. 4. Pretoria, pp. 21-29.
- Pfennig, D. W. y K. S. Pfennig. 2010. Character displacement ant the origins of diversity. *The American Naturalist* 176 (1): S26-S44.
- Pfennig, K. S. y D. W. Pfennig. 2005. Character displacement as the “best of a bad situation”: fitness trade-offs resulting from selection to minimize resource and mate competition. *Evolution* 59 (10): 2200-2208.
- Pfennig, K. S. y M. Ryan. 2006. Reproductive character displacement generates reproductive isolation among conspecific populations: an artificial neural network study. *Proceedings of the Royal Society, Biological Sciences* 273: 1361-1368.
- Pickles, A. y J. Grahame. 1999. Mate choice in divergent morphs of the gastropod mollusc *Littorina saxatilis* (Olivi): speciation in action? *Animal Behaviour* 58: 181-184.
- Prestwich, K. N. 1994. The energetic of acoustic signalling in anurans and insects. *American Zoologist* 34: 625-643.

- Ramsey, J., H. D. Bradshaw y D. W. Schemske. 2003. Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Scrophulariaceae). *Evolution* 57 (7): 1520-1534.
- Ryan, M. J. y M. E. Cummings. 2005. Animal signals and the overlooked costs of efficacy. *Evolution* 59 (5): 1160-1161.
- Ryan, M. J. y A. S. Rand. 1993. Species recognition and sexual selection as a unitary problem in animal communication. *Evolution* 47: 647-657.
- Scearcy, W. A. y E. A. Brenowitz. 1988. Sexual differences in species recognition of avian song. *Nature* 332: 152-154.
- Servedio, M. R. y M. A. F. Noor. 2003. The role of reinforcement in speciation: theory and data. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 34: 339-364.
- Stanley, A. 2001. A history of frog call studies 405 B. C. to 1980. En: Ryan, M. (ed.). *Anuran Communication*. Smithsonian Institution Press, Washington y London, pp. 8-19.
- Steven, E. D. y R. K. Josephson. 1977. Metabolic-rate and body temperature in singing katydid. *Physiological Zoology* 50: 31-42.
- Sullivan, B. K. 1982. Significance of size, temperature and call attributes to sexual selection in *Bufo woodhousei australis*. *Journal of Herpetology* 16 (2): 103- 106.
- Sullivan, B. K. 2009. Mate recognition, species boundaries and the fallacy of “species recognition”. *The Open Zoology Journal* 2: 86-90.
- Templeton, A. R. 1989. The meaning of species and speciation: a genetic perspective. En: Otte D. y J. A. Endler (eds.). *Speciation and Its Consequences*. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, pp. 3-27.
- Turelli, M., N. H. Barton y J. A. Coyne. 2001. Theory and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 16 (7): 330-343.

- Tuttle, M. D y M. J. Ryan. 1982. The role of synchronized calling, ambient light, and ambient noise, in anti-bat-predator behavior of a treefrog. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 11: 125-131.
- Wagner, W. E. 1998. Measuring female mating preferences. *Animal Behaviour* 55: 1029-1042.
- Wells, K. D. 1977. The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour* 25: 666-693.
- Wells, K. 2001. The energetics of calling in frogs. En: Ryan, M. (ed.). *Anuran Communication*. Smithsonian Institution Press, Washington and London, pp. 45-60.
- White, M. J. D. 1978. *Modes of Speciation*. W. H. Freeman and Company, San Francisco. 455 pp.
- Wilczynski, W. y J. Chu. 2001. Acoustic communication, endocrine control, and the neurochemical systems of the brain. En: Ryan, M. (ed.). *Anuran Communication*. Smithsonian Institution Press, Washington and London, pp. 23-35.
- Yamaguchi, A., D. Gooler, A. Herrold, S. Patel y W. W. Pong. 2008. Temperature-dependent regulation of vocal pattern generator. *Journal of Neurophysiology* 100: 3134-3143.
- Zug, G. R. 1993. *Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Academic Press, New York. 527 pp.

## 2. CAPÍTULO I. DESPLAZAMIENTO DE CARACTERES REPRODUCTIVOS EN *Hyla eximia*.

### 2.1 RESUMEN

Poblaciones de especies que ocupan distribución geográfica amplia a menudo son fenotípicamente diversas como consecuencia de variación en presiones selectivas y deriva. Esto aplica en atributos involucrados en la elección de pareja, particularmente cuando la distribución geográfica y la biología reproductiva se superponen entre especies relacionadas. Esta condición puede conducir interferencia de las señales de apareamiento, que a su vez promueve el desplazamiento de caracteres reproductivos (RCD). Investigamos si la variación en el canto de anuncio de la rana arborícola de montaña (*Hyla eximia*) está vinculada a la distribución geográfica con respecto a las principales cuencas hidrológicas mexicanas (Pánuco, Lerma, Balsas y Magdalena), o con la coexistencia con su especie hermana (la rana arborícola de cañón, *Hyla arenicolor*), o con otras especies relacionadas (la rana arborícola enana, *Tlalocohyla smithii*). Encontramos que el espacio acústico multidimensional de los cantos de dos cuencas donde *H. eximia* interactúa actualmente con *T. smithii* (Balsas y Magdalena), fue diferente del espacio acústico de los cantos de *H. eximia* en otra parte. La divergencia discordante de los cantos de *H. eximia* en las dos cuencas separadas donde su distribución geográfica se superpone con *T. smithii* puede ser interpretada como resultado de dos eventos independientes del desplazamiento de caracteres reproductivos, como una consecuencia de la interferencia acústica en los coros reproductivos.

## 2.2 INTRODUCCIÓN

Desde la obra “El origen de las especies”, Darwin consideró que las nuevas especies y la evolución de las diferencias son producto de la selección disruptiva que como consecuencia reduce las interacciones competitivas (Cap. 4, Darwin, 1859). A esto le llamó “El principio de divergencia”. Las interacciones competitivas se incrementan cuando las especies que coexisten comparten similitud morfológica, ecológica, conductual, reproductiva y filogenética (Darwin, 1859; Brown y Wilson, 1956; Grant, 1972). Evidencia posterior indica que la selección natural y selección sexual actúan en éstas interacciones porque son los principales conductores de la especiación (Marie, Curie SPECIATION Network *et al.*, 2012). Es ampliamente conocido que la selección por medio del reforzamiento a través del desplazamiento de caracteres reproductivos logra que las especies conserven sus diferencias manteniéndose reproductivamente aisladas (Dobzhansky, 1951 y Blair, 1955 en Brown y Wilson, 1956; Howard, 1993; Butlin y Ritchie, 1994; Noor, 1999; Turelli *et al.*, 2001; Coyne y Orr, 2004).

El desplazamiento de caracteres reproductivos (RCD), se ve acentuado en las zonas de contacto de especies cercanamente relacionadas (Brown y Wilson, 1956; Howard, 1993), o simplemente de especies que comparten similitud reproductiva, aunque tengan características diferentes (Pfennig y Ryan, 2006). Esto ocurre porque en simpatría los individuos se enfrentan a un individuo heteroespecífico, experimentando un ambiente selectivo diferente al de los coespecíficos en alopatría, por lo que las poblaciones de éstos dos tipos de ambientes tienden a divergir, y la selección sexual aumenta ésta divergencia mediante la evolución de barreras de aislamiento reproductivo, que promueven la especiación (Pfennig y Pfennig, 2010). Así la divergencia puede manifestarse en una característica, lo cual indicaría selección fuerte, o bien en una combinación de características, selección débil (Coyne y Orr 2004, Marie, Curie SPECIATION Network *et al.*, 2012).

En los anuros el canto de anuncio resulta viable para estudiar el efecto de las presiones selectivas, debido a que recaba información del reconocimiento de especie y la calidad de la pareja (Ryan, 1985; Gerhardt, 1992; Cocroft y Ryan, 1995), por lo que



cualquier variación sería reflejo de selección sexual. Además se caracteriza porque varía poco dentro de la especie, denominándolo estereotipado (Gerhardt, 1992). Sin embargo, las especies con distribuciones amplias a menudo carecen de cantos típicos, como una consecuencia de la deriva, adaptación local o interferencia acústica (Pfennig y Pfennig, 2010), y así son buenos candidatos para explorar la influencia de cambios en el paisaje de mosaico en RCD. En este capítulo exploramos si la variación en los cantos de anuncio de la rana arborícola de montaña (*Hyla eximia*) puede ser explicada como una consecuencia de eventos replicados de RCD con especies relacionadas en regiones diferentes de su rango geográfico.

*Hyla eximia* es una rana arborícola relativamente pequeña (aprox. 3 cm de LHC) endémica del complejo geológico del Cinturón Volcánico Trans-Mexicano (TMVB, de Cserna, 1989; Ferrari *et al.*, 2012) y del Altiplano Mexicano adyacente (Duellman, 1970, 2001). Da su nombre al grupo de especies *Hyla eximia* (Smith *et al.*, 2007), el cual incluye once especies (Faivovich *et al.*, 2005). La muy similar *Hyla wrightorum* que reemplaza a *H. eximia* en el norte de México (y dentro de Arizona), *H. euphorbiacea* es ubicada en el sur de TMVB, *H. plicata* es endémica al TMVB y algunas poblaciones son simpátricas con *H. eximia* (Smith *et al.*, 2007), y *H. arenicolor* es simpátrica con *H. eximia* en parte del Altiplano Mexicano (Duellman, 2001). Así como *H. eximia*, *H. arenicolor* también posee una distribución geográfica amplia; en el Altiplano Mexicano se asocia principalmente a zonas montañosas de la cuenca del Balsas, a elevaciones de 300 a 3000 metros (Duellman, 2001). *Tlalocohyla smithii* (anteriormente *Hyla smithii*, Faivovich *et al.*, 2005) es una especie que se distribuye en la tierras bajas del Pacífico a elevaciones cercanas a los 1000 metros, desde el centro de Sinaloa hasta el sur de Oaxaca, y en el interior de la cuenca del Balsas. Principalmente en Jalisco y en el Balsas, *T. smithii* coexiste con *H. eximia*. *T. smithii* no forma parte del grupo *H. eximia*, pero ocupa las mismas pozas de apareamiento que *H. eximia*.

Estudios previos han mostrado evidencia de variación geográfica en el canto de *H. eximia*. En efecto, la variación en la tasa de pulsos, la duración del canto y la frecuencia dominante entre registros de varias poblaciones (Blair, 1960; Sullivan, 1986; Duellman, 1970, 2001) fue lo que llevó a Duellman (2001) a indicar que la especie carecía de un canto

típico, aunque los tamaños por población fueron pequeños. Un estudio basado en la franja altitudinal de 500 m (2400-2900 msnm) donde las distribuciones altitudinales de *H. eximia* e *H. plicata* se sobreponen (Cortés-Soto, 2003), indica que las dos especies utilizaron cantos diferentes en duración y número de pulsos, probablemente para atraer a las hembras coespecíficas y evitar los apareamientos heteroespecíficos, sugiriendo que el RCD ha ocurrido en las zonas de contacto. En este capítulo investigamos si la superposición en la distribución geográfica amplia, con la especie hermana (*Hyla arenicolor*) y la especie relacionada (*Tlalocohyla smithii*) permiten un RCD que pueda explicar la variación en los cantos de anuncio de *H. eximia*.

## **2.3 OBJETIVOS**

### 2.3.1 Objetivo general:

Analizar patrones de variación en las características del canto de anuncio de *Hyla eximia* en gran parte de su distribución geográfica, tanto en poblaciones simpátricas con otras especies de *Hyla* como en zonas alopátricas, a fin de evaluar su papel en el aislamiento reproductivo de esta especie.

### 2.3.2 Objetivos particulares:

- Describir el canto de *H. eximia* y su variación para conocer los atributos cruciales de las señales que preferiblemente facilitan el reconocimiento de pareja.
- Comparar la variación de las características del canto de *H. eximia* con otras especies con las que coexiste en simpatría y con poblaciones alopátricas de la misma especie.
- Determinar si en simpatría está operando el desplazamiento de caracteres reproductivos sobre algún atributo del canto, y si ello explica el mosaico de cantos de *Hyla eximia* reportado por Duellman (2001).

## **2.4 HIPÓTESIS**

La variación geográfica en el canto de *Hyla eximia* es el resultado del desplazamiento de caracteres reproductivos en diferentes zonas de contacto entre esta especie y otras especies congéneres.

## **Predicción**

En zonas simpátricas el canto de anuncio de *Hyla eximia* será diferente comparado con el canto en alopatría. En simpatría aún cuando el canto de *H. eximia* es diferente de la especie con la que coexiste, la divergencia se acentuará dado que es un mecanismo de aislamiento reproductivo.

## **2.5 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.5.1 Elección de las localidades**

Como desconocíamos que especies podían coexistir con *Hyla eximia*, realizamos una revisión de los hílidos mexicanos (Duellman, 2001) y obtuvimos una lista de especies que coincidían en temporada reproductiva y microhábitat con *H. eximia*. Posteriormente, revisamos bases de datos nacionales e internacionales (Anexo 1) y corroboramos la presencia de las especies en el campo (Anexo 2). Una vez ubicadas las especies de estudio, decidimos muestrear nueve poblaciones del Altiplano Mexicano (Cuadro 1, Figura 1), cuatro son poblaciones alopátricas de *H. eximia*, dos corresponden a poblaciones simpátricas con *Hyla arenicolor*, y tres poblaciones simpátricas con *Tlalocohyla smithii*, que previamente pertenecía al género *Hyla* (Faivovich *et al.*, 2005). En este estudio consideramos población simpátrica aquella donde las dos especies están ocupando actualmente el mismo microhábitat (poza de apareamiento). Es así que las dos localidades de *H. arenicolor* y las tres localidades de *T. smithii* corresponden a zonas simpátricas, fueron colocadas así para diferenciarlas de *H. eximia* de las misma población simpátrica.

Cuadro 1. Poblaciones muestreadas de *H. eximia*, *H. arenicolor* y *T. smithii*.

<i>Localidad</i>	<i>Coordenadas</i>	<i>Composición del coro</i>	<i>N</i>
El Realejo, San Luis Potosí.	22° 40' 23.98'' N -100° 25' 5.45'' O	<i>H. eximia</i> alopátrica	26
Laguna de Gerardo, San Luis Potosí.	22° 38' 27.36'' N -100° 26' 20.94'' O	<i>H. eximia</i> alopátrica	29
Sierra de Álvarez, San Luis Potosí.	22° 01' 52.56'' N -100° 36' 49.86'' O	<i>H. eximia</i> alopátrica	15
Playita de San Rafael, Jalisco.	20° 02' 52.98'' N -103° 09' 46.26'' O	<i>H. eximia</i> alopátrica	25
Rancho Santa Elena, Hidalgo.	20° 08' 7.38'' N -98° 30' 43.50'' O	<i>H. eximia</i> simpátrica con <i>H. arenicolor</i>	18
Magdalena, Jalisco.	20° 54' 0.41'' N -103° 59' 36.85'' O	<i>H. eximia</i> simpátrica con <i>T. smithii</i>	20
Presa de Malinaltenango, Edo. de México.	18° 48' 32.01'' N -99° 43' 26.18'' O	<i>H. eximia</i> simpátrica con <i>T. smithii</i>	7
Rancho Santa Elena, Hidalgo.	20° 08' 7.38'' N -98° 30' 43.50'' O	<i>Hyla arenicolor</i>	2
Km 58, San Luis Potosí.	22° 01' 12.18'' N -100° 36' 7.26'' O	<i>Hyla arenicolor</i>	7
Magdalena, Jalisco.	20° 54' 0.41'' N -103° 59' 36.85'' O	<i>Tlalocohyla smithii</i>	12
Presa de Malinaltenango, Edo. de México.	18° 48' 32.01'' N -99° 43' 26.18'' O	<i>Tlalocohyla smithii</i>	5
Tecomatepec, Edo. de México.	18° 50' 9.06'' N -99° 41' 40.62'' O	<i>Tlalocohyla smithii</i>	3

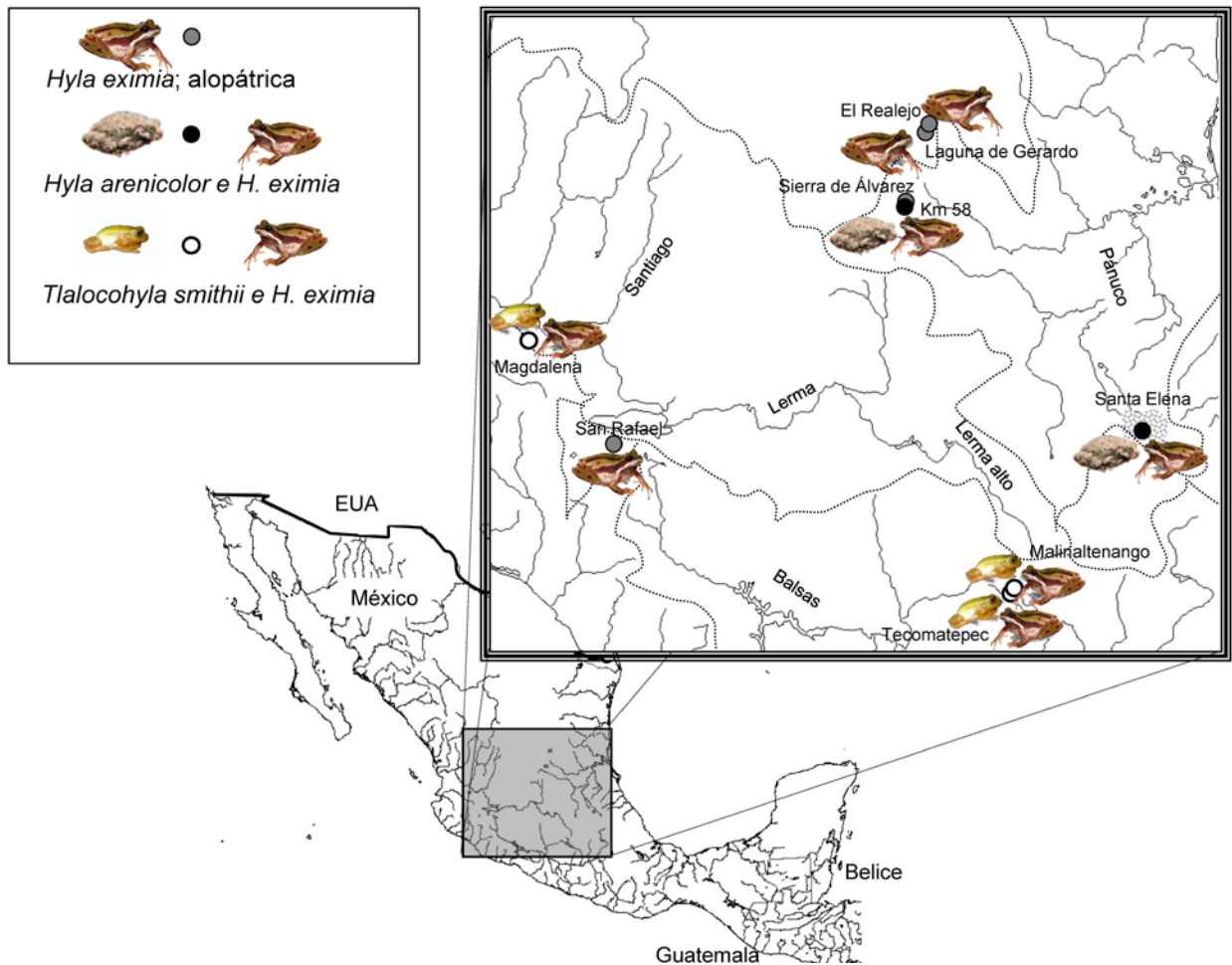


Figura 1. Poblaciones de muestreo de *Hyla eximia*, *Hyla arenicolor* y *Tlalocohyla smithii*. Los círculos grises representan a las poblaciones alopátricas, mientras que los negros corresponden a las simpátricas. Los nombres de las cuencas hidrológicas están indicados sobre los afluentes y los límites son representados con la línea punteada.

### 2.5.2 Registro del canto

Las pozas de apareamiento fueron localizadas de manera visual (día) y auditiva (noche), el registro de los cantos comenzó a partir de las 21 hrs. Aunque la literatura recomienda grabar a los machos ubicados en el centro del coro por ser más competitivos (Schwartz, 2001), los machos de *Hyla eximia* fueron grabados en la orilla de la charca desde donde acostumbrar cantar, agarrados de los pastos que crecen en esa zona.

Los cantos de anuncio fueron registrados con un micrófono direccional Sennheiser™ ME66 conectado a la grabadora digital Marantz™ PMD660. El micrófono fue colocado a una distancia de 1 m de los individuos cantantes y el volumen de la grabación fue nivelado para evitar la saturación (0-6 dB). De ésta manera disminuimos el ruido ambiental y los cantos de los individuos cercanos. Cada registro tenía una duración aproximada de 1-1.5 min con la finalidad de asegurar la obtención de una serie continua de cantos.

Debido a que en organismos ectotermos la temperatura es un factor muy importante que influye en la producción, recepción de la señal acústica y preferencia de las hembras (Narins, 2001), al término de cada grabación el individuo era capturado para medirle la temperatura corporal y registramos la temperatura del substrato. Medimos la temperatura corporal sosteniendo a la individuo de una extremidad posterior y apuntamos hacia su cuerpo con un termómetro infrarrojo digital Extech™ 42529 ( $\pm 0.05$  °C), de ésta manera prevenimos la posible transferencia de calor. Además usando un vernier ( $\pm 0.05$  mm) medimos la longitud hocico cloaca (LHC), que es una característica morfométrica establecida para anfibios.

### **2.5.3 Análisis del canto**

De cada grabación medimos una serie de 10 cantos de anuncio consecutivos, en la medida de lo posible porque generalmente los cantos se superponían con cantos de los individuos cercanos. Decidimos abarcar el mayor número de variables, para asegurarnos de obtener la variación mínima del canto. De cada canto medimos las siguientes propiedades temporales y espectrales (variable, unidad): duración del canto (longitud del canto, considerada desde el inicio hasta el final de la señal, DC, s), intervalo entre cantos (periodo de silencio entre los cantos consecutivos, IC, s), periodo del canto (sumatoria de DC+IC, PC, s), número de pulsos (número de señales cortas que componen el canto, NP, conteo), duración del pulso (longitud desde el inicio hasta el final de cada pulso, DP, s), intervalo entre pulsos (periodo de silencio entre el final de un pulso y el inicio del siguiente, IP, s), amplitud del pulso (la intensidad pico del pulso, AP, V), frecuencia pico del pulso (la energía más alta dentro del pulso, FPP, Hz), periodo del pulso (sumatoria de DP+ IP, PP, s), tasa de pulsos (pulsos por

segundo medidos desde el inicio del primer pulso hasta el inicio del último pulso, TP, Hz), frecuencia dominante (la mayor cantidad de energía depositada en el canto, FD, Hz) y frecuencia fundamental (frecuencia más baja del espectro de poder, tal que las demás frecuencias son múltiplos de ésta, FF, Hz). Los cantos fueron analizados usando Avisoft-SASLab Pro<sup>TM</sup>. La duración y el intervalo entre cantos fueron medidos directamente en el espectrograma, todas las variables del pulso fueron obtenidas mediante la opción *Pulse Train Analysis*, y las medidas de frecuencia fueron obtenidas con la función *Power spectrum logarithmic* (Figura 2). Para obtener la medida por individuo calculamos el promedio de los diez cantos.

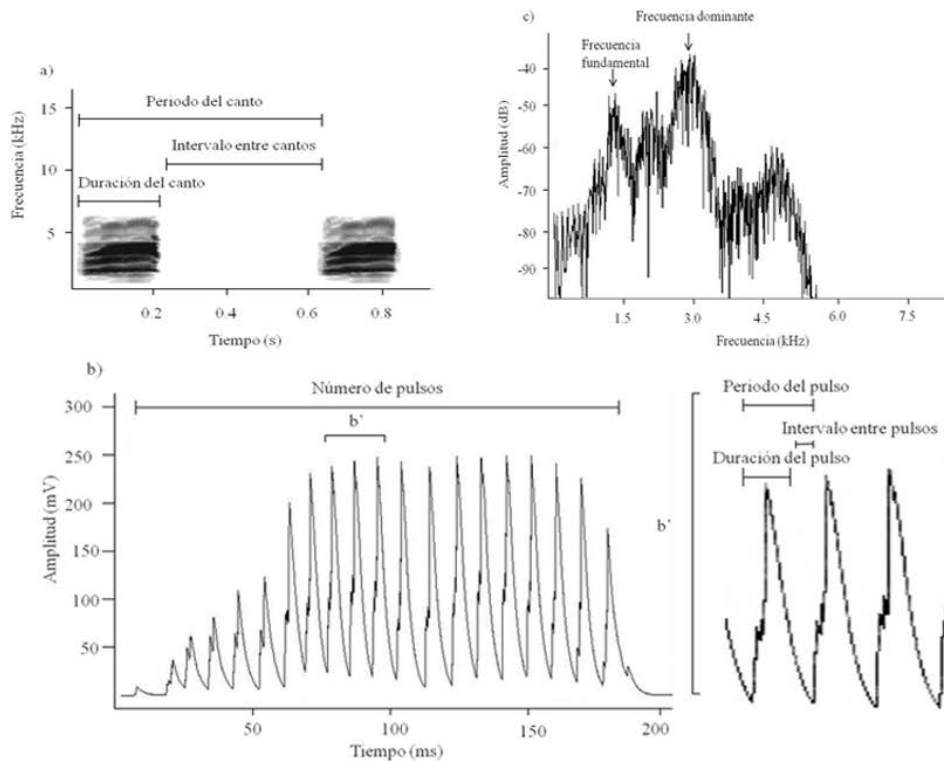


Figura 2. Atributos del canto de anuncio de *Hyla eximia*. a) Espectrograma del canto. b) Análisis de pulsos, b' corresponde a una extensión de tres pulsos para mostrar las propiedades específicas de los pulsos. La amplitud y la tasa de pulsos fueron obtenidas mediante la función: *Pulse Train Analysis*. c) El espectro de poder indica el pico más alto y el armónico básico del canto (frecuencia fundamental).

Dividimos los promedios del canto por composición del coro (zona alopátrica o simpátrica), formando 5 grupos: *H. eximia* alopátrica, *H. eximia* simpátrica con *H. arenicolor*, *H. eximia* simpátrica con *T. smithii*, *H. arenicolor* y *T. smithii*, con la finalidad de detectar diferencias en el canto de las poblaciones de *H. eximia*.

#### **2.5.4 Desplazamiento de caracteres reproductivos**

En los análisis estadísticos, usamos únicamente a los individuos que tenían las medidas completas. Debido a que medimos un total de 12 variables y algunas de ellas podrían estar altamente correlacionadas, decidimos calcular la matriz de correlaciones por composición del coro en el programa JMP versión 7. Una vez identificadas las variables correlacionadas decidimos eliminar aquellas con valores mayores a 0.7.

Debido a que la temperatura es un factor que tiene efecto en las características temporales del canto de los anuros (Blair, 1958; Zweifel, 1959; Zweifel, 1968; Gerhardt y Mudry, 1980; Gayou, 1984; Gerhardt y Huber, 2002), realizamos un análisis de covarianza (ANCOVA) para distinguir si la temperatura corporal en interacción con la composición del coro, tenían efecto en las variables seleccionadas. En el caso de que la interacción tuviera un efecto significativo, usaríamos los residuales de cada característica, con el fin de eliminar cualquier efecto de los factores del modelo (temperatura e interacción) y para cumplir con el supuesto de normalidad. El ANCOVA fue realizado por cada característica, y únicamente con los tres grupos de *H. eximia*. Los datos influyentes fueron eliminados conforme a la distancia de Cook (Crawley, 2007).

Empleamos un análisis de varianza multivariado (MANOVA) con el propósito de descubrir si la variación de la localidad anidada en la composición del coro (zona alopátrica o simpátrica) podría explicarnos la variación en las características del canto de *H. eximia*. Suponiendo que la anidación resultara no significativa, repetiríamos la prueba sólo con el modelo sencillo (sin anidación). Ambos análisis fueron hechos usando el programa R versión 2.15.1 (Development Core Team, 2011).

Usando NCSS<sup>TM</sup> (Hintze, 2007) realizamos un análisis discriminante a partir de los residuales del ANCOVA de *H. eximia*. Empleamos un modelo lineal (ANOVA)



comparando cada función discriminante entre los grupos de *H. eximia*. El propósito de emplear el discriminante, fue obtener los “scores” de la función discriminante para aplicarla a los residuales de *H. arenicolor* y *T. smithii*- previamente obtenidos de las ANCOVAS correspondientes- y graficar los discriminantes para conocer si la comparación del canto de todas las especies, reflejaba desplazamiento de caracteres reproductivos.

## 2.6 RESULTADOS

### 2.6.1 Descripción del canto

Durante la temporada de lluvias del 2011 grabamos un total de 177 individuos, de *Hyla eximia*, *Hyla arenicolor* y *Tlalocohyla smithii*. Sin embargo, como algunos individuos carecieron de ciertos atributos del canto (por ejemplo frecuencia fundamental), la muestra se redujo a 169 registros, 140 correspondientes a *Hyla eximia*, 9 de *Hyla arenicolor* y 20 de *Tlalocohyla smithii*.

El canto de *Hyla eximia* está conformado por una nota corta, pulsada, que es emitida repetidas veces. La duración del canto es menor de la cuarta parte de un segundo ( $0.207 \pm 0.029$ ; promedio  $\pm$  desviación estándar), el intervalo entre cantos es altamente variable, abarca un rango de 0.24 - 1.51 s. El periodo del canto en promedio es de 0.676 s ( $\pm 0.244$ ). Los cantos tienen aproximadamente 18 pulsos ( $\pm 3.919$ ), con duración promedio de 0.005 s ( $\pm 0.001$ ), por lo que son emitidos a intervalos muy pequeños ( $0.011 \pm 0.004$  s). El periodo del pulso tiene un promedio de 0.016 s ( $\pm 0.005$ ). Cada pulso tiene una amplitud promedio de 0.231 V ( $\pm 0.157$ ) y una frecuencia pico de 2439.25 Hz ( $\pm 321.692$ ). La tasa de pulsos es de 84.92 Hz ( $\pm 22.039$ ). La frecuencia dominante es de 2645.332 Hz ( $\pm 370.123$ ) y una frecuencia fundamental de 626.543 Hz ( $\pm 274.021$ ).

*Hyla arenicolor* emite un canto de una nota larga ( $0.883 \pm 0.182$  s), aproximadamente tres veces mayor que la nota *H. eximia*. La nota es producida a un intervalo de 1.59 s ( $\pm 0.473$ ). El número de pulsos ( $22.612 \pm 4.453$ ), la duración de los pulsos ( $0.008 \pm 0.003$  s), el intervalo entre ellos ( $0.04 \pm 0.007$  s) y la amplitud ( $0.37 \pm 0.21$  V) son mayores que los atributos de *H. eximia*. Mientras que la tasa de pulsos es bastante menor ( $24.83 \pm 4.91$  Hz). Los cantos de *H. arenicolor* son producidos a un tono más bajo

que los de *H. eximia* (frecuencia dominante =  $1264.7 \pm 665.94$  Hz; frecuencia pico del pulso =  $1466.572 \pm 660.422$  Hz). Desconocemos los valores de la frecuencia fundamental porque los cantos registrados carecieron de ella (por ello no aparece en el cuadro 2).

El canto de *Tlalocohyla smithii* está formado por dos notas que tienen la misma estructura pero, varían en duración. La primera nota es larga, mientras que la segunda es muy corta, y no existe un orden en la emisión de las notas, aunque el canto generalmente inicia con varias notas largas seguidas de varias notas cortas. Algunos machos producen una tercera nota, diferente en estructura y tiempo a las demás, pero desconocemos si pertenece al canto de anuncio. El análisis sólo incluye datos de la primera nota, porque es el elemento más común, constante en las grabaciones y probablemente es la nota que más interfiere en el canto de *H. eximia*. La primera nota tiene una duración cercana a medio segundo ( $0.469 \pm 0.055$  s). El intervalo entre los cantos es ligeramente mayor a un segundo ( $1.18 \pm 0.923$  s). El número de pulsos ( $23.734 \pm 4.935$ ) es similar al de *H. arenicolor*, cada pulso tiene una duración de 0.005 s y es producido a intervalos cortos ( $0.02 \pm 0.003$ ), con una amplitud de 0.214 Hz ( $\pm 0.152$ ), la frecuencia pico del pulso es alta ( $4315.742 \pm 163.353$  Hz) y la tasa de pulsos de pulsos corresponde a  $48.218 (\pm 7.66)$ . A diferencia de las otras especies, *T. smithii* presenta un canto agudo (frecuencia dominante =  $4450.798 \pm 158.394$  Hz; frecuencia fundamental =  $1914.974 \pm 1514.742$  Hz) casi del doble de *H. eximia* en alopatria. Ejemplos de los cantos de anuncio de las tres especies son mostrados en la Figura 3.

Cuando los cantos de *Hyla eximia* fueron divididos de acuerdo a la composición del coro, observamos que las medidas centrales varían (Cuadro 2). En alopatria, *H. eximia* emite cantos con duración estándar, con menor intervalo entre ellos (Figura 3, b) y con mayor número de pulsos. Los pulsos tienen una duración e intervalo estándar, menor amplitud, pero mayor tasa de pulsos. Las frecuencias dominante y fundamental son estándar. En cambio, cuando *H. eximia* coexiste con *H. arenicolor* el canto es más largo, por lo que el espacio entre cantos es ligeramente mayor. Los atributos del pulso son estándar aunque la amplitud es mayor. Las frecuencias son similares a los valores de la población alopátrica. Un patrón diferente es observado cuando *H. eximia* coexiste con *T. smithii*, los cantos no varían en duración, pero si son producidos a un mayor intervalo. El

número de pulsos es reducido (Figura 3, b), pero la duración, el intervalo y la amplitud son estándar. La frecuencia dominante es notablemente mayor (Figura 3, b), lo mismo que la frecuencia pico del pulso, pero la frecuencia fundamental es registrada con un menor valor.

El coeficiente de variación (CV) muestra porcentajes muy altos en la mayoría de los atributos del canto. Este resultado indicaría una alta heterogeneidad en las variables, pero es bien sabido que el CV depende altamente de la media aritmética (Abdi, 2010), por lo que cuando ésta presenta valores próximos a cero, el CV puede arrojar valores excesivamente altos que no representan la dispersión de los datos, dificultándonos la observación de algún patrón preliminar. La mayoría de los atributos temporales son producidos en tiempos muy cortos, menores de un segundo, por esta razón sus coeficientes de variación fueron tan altos.

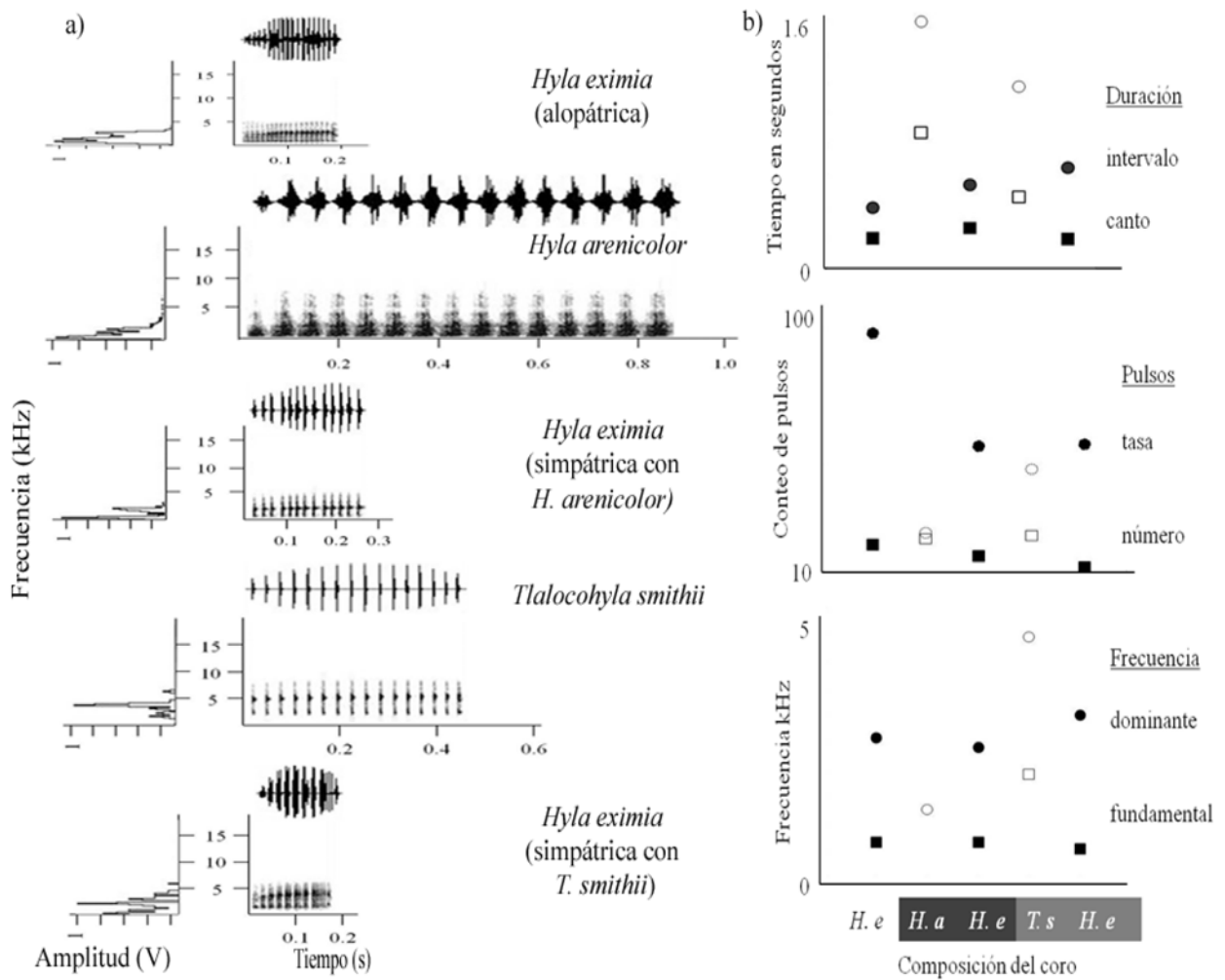


Figura 3. Cantos de anuncio divididos por composición del coro. a) Espectrogramas de los cantos (*Hyla eximia* alopátrica, *Hyla arenicolor*, *H. eximia* simpátrica con *H. arenicolor*, *Tlalocohyla smithii*, *H. eximia* simpátrica con *T. smithii*). b) De arriba hacia abajo, valor promedio de las variables temporales (intervalo entre cantos y duración), variables del pulso (tasa y número de pulsos), y variables de frecuencia (frecuencias dominante y fundamental). En las gráficas el círculo representa a la primera variable, mientras que el cuadrado indica a la segunda, e. g. en la primera el círculo correspondería al intervalo entre cantos, mientras que el cuadrado sería la duración del canto. Los íconos en negro representan a las poblaciones de *H. eximia* y los vacíos corresponden a los heteroespecíficos. El eje X representa a la composición del coro (*Hyla eximia* [*H. e*], *Hyla arenicolor* [*H. a*], *Tlalocohyla smithii* [*T. s*]) y las barras oscuras indican las zonas simpátricas.

Cuadro 2. Estadística descriptiva de los atributos del canto, tamaño y temperatura corporal.

Composición del coro	Medidas															
	centrales	N	LHC	T°C	DC	IC	PC	NP	DP	IP	AP	FPP	PP	TP	FD	FF
<i>Hyla eximia</i> alopátrica	media	95	28.149	17.634	0.199	0.400	0.599	20.435	0.005	0.009	0.183	2380.47	0.014	98.139	2588.055	648.885
	DE		2.426	2.04	0.015	0.123	0.123	1.791	0.000	0.001	0.135	214.789	0.001	9.776	207.149	293.230
	CV		8.618	11.572	7.417	30.826	20.58	8.766	9.148	12.086	73.674	9.023	9.380	9.961	8.004	45.19
<i>Hyla arenicolor</i>	media	9	42.664	19.044	0.883	1.6	2.5	22.613	0.008	0.039	0.368	1466.573	0.047	24.837	1264.664	
	DE		2.999	2.783	0.182	0.473	0.527	4.453	0.003	0.007	0.209	660.422	0.009	4.909	665.993	
	CV		7.029	14.613	20.623	29.583	21.089	19.693	42.701	16.904	56.86	45.032	19.567	19.767	52.662	
<i>H. eximia</i> simpátrica con <i>H. arenicolor</i>	media	18	32.252	14.48	0.267	0.548	0.815	16.133	0.004	0.016	0.437	2257.157	0.021	56.641	2410.722	647.157
	DE		1.734	1.663	0.019	0.133	0.127	1.605	0.000	0.002	0.149	78.782	0.001	5.196	135.292	215.930
	CV		5.376	11.488	7.018	24.344	15.562	9.947	4.587	9.454	34.22	3.490	7.367	9.174	5.612	33.366
<i>Tlalocohyla smithii</i>	media	20	24.523	18.285	0.469	1.18	1.649	23.735	0.005	0.020	0.214	4315.742	0.025	48.218	4450.798	1914.974
	DE		1.299	1.446	0.055	0.923	0.902	4.935	0.000	0.003	0.152	163.353	0.003	7.661	158.394	1514.742
	CV		5.296	7.91	11.714	78.266	54.714	20.793	9.823	16.950	71.076	3.7851	13.410	15.888	3.559	79.1
<i>H. eximia</i> simpátrica con <i>T. smithii</i>	media	27	31.011	19.555	0.196	0.657	0.853	12.066	0.007	0.016	0.261	2767.469	0.023	57.241	3003.269	534.193
	DE		3.197	3.226	0.025	0.416	0.432	2.925	0.002	0.005	0.111	484.714	0.006	15.683	618.164	221.596
	CV		10.311	16.497	12.907	63.282	50.669	24.244	24.963	29.066	42.48	17.515	24.969	27.398	20.583	41.482

Medidas centrales: media, desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV). LHC= longitud hocico cloaca, T°C= temperatura corporal, DC = duración del canto, IC = intervalo entre cantos, PC = periodo del canto (DC+IC), NP = número de pulsos, DP = duración del pulso, IP = intervalo entre pulsos, AP = amplitud del pulso, FPP = frecuencia pico del pulso, PP = periodo del pulso (DP+IP), TP = tasa de pulsos, FD = frecuencia dominante y FF = frecuencia fundamental.

## 2.6.2 Desplazamiento de caracteres reproductivos

### 2.6.2.1 Correlaciones

En el canto de *H. eximia* en alopatría las variables altamente correlacionadas son: amplitud del pulso e intervalo entre cantos (0.997), y periodo del canto e intervalo entre cantos (0.993) (Cuadro 3). El canto de *H. eximia* en simpatría con *H. arenicolor* presenta más variables correlacionadas: periodo del canto e intervalo entre cantos (0.991), tasa de pulsos e intervalo entre pulsos (-0.984), periodo del pulso e intervalo entre pulsos (0.954) y tasa de pulsos y periodo del pulso (-0.953). Las variables correlacionadas en zonas de contacto de *H. eximia* con *T. smithii* fueron: periodo del canto e intervalo entre cantos (0.999), periodo del pulso y duración del pulso (0.996), tasa de pulsos e intervalo entre pulsos (-0.966), frecuencia dominante y frecuencia pico del pulso (0.943) y tasa de pulsos y número de pulsos (0.920) (Cuadro 4).

En el canto de *H. arenicolor* se correlacionan las variables siguientes: tasa de pulsos e intervalo entre pulsos (-0.985), periodo el pulso e intervalo entre pulsos (0.965), tasa de pulsos y periodo el pulso (-0.941) y periodo del canto e intervalo entre cantos (0.917). En *T. smithii* los valores de correlación más altos se presentaron entre: periodo del canto e intervalo entre cantos (0.998), periodo del pulso e intervalo entre pulsos (0.990), tasa de pulsos e intervalo entre pulsos (-0.979) y tasa de pulsos y periodo del pulso (-0.967) (Cuadro 5).

Aunque decidimos usar un criterio de correlación de valores mayores de 0.7, obtuvimos correlaciones arriba de 0.9 que nos permitieron eliminar las siguientes variables: periodo del canto (PC), periodo del pulso (PP), tasa de pulsos (TP), intervalo entre pulsos (IP) y frecuencia pico del pulso (FPP). De tal manera que los análisis subsecuentes fueron realizados únicamente con siete variables: duración del canto (DC), intervalo entre cantos (IC), número de pulsos (NP), duración del pulso (DP), amplitud del pulso (AP), frecuencia dominante (FD) y frecuencia fundamental (FF).

Cuadro 3. Correlaciones de los atributos del canto de *Hyla eximia* en alopatria. Las correlaciones con valores mayores a 0.7 están resaltadas en negritas.

	DC	IC	PC	NP	DP	IP	AP	FPP	PP	TP	FD	FF
DC	1	-0.068	0.051	0.327	-0.047	-0.004	-0.017	-0.044	0.140	-0.463	-0.002	-0.312
IC	-----	1	<b>0.993</b>	-0.282	0.178	-0.002	0.004	-0.239	0.032	-0.219	-0.266	0.050
PC	-----	-----	1	-0.243	0.172	-0.002	0.002	-0.245	0.049	-0.274	-0.267	0.013
NP	-----	-----	-----	1	-0.146	0.095	0.068	0.116	0.080	0.684	0.325	-0.129
DP	-----	-----	-----	-----	1	0.630	0.663	-0.584	-0.047	-0.118	-0.052	0.155
IP	-----	-----	-----	-----	-----	1	<b>0.997</b>	-0.756	-0.015	0.088	0.185	0.067
AP	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1	-0.760	-0.015	0.071	0.178	0.063
FPP	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1	-0.02	0.144	0.424	0.14
PP	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1	-0.032	-0.076	-0.118
TP	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1	0.299	0.125
FD	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1	0.125
FF	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1

DC = duración del canto; IC = intervalo entre cantos; PC = periodo del canto total; NP = número de pulsos; DP = duración del pulso; IP = intervalo entre pulsos; AP = amplitud del pulso; FPP = frecuencia pico del pulso; PP = periodo del pulso; TP = tasa de pulsos; FD = frecuencia dominante; FF = frecuencia fundamental.

Cuadro 4. Correlaciones de los atributos del canto de *Hyla eximia* en simpatria con *Hyla arenicolor* (arriba de la diagonal) y con *Tlalocohyla smithii* (debajo de la diagonal). Las correlaciones con valores mayores a 0.7 están resaltadas en negritas.

	DC	IC	PC	NP	DP	IP	AP	FPP	PP	TP	FD	FF
DC	1	-0.409	-0.282	0.510	0.198	0.239	0.158	0.157	0.204	-0.173	0.043	-0.315
IC	0.627	1	<b>0.991</b>	-0.037	-0.083	-0.218	-0.196	-0.120	-0.200	0.238	0.177	0.083
PC	0.662	<b>0.999</b>	1	0.036	-0.058	-0.194	-0.183	-0.103	-0.180	0.225	0.193	0.041
NP	0.014	-0.614	-0.590	1	0.572	-0.7	0.056	-0.045	-0.698	0.757	0.176	-0.208
DP	-0.05	0.013	0.009	-0.001	1	-0.520	0.083	-0.506	-0.551	0.509	-0.101	0.020
IP	0.527	0.871	0.87	-0.823	-0.065	1	0.082	0.192	<b>0.954</b>	<b>-0.984</b>	-0.204	0.005
AP	-0.129	-0.215	-0.214	0.189	0.426	-0.242	1	-0.256	0.098	-0.078	-0.116	-0.154
FPP	-0.36	-0.807	-0.798	0.726	-0.115	-0.853	0.182	1	0.194	-0.177	0.62	-0.208
PP	-0.064	-0.019	-0.022	0.057	<b>0.996</b>	-0.115	0.426	-0.074	1	<b>-0.953</b>	-0.146	0.000
TP	-0.369	-0.798	-0.79	<b>0.920</b>	0.017	<b>-0.966</b>	0.205	0.817	0.078	1	0.154	0.019
FD	-0.511	-0.840	-0.839	0.620	0.025	-0.861	0.251	<b>0.943</b>	0.057	0.768	1	-0.576
FF	-0.326	-0.254	-0.264	0.170	0.462	-0.315	0.391	0.115	0.489	0.296	0.140	1

DC = duración del canto; IC = intervalo entre cantos; PC = periodo del canto; NP = número de pulsos; DP = duración del pulso; IP = intervalo entre pulsos; AP = amplitud del pulso; FPP = frecuencia pico del pulso; PP = periodo del pulso; TP = tasa de pulsos; FD = frecuencia dominante; FF = frecuencia fundamental.



Cuadro 5. Correlaciones de los atributos del canto de *Hyla arenicolor* (arriba de la diagonal) y de *Tlalocohyla smithii* (debajo de la diagonal). Las correlaciones con valores mayores a 0.7 están resaltadas en negritas. El canto de *H. arenicolor* no presentó frecuencia fundamental, por ello no hay columna de este atributo.

	DC	IC	PC	NP	DP	IP	AP	FPP	PP	TP	FD
DC	1	0.058	0.451	0.496	0.443	0.502	-0.240	-0.44	0.518	-0.387	-0.137
IC	-0.222	1	<b>0.917</b>	-0.315	0.065	0.433	0.384	-0.249	0.339	-0.419	-0.012
PC	-0.208	<b>0.998</b>	1	-0.093	0.236	0.594	0.230	-0.405	0.515	-0.537	-0.082
NP	0.367	-0.038	0.006	1	-0.198	-0.489	0.106	0.131	-0.429	0.606	0.413
DP	0.430	-0.223	-0.206	0.373	1	0.671	-0.330	-0.77	0.842	-0.637	-0.520
IP	-0.264	-0.279	-0.298	-0.803	-0.252	1	-0.228	-0.568	<b>0.965</b>	<b>-0.985</b>	-0.497
AP	-0.045	-0.204	-0.196	0.167	0.376	-0.048	1	0.386	-0.277	0.278	0.583
FPP	0.244	-0.319	-0.305	0.157	-0.034	0.109	-0.131	1	-0.688	0.538	0.805
PP	-0.207	-0.32	-0.337	-0.771	-0.115	<b>0.990</b>	0.005	0.109	1	<b>-0.941</b>	-0.549
TP	0.298	0.276	0.298	0.840	0.265	<b>-0.979</b>	0.056	0.029	<b>-0.967</b>	1	0.526
FD	0.140	-0.250	-0.250	-0.029	-0.137	0.221	-0.094	0.809	0.207	-0.089	1
FF	0.415	-0.337	-0.33	0.154	0.55	-0.030	0.414	-0.145	0.05	0.000	-0.131

DC = duración del canto; IC = intervalo entre cantos; PC = periodo del canto; NP = número de pulsos; DP = duración del pulso; IP = intervalo entre pulsos; AP = amplitud del pulso; FPP = frecuencia pico del pulso; PP = periodo del pulso; TP = tasa de pulsos; FD = frecuencia dominante; FF = frecuencia fundamental.

### 2.6.2.2 ANCOVA *Hyla eximia*

La temperatura corporal y la composición del coro (zona alopátrica o simpátrica) tienen un efecto significativo en la duración del canto (temperatura:  $F= 30.245$ ,  $P < 0.001$ ; composición:  $F= 82.381$ ,  $P < 0.001$ ), el intervalo entre cantos (temperatura:  $F= 10.069$ ,  $P= 0.001$ ; composición:  $F= 82.381$ ,  $P < 0.001$ ) y la frecuencia dominante (temperatura:  $F= 7.799$ ,  $P= 0.006$ ; composición:  $F= 11.609$ ,  $P= 2.268e-05$ ). Así estos factores explican el 71 % ( $R^2= 0.709$ ) de la variación en la duración del canto, el 26 % ( $R^2= 0.261$ ) en el intervalo entre cantos y el 35 % ( $R^2= 0.352$ ) en la frecuencia dominante (Cuadro 6).

La composición del coro interviene significativamente en el número de pulsos ( $F= 189.870$ ,  $P < 2.2 e-16$ ) y la duración del pulso ( $F= 62.815$ ,  $P < 2e-16$ ), explicando el 74 % de la variación en el número de pulsos ( $R^2= 0.741$ ) y el 53 % ( $R^2= 0.533$ ) de la duración del pulso.

La composición del coro y la interacción entre temperatura y composición, afectan significativamente a la frecuencia fundamental. Aunque estos efectos explican un porcentaje muy bajo de la variación en este atributo (11%). Finalmente, ninguno de los efectos principales interviene en la variación de la amplitud del pulso.

### 2.6.2.3 ANCOVA *Hyla arenicolor*

En los análisis de covarianza correspondientes a *H. arenicolor* encontramos que la temperatura corporal, la localidad y la interacción entre estos factores, afectan de manera significativa a la amplitud del pulso (temperatura:  $F= 18.944$ ,  $P= 0.012$ ; localidad:  $F= 8.574$ ,  $P= 0.043$ ; interacción:  $F= 10.184$ ,  $P= 0.033$ ; Cuadro 6), explicando el 91% ( $R^2= 0.911$ ) de la variación en este atributo. Sin embargo todos estos factores no afectan significativamente a la duración del canto, el intervalo entre cantos, la duración del pulso y la frecuencia dominante. Aquí no utilizamos la categoría composición del coro, porque sólo trabajamos con poblaciones simpátricas de *H. arenicolor*, no registramos cantos de poblaciones alopátricas.

La localidad tiene un efecto significativo únicamente en el número de pulsos ( $F= 6.831$ ,  $P= 0.047$ ), explicando el 66% ( $R^2= 0.660$ ) de la variación en este atributo.

#### 2.6.2.4 ANCOVA *Tlalocohyla smithii*

En el canto de *T. smithii*, la temperatura corporal, la localidad, y la interacción afectan significativamente al número de pulsos (temperatura:  $F= 8.126$ ,  $P= 0.013$ ; localidad:  $F= 7.380$ ,  $P= 0.006$ ; interacción:  $F= 9.618$ ,  $P= 0.002$ ; Cuadro 6), explicando el 72% de la variación en este atributo. Ninguno de estos factores tiene efecto alguno en la amplitud del pulso y la frecuencia fundamental. Al igual que con *H. arenicolor*, empleamos la categoría localidad porque las poblaciones estudiadas corresponden a zonas simpátricas con *H. eximia*.

La localidad tiene un efecto significativo en la duración del canto ( $F= 5.579$ ,  $P= 0.018$ ) y la duración del pulso ( $F= 6.646$ ,  $P= 0.010$ ). Este factor explica el 51% ( $R^2= 0.512$ ) de la variación en la primera y el 52% ( $R^2= 0.528$ ) de la variación en la duración del pulso. Mientras que la temperatura afecta significativamente a la frecuencia dominante ( $F= 9.783$ ,  $P= 0.007$ ) y explica el 60% ( $R^2= 0.607$ ) de la variación en este atributo.

La interacción entre localidad y temperatura afecta a la variación en el intervalo entre cantos ( $F= 8.325$ ,  $P= 0.014$ ) En este caso, la interacción explican el 55% ( $R^2= 0.558$ ) de la variación en este atributo.

Cuadro 6. Análisis de covarianza de los atributos de los cantos de *H. eximia*, *H. arenicolor* y *T. smithii*.

	<i>Hyla eximia</i>							<i>Hyla arenicolor</i>		<i>Tlalocohyla smithii</i>				
	DC	IC	NP	DP	AP	FD	FF	NP	AP	DC	IC	NP	DP	FD
<b>T (°C)</b>														
<b>F<sub>(1,0.05)</sub></b>	30.245	10.069	2.714	3.651	0.003	7.799	2.934	5.884	18.943	0.703	0.164	8.126	1.077	9.792
<b>P</b>	<0.001	0.001	0.101	0.058	0.950	0.006	0.089	0.059	0.012	0.416	0.692	0.012	0.318	0.007
<b>CC o L</b>														
<b>F<sub>(2,0.05)</sub></b>	82.381	20.973	189.87	62.814	0.206	11.609	3.279	6.831	8.574	5.579	3.208	7.380	6.646	0.925
<b>P</b>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.814	<0.001	0.040	0.047	0.042	0.017	0.076	0.006	0.01	0.419
<b>T: CC</b>														
<b>F<sub>(2,0.05)</sub></b>	1.264	0.947	0.530	3.041	0.001	2.511	5.427	2.880	10.183	1.152	8.325	9.618	0.003	2.735
<b>P</b>	0.285	0.390	0.589	0.051	0.998	0.085	0.005	0.150	0.033	0.346	0.013	0.002	0.955	0.099

T (°C) = temperatura corporal en centígrados; CC = composición del coro; L = localidad (para el caso de *H. arenicolor* y *T. smithii*).

#### 2.6.2.5 MANOVA

Los resultados del MANOVA indican que la variabilidad del canto es ocasionada por la localidad que a su vez está anidada dentro de la composición del coro ( $F_{4,28} = 5.388$ ,  $P = 4.92e-16$ ). Pareciera que el que los individuos estén en alopatría o simpatria, no interviene en la variación del canto ( $F_{4,14} = 1.48$ ,  $P = 0.119$ ). Para cerciorarnos que la variación del canto dependía únicamente de la localidad decidimos realizar otro MANOVA solo con ese factor. En efecto, encontramos que la variación del canto es ocasionada por la localidad ( $F_{6,42} = 3.914$ ,  $P = 1.663e-14$ ). Considerando que la simpatria actual de las poblaciones de *Hyla eximia* no refleja variación en el canto, decidimos re-analizar los datos basándonos en las principales cuencas hidrológicas, ya que probablemente esta agrupación reflejaría la variación del canto provocada por los múltiples contactos entre las especies a lo largo de la historia evolutiva. Así, los datos quedaron agrupados en cuatro cuencas principales: Pánuco, Lerma, Magdalena y Balsas. El nuevo análisis indicó que la cuenca hidrológica es significativa ( $F_{3,21} = 7.724$ ,  $P < 2e-16$ ), la anidación (localidad dentro de cuenca) no interviene en la variación del canto ( $F_{3,21} = 1.079$ ,  $P = 0.367$ ). Esto sugiere que la

variabilidad en los atributos del canto es ocasionada por la variabilidad en las cuencas hidrológicas y no por la localidad.

#### 2.6.2.6 Análisis discriminante

El análisis de la función discriminante, clasifica correctamente a los individuos de acuerdo a las cuencas hidrológicas con una confiabilidad del 57%. De los seis individuos de *H. eximia* pertenecientes al Balsas, solo el 16.666 % presentó un canto más similar al producido por los individuos de Lerma. En Lerma el 24 % de los individuos se agrupan mejor en la cuenca del Pánuco y 16 % en Magdalena. En Magdalena el 15.789 % de los individuos asemejan sus cantos a los del Pánuco y el 10.526 % a Lerma. En la cuenca del Pánuco, 47.727 % de los individuos cantan como si pertenecieran geográficamente a Lerma, mientras que el 11.363% como si se distribuyeran en Magdalena (Cuadro 7).

A pesar de que existen individuos agrupados incorrectamente, las dos primeras funciones canónicas explican el 99.8% de la varianza del canto y definen el espacio acústico donde los cantos de *H. eximia* en Balsas y Magdalena son diferentes de las otras cuencas (Figura 4). Estas diferencias concuerdan con el análisis de varianza posterior, donde el discriminante 1 mostró diferencias significativas entre cuencas ( $F_{3, 134} = 87.67, P < 0.0001$ ), siendo *H. eximia* de Balsas y Magdalena las que difieren de *H. eximia* de Lerma y Pánuco, incluso Balsas y Magdalena fueron diferentes entre ellas (Cuadro 8, Figura 5). En el discriminante 2 también hubo diferencias entre cuencas ( $F_{3, 134} = 6.84, P = 0.0002$ ; Cuadro 8, Figura 5), siendo Magdalena diferente de Lerma y Pánuco. Sin embargo, el discriminante 3 parece no diferir significativamente en ninguna cuenca ( $F_{3, 134} = 0.18, P = 0.083$ ). Así la función discriminante 1 distingue entre cantos de diferentes cuencas basada en el intervalo entre cantos ( $r = -0.809$ ), duración del canto ( $r = -0.274$ ) y número de pulsos ( $r = 0.254$ ); mientras que la función discriminante 2 discrimina por la frecuencia dominante ( $r = 0.974$ ).

Cuando aplicamos las funciones que discriminan entre cantos de *H. eximia* de las diferentes cuencas a los atributos del canto de *H. arenicolor* y *T. smithii*, observamos que en la cuenca del Balsas la función discriminante de *H. eximia* es completamente diferente a la de *T. smithii* con quien coexiste. Mientras que en Magdalena parte del canto de *H. eximia*

se sobrepone con el de *T. smithii* (Figura 6). En la cuenca del Pánuco, donde se distribuyen *H. eximia* e *H. arenicolor*, parte del canto de *H. arenicolor* se sobrepone con el de *H. eximia*, pero en esta cuenca el canto de *H. eximia* no difirió de las demás.

En resumen, *H. eximia* de la cuenca del Balsas y de Magdalena claramente muestra una divergencia significativa en el intervalo entre cantos, duración del canto, número de pulsos y frecuencia dominante. Siendo evidencia contundente de desplazamiento de caracteres reproductivos, debido a que en ambas cuencas *H. eximia* está en contacto con *T. smithii*. Sin embargo, en la región del Pánuco no observamos diferencias entre *H. eximia* e *H. arenicolor*, a pesar del contacto secundario entre ambas especies.

Cuadro 7. Análisis discriminante. En cada celda se encuentra el porcentaje de individuos predichos de *H. eximia* que pertenecen a cada cuenca hidrológica.

Actual	Predicho				
	Balsas	Lerma	Magdalena	Pánuco	Total
Balsas	83.333	16.666	0	0	99.999
Lerma	0	60	16	24	100
Magdalena	0	10.526	73.684	15.789	99.999
Pánuco	0	47.727	11.363	40.909	99.999

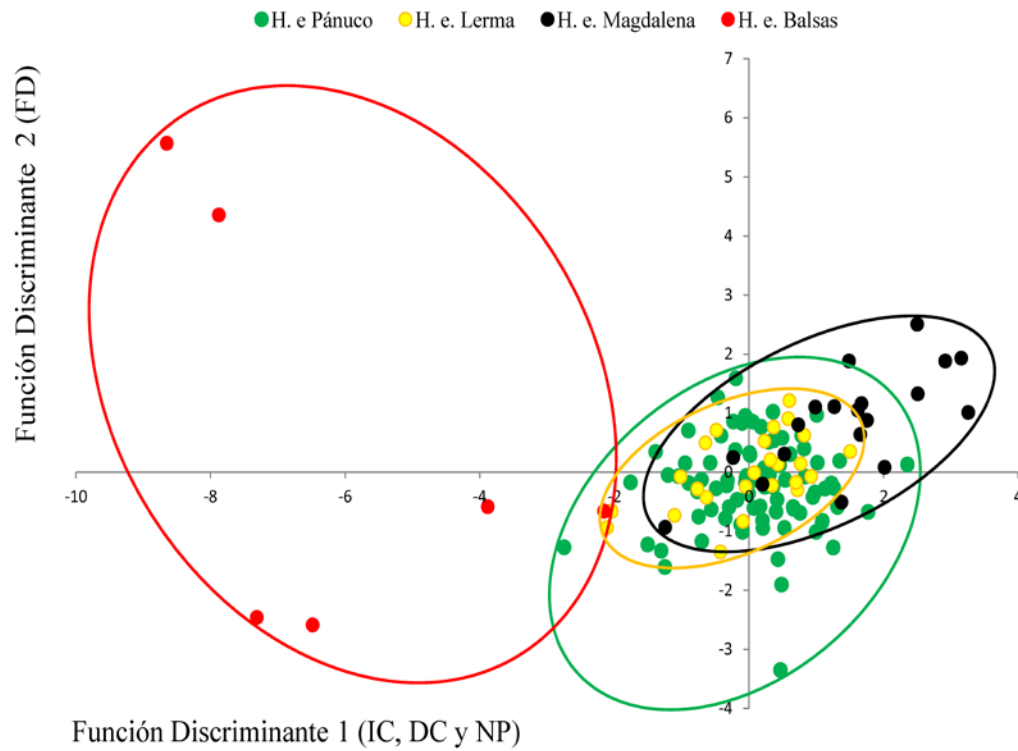


Figura 4. Comparación de las funciones discriminantes 1 y 2 entre las cuencas hidrológicas de *H. eximia*. La función discriminante 1 está conformada por intervalo entre cantos (IC), duración del canto (DC) y número de pulsos (NP), mientras que la función discriminante 2 está representada solo por la frecuencia dominante (FD).

Cuadro 8. Comparación entre cuencas de las funciones discriminantes del canto de *H. eximia*. Los asteriscos indican las comparaciones que resultaron significativamente diferentes.

<b>Cuenca</b>	<b>Función Disc. 1</b>		<b>Función Disc. 2</b>	
	Diferencia	<i>P</i>	Diferencia	<i>P</i>
Lerma-Balsas	6.020	0.000*	-0.615	0.530
Magdalena-Balsas	7.540	0.000*	0.251	0.950
Pánuco-Balsas	6.166	0.000*	-0.828	0.206
Magdalena-Lerma	1.520	0.000*	0.866	0.025*
Pánuco-Lerma	0.146	0.917	-0.213	0.782
Pánuco-Magdalena	-1.374	0.000*	-1.079	0.0002*



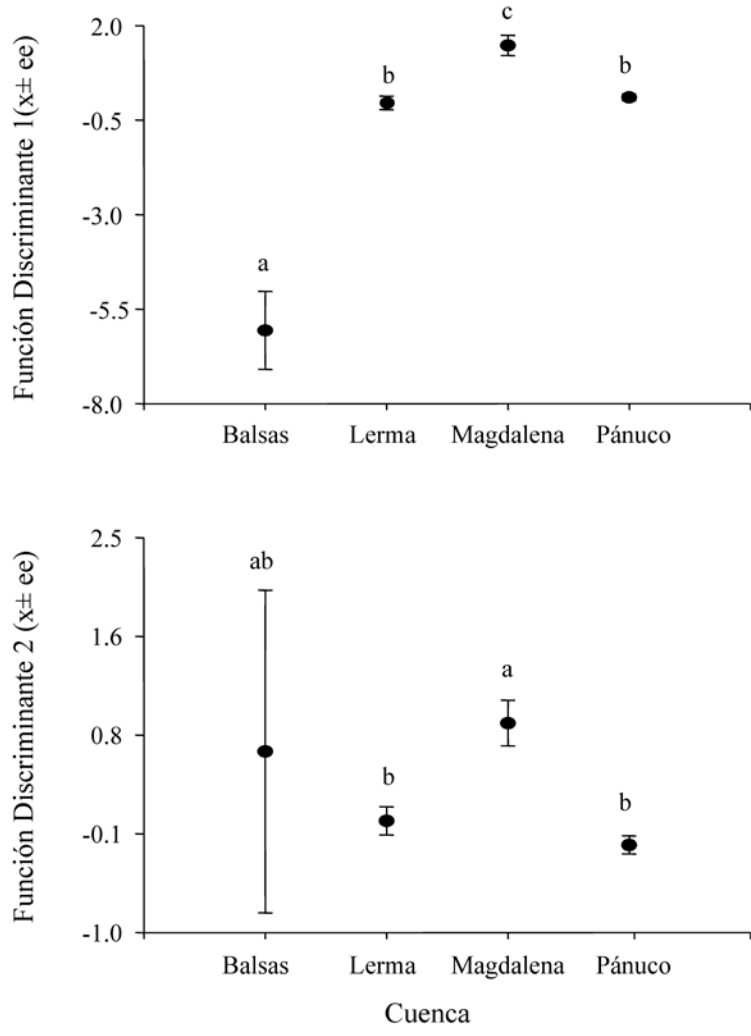


Figura 5. Funciones discriminantes de *H. eximia* por cuenca. Las diferencias significativas están indicadas por las letras ubicadas arriba de las barras. Los puntos representan a la media y las barras el error estándar.

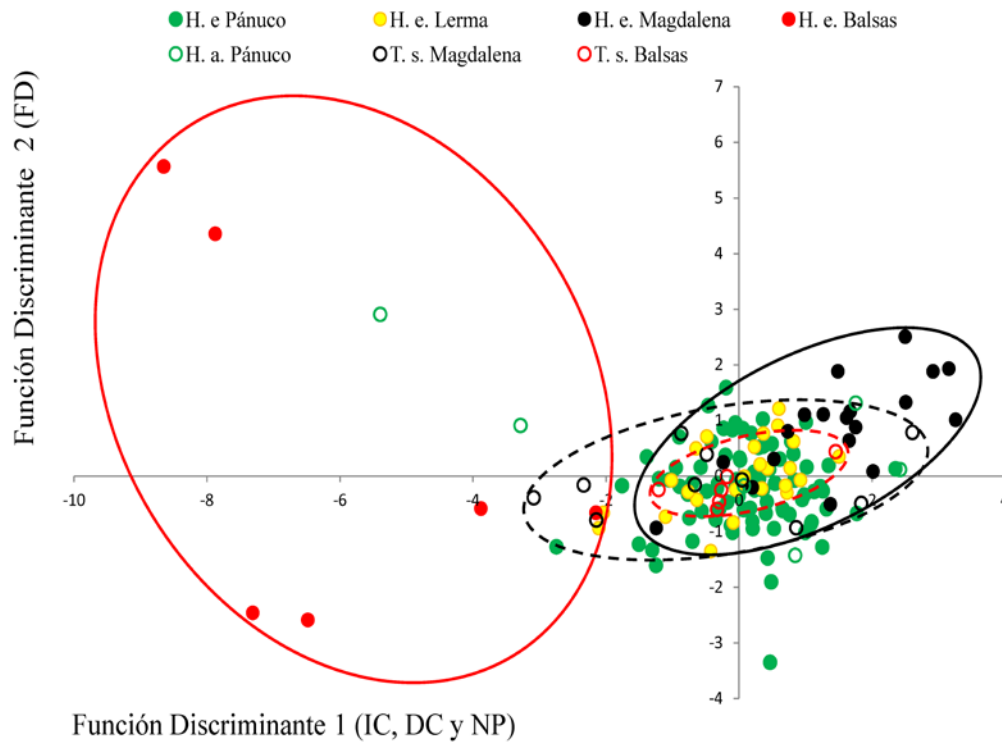


Figura 6. Comparación de las funciones discriminantes 1 y 2 entre las cuencas hidrológicas de *H. eximia* (H. e), *H. arenicolor* (H. a) y *T. smithii* (T. s). La función discriminante 1 está conformada por intervalo entre cantos (IC), duración del canto (DC) y número de pulsos (NP), mientras que la función discriminante 2 está representada solo por la frecuencia dominante (FD).

## 2.7 DISCUSIÓN

### 2.7.1 Descripción del canto

Los promedios de cada atributo del canto denotan una variación intraespecífica en el canto de anuncio de *Hyla eximia* que se acentúa en las zonas de contacto. En alopatria los cantos se caracterizan por tener un alto número de pulsos (20.435, promedio) y una alta tasa de pulsos (98.139). El canto de *H. eximia* en simpatria con *H. arenicolor*, muestra una duración más larga (0.267), mientras que el número de pulsos (16.133) y la tasa de pulsos

(56.641) disminuyen. En simpatría con *Tlalocohyla smithii* la duración entre los cantos aumenta (0.657), el número (12.066) y la tasa de pulsos (57.241) también disminuyen; sobre todo hay un aumento considerable en la frecuencia pico del pulso (2767.469) y la frecuencia dominante (3003.269).

La variación intraespecífica en los atributos del canto de anuncio de *H. eximia* y de las especies del grupo *H. eximia* es común (e. g. Blair, 1960; Sullivan, 1986; Klymus *et al.*, 2010), pero su origen y significado biológico aún no ha sido completamente comprendido. Un estudio exhaustivo sobre la variación del canto, abarcando la distribución geográfica amplia de *H. arenicolor*, reveló que las diferencias (en el número de pulsos, periodo del canto y frecuencia pico; Klymus *et al.*, 2010) no son suficientes para promover la especiación, aunque existe un grado concordante en las preferencias de apareamiento a escalas geográficas grandes (Klymus *et al.*, 2012). Sin embargo, al menos un poco de la variación del canto puede estar ligada a la hibridación introgresiva con especies del grupo *H. eximia* (en particular con *H. wrightorum*; Klymus *et al.*, 2010). Dentro del grupo *H. eximia*, tres poblaciones de *H. wrightorum* presentan variación en la frecuencia dominante y al menos dos difieren en la duración del canto (Gergus *et al.*, 2004). La tasa de pulsos es un atributo involucrado a menudo en el reconocimiento de pareja de estas ranas arborícolas (e. g. Klymus *et al.*, 2012), esta característica no difiere entre poblaciones de *H. wrightorum*, por lo que es poco probable que promueva el aislamiento reproductivo (aunque notamos que las diferencias en la frecuencia dominante pueden reflejar adaptación local para facilitar la transmisión [Littlejohn, 1971] y podrían permitir un apareamiento concordante).

La variación en los cantos de anuncio de *H. eximia* ha sido estudiada con menos detalle. Blair (1960) clasificó algunas poblaciones como de “canto lento” (50 pulsos por segundo) o “canto rápido” (100 pulsos por segundo). El estudio de Blair no exploró el posible origen de dicha variación, pero actualmente sabemos que dos de las poblaciones que categorizó como de canto lento, corresponden a zonas donde *H. eximia* es simpátrica con *T. smithii*; en estas zonas registramos canto con tasa de pulsos baja, frecuencia pico del pulso y dominante relativamente altas. En efecto, los cantos de los individuos registrados en simpatría con *T. smithii* fueron más variables (promedio CV= 32%) que los cantos de *H.*

*eximia* registrados en otra parte (Cuadro2, Figuras 6, 8 y 9). Es poco probable que esto se deba a un tamaño de muestra pequeño, ya que está basado en un tamaño de muestra mayor que el usado para estimar la variación en los atributos del canto producidos por *H. eximia* en simpatria con *H. arenicolor*. En los machos de *H. eximia* que se anuncian en medio de los coros de *T. smithii*, sus cantos podrían quedar enmascarados por la nota larga, la corta o ambas (recordemos que el canto de *T. smithii* está conformado por dos notas). Esto podría generar variación en el intervalo de cantos de *T. smithii* permitiendo subsecuentemente una alta variación en el intervalo entre cantos de *H. eximia*, lo cual puede explicar por qué el coeficiente de variación en este atributo es el valor más alto en esta zona simpátrica (Cuadro2). Las notas largas de *T. smithii* son por sí mismas altamente variables (Cuadro2) y aunque no medimos las notas cortas, las cuales parecen ser producidas cuando el coro es pequeño, también parecen ser muy variables. Es posible que no haya un mejor canto para superar cada interferencia acústica, y proponemos que esto explica los valores altos del CV de los cantos de *H. eximia* en esa zona de contacto.

No podemos indicar un vínculo entre el tipo de variable (temporal, frecuencia, estructural) y la cantidad de variación que contienen (Cuadro 2), pero la frecuencia pico del pulso, frecuencia dominante, duración del canto y duración del pulso fueron las características menos variables del canto de *H. eximia*, y tal vez podrían ser elementos útiles para el sistema de reconocimiento de especies.

### **2.7.2 Desplazamiento de caracteres reproductivos**

Las correlaciones obtenidas entre las variables el canto de *H. eximia* fueron detectadas principalmente entre el PC e IC, PP e IP, FPP y FD. Claramente estas variables mantienen una relación que ocasiona la dependencia entre ellas, la variación que es explicada por una está incluida en la variación de la otra. Esperábamos valores de correlación alta entre estas variables porque, por ejemplo, el PC es la suma de la DC más el IC, lo que implica que si un individuo de *H. eximia* produce cantos con duración promedio pero a mayores intervalos, el incremento en el IC se reflejaría en el periodo del canto. En los cantos de *H. arenicolor* y *T. smithii* las variables correlacionadas concuerdan con las observadas en *H. eximia*, lo cual era de esperarse dado que en las ranas arborícolas se sabe que las

correlaciones en los atributos del canto dependen de aspectos morfológicos como los componentes de la laringe (McClelland, 1996), ocasionando similitud estructural entre las notas y un canto aparentemente sencillo (comparado con el canto complejo de las aves).

La variación significativa entre las funciones discriminantes de las poblaciones de *H. eximia*, fue encontrada en el IC, DC, NP (Función 1) y FD (Función 2). El número de pulsos estuvo correlacionado altamente con la TP (e. g. *H. eximia* en contacto con *T. smithii*: 0.9204), ésta última característica junto con la FD juegan un papel importante en el reconocimiento (Littlejohn, 1965; Gerhardt y Davis, 1988; Gerhardt, 1994) y discriminación de pareja de otros hílidos (e. g. *Dendropsophus ebraccatus* [*Hyla ebraccata*], Wollerman, 1998). Aunque no existen estudios previos que hayan trabajado con la elección de pareja de *H. eximia*, en *H. arenicolor* se conoce que las hembras eligen en base a la TP, logrando discriminar entre machos de clados diferentes (Klymus *et al.*, 2012). Por lo tanto la TP es un atributo clave para promover el aislamiento entre linajes de *H. arenicolor* y probablemente también permite (a través de la correlación con NP) el aislamiento reproductivo entre poblaciones de *H. eximia*. Mientras que la DC e IC, aunque son características temporales que reflejan el esfuerzo del canto y las diferencias en el costo energético, dependen más del tamaño corporal del individuo (Gerhardt, 1994). En las poblaciones de *H. eximia* no encontramos diferencia en el tamaño corporal, así probablemente estas características varían como una estrategia de evitar la interferencia, para asegurar la emisión de la señal.

Por otra parte, la FD es un atributo del canto con poca o nula variación, llevándolo a la clasificación de característica estática (Gerhardt, 1991). Como mencionamos previamente, los atributos del canto dependen de varias estructuras del cuerpo, tamaño de los músculos, estructura de la laringe, etc. (Duble y Rand, 1991; McClelland, 1996; Wells, 2001; Gerhardt y Huber, 2002), y cualquier cambio en los atributos del canto implicaría un gasto energético alto, de tal manera que la divergencia observada en la FD debe ser resultado de una presión selectiva fuerte, para asegurar que las hembras elijan a la pareja coespecífica.

Las funciones discriminantes indicaron que *H. eximia* del Balsas y Magdalena produce cantos diferentes de los de *H. eximia* de Lerma y Pánuco. Esperábamos divergencia del canto en la cuenca donde *H. eximia* coexiste con *H. arenicolor*, aunque ésta última es la especie hermana con quien comparte menor similitud morfológica, son especies que pertenecen al mismo grupo filogenético y ocupan las mismas pozas de apareamiento, por lo que la competencia por parejas debería ser mayor, pero no fue así. Dado que la parte sur del Pánuco es una zona donde coinciden las tres especies hermanas del grupo *H. eximia* (*H. eximia*, *H. arenicolor* e *H. plicata*) deducimos que en la cuenca del Pánuco, *H. eximia* ha estado en contacto con *H. arenicolor* durante un periodo de tiempo largo, permitiéndole mantener los atributos del canto como las otras *H. eximia* de Lerma. Probablemente el contacto entre *H. eximia* y *T. smithii* en Balsas y Magdalena sea más reciente que con la especie hermana, permitiéndonos detectar la barrera de aislamiento conductual en el canto. Debido a que parte de la función discriminante del canto de *H. eximia* en la cuenca de Magdalena se sobrepone con el canto de *T. smithii*, suponemos que la expansión de la distribución de *H. eximia* hacia el Balsas probablemente es más reciente que la expansión hacia Magdalena, pero esto lo discutiremos más adelante cuando analicemos las filogenias en el capítulo III.

El hecho de que el canto de *H. eximia* en Balsas y Magdalena fuera diferente, muy probablemente se debe a que en estas cuencas coexiste con *T. smithii*. Notablemente en el Balsas el desplazamiento de caracteres reproductivos se acentúa más que en Magdalena. Previamente mencionamos que la interferencia acústica del canto de *T. smithii* podía ser responsable de la variación en algunos atributos de canto de *H. eximia*. Las notas del canto de *T. smithii* pueden enmascarar fácilmente el canto de *H. eximia*, al ser más largas y con mayor frecuencia dominante, impiden que los cantos de *H. eximia* puedan ser escuchados por las hembras coespecíficas. En Magdalena los machos de *H. eximia* no sólo se enfrentan a la interferencia acústica provocada por *T. smithii*, también tienen que lidiar con *Gastrophryne* sp., que al ser una rana de tamaño corporal mayor emite cantos extremadamente largos y graves (Duellman, 2001), por lo que el espacio acústico disponible para que *H. eximia* varíe su canto es estrecho (Figura 7). Por el contrario, en el Balsas *H. eximia* sólo compite con *T. smithii*, por lo que dispone de mayor espacio acústico

(Figura 8), produciendo cantos más largos (0.223 s, promedio), con mayor intervalo entre cantos (1.282, promedio), menor número de pulsos (9, promedio), y un amplio rango de frecuencias (aprox. de 1198-2830 Hz, ver Figura 5) que los de Magdalena (duración= 0.185, promedio; intervalo= 0.437, no. de pulsos= 13 y rango de frecuencias= 3115-3611 Hz). Probablemente la interferencia acústica con otras especies conlleva a que la función discriminante de *H. eximia* en Magdalena se sobreponga con la de *T. smithii*.

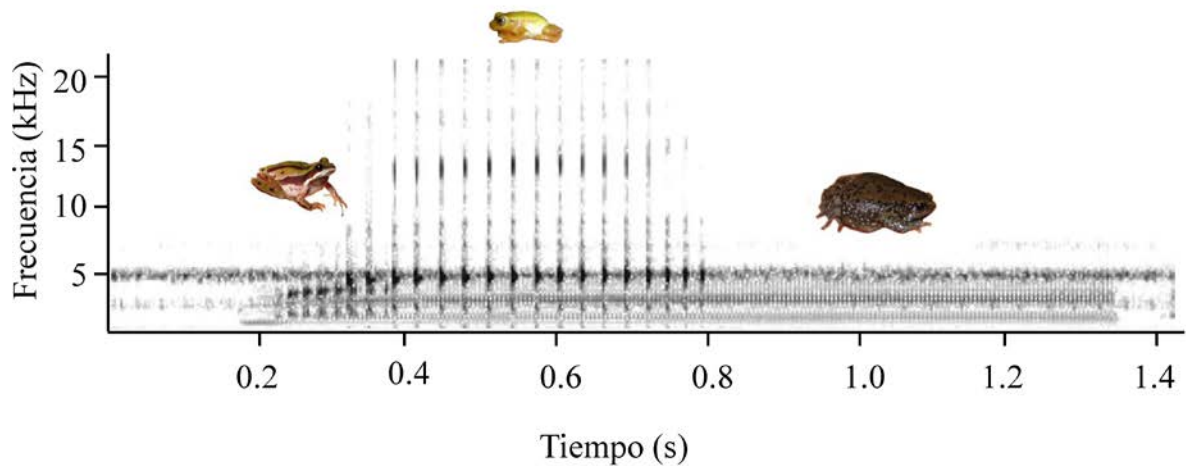


Figura 7. Espectrograma de cantos sobrepuestos en Magdalena. Observe que el canto de *Hyla eximia* (canto más corto, ubicado a la izquierda) queda enmascarado por el canto de *Tlalocohyla smithii* (canto de mayor frecuencia, ubicado en el centro) y por el de *Gastrophryne sp.* (canto grave con mayor duración, ubicado a la derecha).

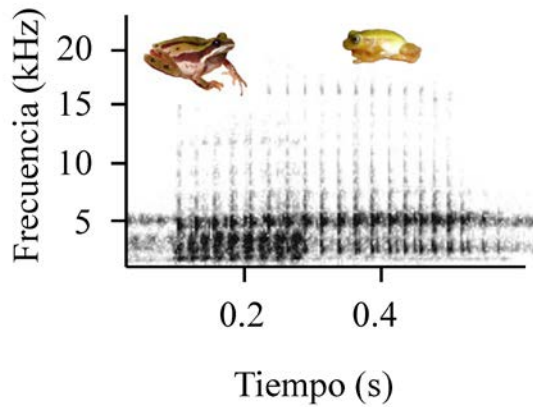


Figura 8. Espectrograma de cantos sobrepuestos en Balsas. En esta cuenca el canto de *H. eximia* (canto corto, ubicado a la izquierda) también queda enmascarado por el canto de *T. smithii* (canto de mayor frecuencia, ubicado a la derecha). Note el canto de *H. eximia* es más largo y abarca un rango más amplio de frecuencias que el canto en Magdalena.

En algunos casos, la composición del coro puede ser un factor determinante en la divergencia del canto, la especie más dominante en la charca tiene más oportunidades de interceptar a las hembras de la otra especie (Gerhardt y Huber, 2002). Durante las dos temporadas reproductivas que visitamos Magdalena y Balsas observamos que el número de individuos era diferente en ambas cuencas, en Magdalena la proporción de individuos de *H. eximia* es equivalente a la de *T. smithii*, mientras que en Balsas la especie dominante es *T. smithii*. Sin embargo, descartamos que la dominancia influya en la variación del canto de nuestras poblaciones, puesto que el RCD ocurrió en las dos cuencas. Además en un estudio de corta duración no podemos asegurar la dominancia de la especie, ya que la proporción de individuos en la charca es sensible a los cambios temporales y a la variación en la precipitación anual y local (Marsh, 2000), no necesariamente la especie que domina en una temporada es la misma que domina la temporada próxima.

La similitud morfológica entre las especies también puede contribuir a la divergencia de algún atributo para evadir los apareamientos cruzados. La similitud morfológica entre *H. eximia* y *T. smithii* es mayor, que entre *H. eximia* e *H. arenicolor*. *H. arenicolor* alcanza un tamaño corporal mayor (machos LHC= 51.2 mm [máxima]; hembras LHC= 57.1mm) que



*H. eximia* (machos LHC= 35 mm; hembras LHC= 36.2 mm) y posee una piel rugosa; mientras que *T. smithii* es una rana pequeña con menor longitud hocico cloaca (machos LHC= 26 mm, hembras LHC= 30.8 mm) que *H. eximia*, y al igual que ésta presenta una piel lisa (Duellman, 2001). Los machos de *T. smithii* son más pequeños que las hembras de *H. eximia*, característica que haría factible el entrecruzamiento, tal como sugiere Klymus *et al.* (2010) para explicar la hibridación introgresiva entre *H. wrightorum* e *H. arenicolor*. La interferencia acústica y la similitud morfológica entre *H. eximia* y *T. smithii*, son factores que probablemente los han dirigido hacia el desplazamiento de caracteres reproductivos.

En conclusión, la variación del canto de *H. eximia* ocurre como resultado del desplazamiento de caracteres reproductivos ocasionado en las cuencas hidrológicas que comparte con la especie relacionada, *T. smithii*. La interferencia acústica provocada por la notas largas y con alta frecuencia de *T. smithii* provocan que el canto de *H. eximia* quede enmascarado, dificultando su transmisión hacia las hembras coespecíficas. Aducimos que la similitud morfológica entre estas especies también ha sido un factor importante en la divergencia del canto.

## Literatura citada

- Abdi, H. 2010. Coefficient of variation. Encyclopedia of Research Design. SAGE Publications, Inc., Thousand Oaks, CA, pp. 169-171.
- Blair, W. F. 1958. Mating call in the speciation of anuran amphibians. *The American naturalist* 92 (862): 27-51.
- Blair, W. F. 1960. Mating call as evidence of relations in the *Hyla eximia* group. *Southwestern Naturalist* 5 (3):129-135.
- Brown, W. L. y E. O. Wilson. 1956. Character Displacement. *Systematic zoology* 5: 49-64.
- Butlin, R. K y M. G. Ritchie. 1994. Behavior and speciation. En: Slater, P. J. B y T. R. Halliday (eds.). Behaviour and Evolution. Cambridge University Press, New York, pp. 43-79.
- Cocroft, R. B. y M. Ryan. 1995. Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. *Animal Behaviour* 49: 283- 303 pp.
- Cortés-Soto, G. 2003. Diferenciación en el canto de *Hyla eximia* e *Hyla plicata* en zonas de simpatria. Tesis Profesional. Universidad Autónoma del Estado de México, 25 pp.
- Coyne, J. A. y H. A. Orr. 2004. Speciation. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, U. S. A. 545 pp.
- Crawley, M. J. 2007. The R book. John Wiley & Sons, Ltd. England. 942 pp.
- Darwin, C. 1859. On the origin of species. En: Wilson, E. O. (ed.). From so Simple a Beginning. The four great books of Charles Darwin . W. W. Norton and Company Inc, New York, pp. 437-764.
- de Cserna, Z. 1989. An outline of the geology of Mexico. En: Bally, A. W y A. R. Palmer (eds.). The Geology of North America- An Overview. Geological Society of North America, Colorado, U.S.A., 233-264 pp.
- Dubley, R. y A. S. Rand. 1991. Sound production and vocal sac inflation in the Túngara frog, *Physalaemus pustulosus* (Leptodactylidae). *Copeia* (2): 460-470.

- Duellman, W. E. 1970. Hylid frogs of Middle America. Monograph Museum of Natural History University of Kansas. 1, i–xi, 1–753 pp.
- Duellman, W. E. 2001. Hylid frogs of Middle America. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Lawrence, Ks.
- Faivovich, J., C. F. B. Haddad, P. C. A. Garcia, D. R. Frost, J. A. Campbell y W. C. Wheeler. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylineae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 294: 1-240.
- Ferrari, L., T. Orozco-Esquivel, V. Manea y M. Manea. 2012. The dynamic history of the Trans-Mexican Volcanic Belt and the Mexico subduction zone. *Tectonophysics* 522– 523:122–149.
- Gayou, D. G. 1984. Effects of temperature on the advertisement call of *Hyla versicolor*. *Copeia* (3): 733-738.
- Gerhardt, H. C. 1991. Female mate choice in treefrogs: static and dynamic criteria. *Animal Behaviour* 42: 615-635.
- Gerhardt, H. C. 1992. Multiple messages in acoustic signals. *Seminars in The Neurosciences* 4: 391-400.
- Gerhardt, H. C. 1994. Reproductive character displacement of female mate choice in the grey treefrog, *Hyla chrysoscelis*. *Animal Behaviour* 47: 959-969.
- Gerhardt, H. C y M. S. Davis. 1988. Variation in the coding of species identity in the advertisement calls of *Litoria verreauxi* (Anura: Hylidae). *Evolution* 42 (3): 556-565.
- Gerhardt, H. C y K. M. Mudry. 1980. Temperature effects on frequency preferences and advertisement call frequencies in the treefrog, *Hyla cinerea* (Anura: Hylidae). *Journal of Comparative Physiology* 137: 1-6.
- Gergus, E. W. A., T. W. Reeder y B. K. Sullivan. 2004. Geographic variation in *Hyla wrightorum*: advertisement calls, allozymes, mtDNA, and morphology. *Copeia* (4): 758-769.

- Grant, P. R. 1972. Convergent and divergent character displacement. *Biological Journal of the Linnean Society* 4: 39-68.
- Hintze, J. 2007. NCSS 2007. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA.
- Howard, D. J. 1993. Reinforcement: origin, dynamics and fate of an evolutionary hypothesis. En: Harrison R. G. (ed.). *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Oxford University Press, New York, pp. 46-69.
- Klymus, K. E. y H. C Gerhardt. 2012. AFLP markers resolve intra-specific relationships and infer genetic structure among lineages of the canyon treefrog, *Hyla arenicolor*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 654-667.
- Klymus, K. E., S. C. Humfeld, V. T. Marshall, D. Cannatella y H. C. Gerhardt. 2010. Molecular patterns of differentiation in canyon treefrogs (*Hyla arenicolor*): evidence for introgressive hybridization with the Arizona treefrog (*Hyla wrightorum*) and correlations with advertisement call differences. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 1425-1435.
- Littlejohn, M. J. 1965. Premating isolation in the *Hyla ewingi* complex (Anura: Hylidae). *Evolution* 19: 234-243.
- Littlejohn, M. J. 1971. A reappraisal of mating call differentiation in *Hyla cadaverina* (= *Hyla californiae*) and *Hyla regilla*. *Evolution* 25 (1): 98-102.
- Marie, C. S. N., R. Butlin, A. DeBelle, C. Kerth, R. Snook, *et al.* 2012. What do we need to know about speciation? *Trends in Ecology and Evolution* 27(1): 27-39.
- Marsh, D. M. 2000. Variable responses to rainfall by breeding Tungara frogs. *Copeia* (4): 1104- 1108.
- McClelland, B. E., W. Wilczynski y M. Ryan. 1996. Correlations between call characteristics and morphology in male cricket frogs (*Acris crepitans*). *The Journal of Experimental Biology* 199: 1907- 1919.

- Narins, P. 2001. Ectothermy's last stand. Hearing in the heat and cold. En: Ryan, M. J. (ed.). Anuran Communication. Smithsonian Institution Press, Washington and London, pp.61-70.
- Noor, M. A. F. 1999. Reinforcement and other consequences of sympatry. *Heredity* 83: 503- 508.
- Pfennig, D. W y K. S. Pfennig. 2010. Character displacement and the origins of diversity. *The American Naturalist* 176 (S1): S26-S44.
- Pfennig, K. S. y M. J. Ryan. 2006. Reproductive character displacement generates reproductive isolation among conspecific populations: an artificial neural network study. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 273: 1361-1368.
- R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL. <http://www.R-project.org/>.
- Ryan, M. 1985. The Túngara Frog. A Study in Sexual Selection and Communication. The University of Chicago Press, Chicago y London. 230 pp.
- Schwartz, J. J., B. W. Buchanan, H. C. Gerhardt. 2001. Female mate choice in the gray treefrog (*Hyla versicolor*) in three experimental environments. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 49: 443-455.
- Smith, S. A., A. Nieto Montes de Oca, T. W. Reeder y J. J. Wiens. 2007. A phylogenetic perspective on elevational species richness patterns in Middle American treefrogs: why so few species in lowland tropical rainforests? *Evolution* 61: 1188- 1207.
- Sullivan, B. K. 1986. Advertisement call variation in the Arizona tree frog, *Hyla wrightorum* Taylor, 1938. *Great Basin Naturalist* 46: 378-381.
- Turelli, M., N. H. Barton y J. A. Coyne. 2001. Theory and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 16 (7): 330-343.
- Wollerman, L. 1998. Stabilizing and directional preferences of female *Hyla ebraccata* for calls differing in static properties. *Animal Behaviour* 55 (6): 1619-1630.

Zweifel, R. G. 1959. Effect of temperature on call of the frog, *Bombina variegata*. *Copeia* (4): 322-327.

Zweifel, R. G. 1968. Effects of temperature, body size, and hybridization on advertisement calls of toads, *Bufo a. americanus* and *Bufo woodhousii fowleri*. *Copeia* (2): 269-285.

Anexo 1. Colecciones revisadas para la elección de las localidades. Las coordenadas faltantes fueron obtenidas mediante un buscador mundial ([www.fallingrain.com/world/](http://www.fallingrain.com/world/)).

<b>Colección</b>	<b>Revisión</b>
Museo de Zoología "Alfonso L. Herrera", UNAM.	En persona
Colección Nacional de Anfibios y Reptiles del Instituto de Biología, UNAM.	En persona
Colección Anfibios y Reptiles del Estado de Tamaulipas, México (UANL).	<a href="http://www.conabio.gob.mx">www.conabio.gob.mx</a>
Colección Herpetofauna de la Región El Huizache, San Luis Potosí México (FES-I, UNAM).	<a href="http://www.conabio.gob.mx">www.conabio.gob.mx</a>
Colección de Anfibios y Reptiles de Calakmul, Campeche, México (ECOSUR-CH).	<a href="http://www.conabio.gob.mx">www.conabio.gob.mx</a>
Colección Herpetológica del Sureste de México (ECOSUR-CH).	<a href="http://www.conabio.gob.mx">www.conabio.gob.mx</a>
Museum of Vertebrate Zoology	<a href="http://data.gbif.org">http://data.gbif.org</a>
Yale University Peabody Museum	<a href="http://data.gbif.org">http://data.gbif.org</a>

Anexo 2. Total de localidades revisadas para obtener los sitios de muestreo.

<i>Estado</i>	<i>Localidad</i>	<i>Especie</i>
<b>Durango</b>	Abasolo.	Ninguna
<b>Durango</b>	Buenos Aires.	Ninguna
<b>Durango</b>	Camino a la Trinidad.	Ninguna
<b>Durango</b>	El Salto.	Ninguna
<b>Durango</b>	Las Delicias.	Ninguna
<b>Durango</b>	Mil Diez.	Ninguna
<b>Durango</b>	Presa “La Rosilla 1”	Ninguna
<b>Durango</b>	Presa “La Rosilla 2”	Ninguna
<b>Edo. de México</b>	Ixtlahuaca.	<i>H. eximia</i>
<b>Edo. de México</b>	Presa de Malinaltenango.	<i>H. eximia, Tlalocohyla smithii</i>
<b>Edo. de México</b>	Río Salado, Ixtapan de la Sal.	<i>H. eximia, T. smithii</i>
<b>Edo. de México</b>	San Antonio Yondejé.	<i>H. eximia</i>
<b>Edo. de México</b>	Tecomatepec.	<i>H. eximia, T. smithii</i>
<b>Guerrero</b>	Acahuixotla.	<i>Tlalocohyla picta</i>
<b>Guerrero</b>	Agua de Obispo.	Ninguna *
<b>Guerrero</b>	Filo de Caballo.	Ninguna
<b>Guerrero</b>	Mazatlán.	<i>T. picta</i>
<b>Hidalgo</b>	Rancho Santa Elena.	<i>H. eximia, H. arenicolor e T. plicata</i>
<b>Jalisco</b>	Arroyo Seco, Villa Hidalgo.	Ninguna
<b>Jalisco</b>	Camino Arroyo Seco-San Agustín.	<i>H. eximia</i>
<b>Jalisco</b>	Carretera Jocotepec-Acatlán de Juárez.	Ninguna



<b>Jalisco</b>	Cojumatlán de Régules.	Ninguna
<b>Jalisco</b>	El Fuerte, Jamay.	Ninguna
<b>Jalisco</b>	Lagos de Moreno.	<i>H. eximia</i>
<b>Jalisco</b>	Laguna de Chapala.	Ninguna
<b>Jalisco</b>	Los Galabices.	<i>H. eximia</i>
<b>Jalisco</b>	Los Mimbres.	<i>H. eximia</i>
<b>Jalisco</b>	Magdalena.	<i>H. eximia, T. smithii</i>
<b>Jalisco</b>	Playita de San Rafael, El Volantín.	<i>H. eximia</i>
<b>Jalisco</b>	Puerta del Zapatero, Mazamitla.	<i>H. eximia</i>
<b>Jalisco</b>	San Agustín.	<i>H. eximia</i>
<b>Jalisco</b>	Tequila.	<i>H. eximia, T. smithii</i>
<b>Morelos</b>	Huertas de San Pedro.	<i>T. picta</i>
<b>Morelos</b>	Huitzilac.	Ninguna
<b>Morelos</b>	Temixco.	Ninguna
<b>Morelos</b>	Tepoztlán.	<i>T. picta</i>
<b>Morelos</b>	Tres Marías.	<i>H. plicata</i>
<b>Morelos</b>	Yautepec.	<i>Hyla eximia, T. picta</i>
<b>San Luis Potosí</b>	El Realejo.	<i>H. eximia</i>
<b>San Luis Potosí</b>	Km 58.	<i>H. eximia, H. arenicolor</i>
<b>San Luis Potosí</b>	Laguna de Gerardo.	<i>H. eximia</i>
<b>San Luis Potosí</b>	Sierra de Álvarez.	<i>H. eximia</i>
<b>Tlaxcala</b>	San José Teocalco.	Ninguna
<b>Tlaxcala</b>	San Tadeo Huiloapan.	Ninguna
<b>Veracruz</b>	Alborada	Ninguna

<b>Veracruz</b>	Cascada Texolo, Xico.	<i>Ecnomiohyla. miotympanum</i>
<b>Veracruz</b>	Ixhuatlancillo, Orizaba.	<i>E. miotympanum</i>
<b>Veracruz</b>	Jardín Botánico de Xalapa.	Ninguna
<b>Veracruz</b>	Plan de Sedreño.	<i>Hyla sp.</i>
<b>Veracruz</b>	Puerto del Aire, Orizaba.	<i>H. euphorbiacea</i>
<b>Veracruz</b>	Vigas de Ramírez.	Ninguna

---

### 3. CAPÍTULO II. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE POBLACIONES DE *Hyla eximia*

#### 3.1 RESUMEN

La variación geográfica en los atributos reproductivos es explicada por fuerzas como la deriva genética o selección. Generalmente la divergencia del atributo está correlacionada con la diferencia genética. En el caso de las especies con baja dispersión y distribución geográfica amplia, es factible que las poblaciones cercanas presenten mayor flujo genético en comparación con las poblaciones lejanas. Sin embargo cuando la variación del atributo presenta un patrón de mosaico es probable que sea el reflejo de la respuesta hacia la selección. En este capítulo exploramos la diversidad genética basada en ADN mitocondrial y nuclear para entender la estructura genética de las poblaciones de *H. eximia* que conforman las cuencas hidrológicas. Indagamos si la variación del canto de anuncio podría estar correlacionada con la variación genética y con la distancia geográfica. Encontramos cuatro clados mitocondriales que concuerdan con la distribución geográfica de las cuencas hidrológicas. En el árbol mitocondrial individuos de Magdalena y Balsas se relacionaron en dos clados, lo cual indica que la variación del canto no es ocasionada por aislamiento por distancia. La estructura genética nuclear demuestra que los individuos de Balsas y Magdalena comparten similitud genética. La distancia acústica no tuvo un soporte genético y sólo la distancia mitocondrial se correlacionó con la distancia geográfica. Deducimos que el origen de las cuencas intervino principalmente en la estructura genética de los individuos y posteriormente los afluentes permitieron que individuos de cuencas distantes compartieran similitud genética, como ocurrió entre Magdalena y Balsas. Aunque esta divergencia genética coincide con la divergencia del canto, no detectamos correlación entre las distancias acústicas y genéticas, probablemente la utilización de nuevos marcadores proporcionen nueva información que permite aclarar la falta de correlación entre estos datos.

### 3.2 INTRODUCCIÓN

La filogeografía comprende el estudio de las relaciones entre la estructura genética y la geografía de las poblaciones, por lo que permite conocer el origen de las distribuciones geográficas de las especies y la relación genética de las especies cercanamente relacionadas (Avice, 2000). Es un estudio integral que explica los arreglos espaciales de las especies, a partir de un sustento molecular, poblacional, etológico, demográfico, filogenético, paleontológico, geológico y geográfico, dirigiendo así la interpretación hacia una conexión entre aspectos micro y macroevolutivos (Avice *et al.*, 1987). Los patrones filogeográficos de las especies son influidos por diferentes eventos como la vicarianza y dispersión. La vicarianza contribuye a la separación de las poblaciones (e. g. el surgimiento de una montaña o la división física de un cuerpo de agua; Vences y Glaw, 2002; Morrone, 2004), mientras que la dispersión interviene en el tamaño del área de distribución de las especies (Brown *et al.*, 1996) (e. g. especies con baja capacidad de dispersión presentan pequeños tamaños de área de distribución [Gaston, 1996]; o especies que se dispersan a grandes distancias amplían su área de distribución). A su vez los factores ambientales locales y más aún los cambios climáticos y eventos geológicos (Hewitt, 2000; Chek *et al.*, 2001) también influyen en la distribución de las especies (específicamente en el crecimiento de la población y la dispersión; Brown *et al.*, 1996). Es decir, hay todo un conjunto de eventos y factores que participan en los patrones filogeográficos, y las diferentes combinaciones de ellos permiten que las especies estén ampliamente distribuidas o no en determinada área.

En especies que presentan distribución geográfica amplia y mayor que su capacidad de dispersión (e. g. los anuros), el hecho de que algún atributo presente variación geográfica puede explicarse por el balance del flujo genético y la selección (Endler, 1977; Slatkin, 1978; Kirkpatrick y Barton, 1997). El principal factor que conduce la diferenciación genética de las poblaciones coespecíficas de los anuros, es el aislamiento por distancia (Slatkin, 1993). El modelo de aislamiento por distancia propone que en poblaciones geográficamente cercanas el flujo genético alcanza su máximo y disminuye conforme las poblaciones están más distantes, lo cual sugiere que las poblaciones cercanas geográficamente tendrán menor diferencia genética, mientras que las poblaciones alejadas presentarán mayor diferencia genética. Dado que el aislamiento por distancia es un

conductor de la diferenciación genética y la especiación alopátrica es el modo más común de la formación de especies (al menos de anfibios), se espera una fuerte correlación entre la diferenciación genética y la geográfica (Saltkin, 1993), y también se espera una correlación con la divergencia fenotípica de algún atributo. Si una especie tiene dispersión baja, las barreras geográficas tendrán mayor efecto en la divergencia del atributo (Monsen y Blouin, 2004) y si el atributo que diverge funge un papel principal en la reproducción, entonces también actuarán las barreras reproductivas (Dobzhansky, 1951 en Brown y Wilson, 1956), sobre todo si se trata de poblaciones donde coexisten diversas especies. De esta forma cuando el flujo genético de las poblaciones es impedido por la distancia geográfica o por cualquier tipo de barrera, las poblaciones pueden responder rápidamente a la selección o deriva genética, que son las fuerzas que provocan la variación geográfica en los atributos a lo largo de la amplia distribución geográfica de las especies (Jang *et al.*, 2011).

La selección puede variar de forma temporal y espacial a lo largo de la distribución, y es considerada una fuerza importante (tal vez la más importante; Hoskin y Higgie, 2010; Marie, Curie SPECIATION Network *et al.*, 2012) de la variación geográfica de los atributos. Generalmente si un atributo se encuentra bajo selección, se refleja en un patrón geográfico discontinuo o en forma de mosaico, puesto que la característica se expresa de manera diferente según la magnitud de la fuerza selectiva (Coyne y Orr, 2004). Los procesos de selección como la deriva genética también contribuyen al patrón geográfico de la característica, llegando las poblaciones a responder de manera diferente según su tamaño y ubicación en el área geográfica, por ejemplo, las poblaciones pequeñas que se encuentran en la periferia del área serán más sensibles a la deriva genética y al flujo genético de grandes poblaciones provenientes del centro del área, reduciendo así su variabilidad genética, evitando que respondan a la selección y permitiendo la fijación de genotipos localmente mal adaptados (Alleaume-Benharira *et al.*, 2005). Sin embargo, es difícil detectar el resultado de este proceso ya que la deriva además de ser aleatoria, tiene poco efecto en poblaciones grandes (Kimura, 1994) por lo que solo puede dar lugar al surgimiento de grupos reproductivamente aislados en un continuo espacial (Fitzpatrick *et al.*, 2009). Además de estos procesos evolutivos, la estructura genética poblacional y los

cambios demográficos históricos pueden intervenir en los patrones geográficos de los atributos (Avise, 2000).

El aislamiento por distancia y los efectos provocados por las barreras son fundamentales para la variación geográfica de la diversidad genética de los anfibios (Fouquet *et al.*, 2007; Zeisset y Beebee, 2008; Vieites *et al.*, 2009). Los anfibios son buen modelo para estudios filogeográficos, debido a que presentan una movilidad individual muy baja -comparada con aves o mamíferos que se desplazan a grandes distancias- acompañada de una alta fidelidad a los sitios natales (filopatría, e. g. *Ambystoma opacum* ver Gamble *et al.*, 2007). Por consiguiente, las poblaciones están genéticamente estructuradas a través de distancias geográficas cortas y son indicadores confiables de los eventos históricos causales de la distribución actual de las especies (Zeisset y Beebee, 2008). Los estudios de diversidad genética usando marcadores moleculares son valiosos para entender los patrones de la estructura genética y la filogeografía entre las poblaciones de una especie (Vieites *et al.*, 2009). Los marcadores de ADN mitocondrial han sido los más utilizados en las últimas décadas, ya que proporcionan una visión microevolutiva basada en la herencia materna, poseen recombinación genética molecular (ver Rokas *et al.*, 2003), presentan evolución rápida a nivel de secuencia nucleotídica y polimorfismo intraespecífico (Avise, 2000; Funk y Omland, 2003). Actualmente se ha incorporado el uso de marcadores nucleares (portadores de la información paterna) que permiten una interpretación completa de la estructura genética de las poblaciones. A pesar de que se ha detectado discordancia entre los resultados mitocondriales y nucleares, es importante considerar que el código de barras de ADN en especies cercanamente relacionadas, alopátricas, o bien en especies que hibridan, no debería depender solo de los marcadores mitocondriales también se debe incluir a los nucleares (Vences *et al.*, 2005).

En los anuros existe evidencia de relación entre la variación geográfica de los atributos del canto y el flujo genético (Ryan *et al.*, 1996; Bernal *et al.*, 2005; Wycherley *et al.*, 2002), aunque en su mayoría, los cantos de anuncio de los machos y las preferencias de las hembras están más sujetos a las presiones de selección sexual, como el aislamiento reproductivo entre las poblaciones (Boul *et al.*, 2007; Marie, Curie SPECIATION Network *et al.*, 2012). El desarrollo del canto está determinado por la genética, siendo menos

susceptible a los cambios del hábitat (Kime *et al.*, 2000; Bosh y De La Riva, 2004), sin embargo algunas especies pueden responder a las diferencias del hábitat (e. g. *Engystomops* [*Physalaemus*] *pustulosus* ver Ryan *et al.*, 1996; Pröhl *et al.*, 2006). También hay evidencia que indica la influencia de las interacciones entre especies de anuros relacionadas cercanamente sobre el patrón de variación geográfica del canto (Gerhardt, 1994; Höbel y Gerhardt, 2003).

En este capítulo estudiamos la diversidad genética basada en ADN mitocondrial y nuclear para entender la estructura poblacional de *Hyla eximia*. Analizamos si la variación geográfica del canto puede explicarse por la divergencia genética en conjunto con los patrones geográficos que han ocurrido a lo largo de su distribución.

### **3.3 OBJETIVOS**

#### 3.3.1 Objetivo general:

Conocer los patrones de la estructura genética de las poblaciones de *H. eximia* que conforman las cuencas hidrológicas principales del Altiplano mexicano (Pánuco, Lerma, Magdalena y Balsas).

#### 3.3.2 Objetivos particulares:

- Obtener la filogenia mitocondrial y nuclear e identificar los clados representativos de las cuencas.
- Conocer la estructura poblacional y la diversidad genética de *H. eximia* a partir de dos genes mitocondriales y dos nucleares, previamente empleados en estudios con especies del grupo *H. eximia*.
- Identificar diferencias genéticas entre las cuencas hidrológicas de las poblaciones de *H. eximia*. Determinar si existe relación entre los datos genéticos, acústicos y geográficos.

### 3.4 HIPÓTESIS

La divergencia genética en las poblaciones de *Hyla eximia* es resultado de las barreras reproductivas que han actuado de manera diferente en poblaciones simpátricas con *H. arenicolor* y *Tlalocohyla smithii*. Así la estructura genética corresponderá con la divergencia del canto.

#### Predicción

En las cuencas hidrológicas donde *H. eximia* coexiste con *H. arenicolor* o con *T. smithii*, la estructura genética poblacional va a diferir de la estructura genética de cuencas en donde sólo se encuentran individuos de *H. eximia*.

### 3.5 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.5.1 Extracción de ADN y amplificación

Para la extracción del ADN colectamos tejido de individuos de *H. eximia*. Las localidades de muestreo fueron agrupadas acorde con su ubicación en la cuenca hidrológica (ver Figura 1 del capítulo I). Como las cuencas hidrológicas tienen diferentes orígenes y afluentes, para el análisis genético decidimos crear sub-regiones de éstas (norte, centro y sur).

Extrajimos ADN genómico del tejido de la falange de individuos de *H. eximia* preservado en EtOH usando el DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA). Amplificamos dos regiones de ADN mitocondrial, citocromo b (*cyt-b*) con una longitud de 754 pares de bases (pb) y los iniciadores: *cyt-b*: MVZ16-H y MVZ15-L (Moritz *et al.*, 1992; Stöck *et al.*, 2008, 2011). ATPasa subunidades 8 y 6 con una longitud de 778 pb y los iniciadores siguientes: ATPase: LysAF y C3FR (Stöck *et al.*, 2008; Bryson *et al.*, 2010). Estas regiones genéticas mitocondriales previamente han mostrado ser informativas a niveles diferentes de divergencia dentro de los hílidos. También utilizamos dos marcadores nucleares, la región genética Propiomelanocortina A (POMC) con una longitud de 447 pb y se amplificó con los iniciadores POMC\_DRV\_F1 ATATGTCATGASCCAYTTYCGCT GGAA y POMC\_DRV\_R1 GGCRTTYTTGAAWAGAGTCATTAGWGG (modificados de Wiens *et al.*, 2005; Bryson *et al.*, 2010) y la región genética Rhodopsina (Rho) con una



longitud de 291 pb y los iniciadores Rho1A y Rho1C (Bossuyt y Milinkovitch, 2000; Faivovich *et al.*, 2005; Klymus *et al.*, 2010).

Para la mitocondrial llevamos a cabo PCR estándar en una reacción total de 25 µl de los cuales consideramos 1 µl de cada primer, a una concentración de 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM de cada dNTP, 1xNH<sub>4</sub> del buffer de reacción (50mM Tris-HCl pH 8.8, 16mM [NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> SO<sub>4</sub><sup>-</sup>), 1.25 unidades de Taq DNA polimerasa, y de 1 a 4µl de ADN. Las amplificaciones fueron realizadas con el protocolo siguiente: desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, desnaturalización por 45 s a 94°C, alineación por 45 s a 48°C (para *cyt-b*) y 57°C (para ATP), extensión por 1 min a 72°C, extensión final por 7 min a 72°C; la desnaturalización, alineación y la primera etapa de extensión fueron llevadas a cabo de 35-45 ciclos.

Las dos regiones genéticas nucleares las amplificamos con el protocolo mencionado anteriormente, pero la temperatura de alineación fue de 57°C para la región genética Rhodopsina (Rho) y de 58°C para la región genética Proopiomelanocortina A (POMC). Los productos PCR fueron enviados a secuenciar a la University of Washington High-Throughput Genomics Unit Department of Genome Sciences to the service of DNA sanger sequencing.

### **3.5.2 Alineaciones y análisis filogenético**

Las secuencias fueron inicialmente alineadas con Clustal X (Jeanmougin *et al.*, 1998) y se ajustaron manualmente en BioEdit (Hall, 1999). El programa DNAsp (Librado y Rozas, 2009) fue usado para determinar el número de haplotipos únicos, sitios invariables y polimórficos.

Realizamos análisis filogenéticos para ver las relaciones entre las poblaciones de *Hyla eximia*, usamos como grupos externos a las especies *Hyla euphorbiacea*, *H. wrightorum*, *H. arborea*, *H. intermedia*, *H. squirella* e *H. cinerea* obtenidos del GenBank (Benson *et al.*, 2012; Anexo 2). Estos análisis fueron realizados usando el algoritmo de máxima verosimilitud (ML; Felsenstein, 1981). Para iniciar la búsqueda del modelo con más apoyo en los datos, para los genes mitocondriales empleamos HKY Hasegawa-

Kishino-Yano model +G+I (distribución gama con sitios invariables), y para los genes nucleares empleamos el modelo GTR +I+G, en ambos análisis utilizamos el método heurístico NNI (Intercambio entre el vecino más cercano). El mejor modelo fue identificado con el programa Modeltest 3.7 y MrModeltest versión modificada de Modeltest versión 3.6 (Posada, 2008), usando el criterio de información Akaike (AIC).

La filogenia de máxima verosimilitud fue construida usando el programa MEGA versión 5 (Tamura *et al.*, 2011), y un análisis del vecino más cercano (Neighbour-joining, NJ) como árboles de semilla. Para analizar la distribución y relación entre los haplotipos mitocondriales, construimos una red de haplotipos con el programa TCS 2.1.1 (Clement *et al.*, 2000).

### **3.5.3 Diversidad, diferenciación genética y patrones filogeográficos**

Calculamos la diversidad genética de los individuos acorde con su sub-región (norte, centro o sur) hidrológica (Pánuco, Lerma, Magdalena y Balsas). La diversidad genética fue calculada como diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y haplotípica ( $h$ ), para cada par de genes concatenados (mitocondriales y nucleares), usando el programa Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010).

Calculamos la distancia genética ( $D_{xy}$ ) con el programa DNAsp (Excoffier y Lischer, 2010) y realizamos comparaciones por pares entre las sub-regiones de las cuencas. El índice de diferenciación poblacional ( $F_{ST}$ ) no fue empleado en este análisis debido a que los tamaños de las muestras eran demasiado pequeños para que mostraran significancia alguna. Para visualizar las diferencias entre cuencas con los genes nucleares, investigamos la estructura genética con Structure versión 2.3 (Pritchard *et al.*, 2000), corrimos el programa con el modelo Admixture y frecuencias correlacionadas. Empleamos un burnin de 500 000 y corrimos 5 000 000 generaciones de K 1 a 10, realizadas con 10 repeticiones para cada una. Para determinar el valor de K utilizamos en método de Evanno (Evanno *et al.*, 2005), mediante el programa Structure Harvester (Earl y vonHoldt, 2012). Este análisis fue empleado sólo para los genes nucleares ya que no está diseñado para encontrar estructura en genes ligados, como lo serían los genes mitocondriales.

### 3.5.4 Correlación entre distancias genéticas, acústicas y geográficas

La correlación entre las distancias genéticas, acústicas y geográficas fue analizada mediante una prueba de Mantel y prueba parcial de Mantel con 1 000 re-muestreos, usando el programa R versión 2.15.1 (Development Core Team, 2011). La matriz genética fue dividida en mitocondrial y nuclear, para su formación utilizamos los valores de la distancia genética ( $D_{xy}$ ) obtenidos en el programa Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010). Para calcular la matriz acústica empleamos las distancias entre cuencas considerando el promedio de las variables canónicas obtenidas en el análisis discriminante (Capítulo I). La matriz geográfica fue construida con las geo-referencias de cada localidad.

## 3.6 RESULTADOS

Obtuvimos un total de 37 secuencias de *H. eximia* correspondientes a doce localidades (Cuadro1), cabe mencionar que aunque el análisis del canto se basó en nueve de estas localidades, en el análisis genético obtuvimos muestras de tres localidades adicionales. Amplificamos, secuenciamos y analizamos 26 individuos para el gen ATPasa, 28 para *cyt-b*, 20 para Rho y 25 para POMC (Cuadro2). Estos individuos presentaron la mejor calidad en la secuenciación. En los genes mitocondriales están representadas 12 localidades y en los nucleares 11 localidades. Cabe aclarar que para la localidad Lagos de Moreno la muestra de tejido fue limitada, dificultándonos la obtención de ADN nuclear.

### 3.6.1 Análisis filogenético

Los árboles filogenéticos mitocondriales y nucleares presentan diferencias tanto en las ramas basales como en la relación genética entre cuencas (Figura 1). La reconstrucción filogenética basada en los genes mitocondriales indica relaciones que concuerdan con la cercanía geográfica de las cuencas, todos los individuos de *H. eximia* derivan en cuatro linajes. El clado basal (A) incluye a individuos del extremo sur de la cuenca del Pánuco, en el límite de la antigua cuenca cerrada de Apan, así como individuos del Balsas y uno de Magdalena. Éste es el clado mejor apoyado con valores de bootstrap de 56-96%. El clado mitocondrial siguiente (B) comprende a individuos de Lerma centro, relacionados con un individuo de Magdalena y uno del Balsas. Los clados hermanos más recientes, incluyen

sólo a individuos de las tres regiones del Lerma (C), siendo la región norte la que se mezcla con los individuos del centro; o individuos del Pánuco norte y centro con Lerma centro (D). Los valores de bootstrap son más altos en los genes mitocondriales que en los nucleares, y para los grupos basales más que para los grupos recientes. La reconstrucción filogenética mitocondrial muestra que los individuos que conforman al clado A (el sur del Pánuco, Balsas y Magdalena) son muy diversos en comparación con los individuos del clado D, pues corresponden a tres cuencas hidrológicas diferentes, mientras que en el clado D la mayoría de los individuos corresponden a la misma área geográfica (Pánuco). Cabe resaltar que en el clado A son notables dos subgrupos bien marcados, y de éstos uno indica la conexión entre la cuenca del Balsas y Magdalena. A pesar de que hay una diversificación en las relaciones filogenéticas mitocondriales, es notable que los individuos de Lerma centro se ubicaron en tres de las cuatro agrupaciones (clados B, C y D), indicando que esta cuenca funge como una zona de transición entre las regiones del Pánuco norte y centro, con Lerma norte y sur, y entre Balsas y Magdalena.

Cuadro1. Identificación del tejido colectado para la extracción de ADN de las poblaciones de *Hyla eximia*. Los números de acceso al GenBank son ubicados en las últimas columnas.

Individuo	Población	Cuenca	Latitud	Longitud	mtADN cyt-b	mtADN ATPasa	nADN Rho	nADN POMC
E_AG-01	San Agustín, Jalisco.	Lerma centro	20° 17' 53.15'' N	-102° 37' 47.7'' W		KJ885579		
E_AG-04	San Agustín, Jalisco.	Lerma centro	20° 17' 53.15'' N	-102° 37' 47.7'' W	KJ719624	KJ885580	KJ611958	KJ611979
E_AG-14	San Agustín, Jalisco.	Lerma centro	20° 17' 53.15'' N	-102° 37' 47.7'' W	KJ719625	KJ885581	KJ611959	KJ611980
E_K58-17	Km 58, San Luis Potosí.	Pánuco centro	22° 01' 12.18'' N	-100° 36' 7.26'' W	KJ719626	KJ885582	KJ611961	KJ611981
E_K58-18	Km 58, San Luis Potosí.	Pánuco centro	22° 01' 12.18'' N	-100° 36' 7.26'' W	KJ719627	KJ885583	KJ611962	KJ611982
E_K58-20	Km 58, San Luis Potosí.	Pánuco centro	22° 01' 12.18'' N	-100° 36' 7.26'' W	KJ719628		KJ611963	KJ611983
E_L-09	Laguna de Gerardo, San Luis Potosí.	Pánuco norte	22° 38' 27.36'' N	-100° 26' 20.94'' W	KJ719629			
E_L-19	Laguna de Gerardo, San Luis Potosí.	Pánuco norte	22° 38' 27.36'' N	-100° 26' 20.94'' W				KJ611984
E_L-20	Laguna de Gerardo, San Luis Potosí.	Pánuco norte	22° 38' 27.36'' N	-100° 26' 20.94'' W		KJ885584	KJ611964	KJ611985
E_LM-G3	Lagos de Moreno, Jalisco.	Lerma norte	21° 21' 48.59'' N	-101° 55' 44.77'' W	KJ719630	KJ885585		

E_LM-G4	Lagos de Moreno, Jalisco.	Lerma norte	21° 21' 48.59'' N	-101° 55' 44.77'' W	KJ719631	KJ885586		
E_MA-01	Magdalena, Jalisco.	Magdalena	20° 54' 0.41'' N	-103° 59' 36.85'' W				KJ611986
E_MA-02	Magdalena, Jalisco.	Magdalena	20° 54' 0.41'' N	-103° 59' 36.85'' W	KJ719632	KJ885587	KJ611965	
E_MA-03	Magdalena, Jalisco.	Magdalena	20° 54' 0.41'' N	-103° 59' 36.85'' W	KJ719633	KJ885588		KJ611987
E_MA-15	Magdalena, Jalisco.	Magdalena	20° 54' 0.41'' N	-103° 59' 36.85'' W				KJ611988
E_PM-01	Presa de Malinaltenango, Edo. de México.	Balsas	18° 48' 32.01'' N	-99° 43' 26.18'' W	KJ719634	KJ885589	KJ611966	KJ611989
E_PM-04	Presa de Malinaltenango, Edo. de México.	Balsas	18° 48' 32.01'' N	-99° 43' 26.18'' W	KJ719635	KJ885590		KJ611990
E_PM-14	Presa de Malinaltenango, Edo. de México.	Balsas	18° 48' 32.01'' N	-99° 43' 26.18'' W		KJ885591	KJ611967	
E_R-10	El Realejo, San Luis Potosí.	Pánuco norte	22° 40' 23.98'' N	-100° 25' 5.45'' W				KJ611991
E_R-12	El Realejo, San Luis Potosí.	Pánuco norte	22° 40' 23.98'' N	-100° 25' 5.45'' W	KJ719636	KJ885592		
E_R-16	El Realejo, San Luis Potosí.	Pánuco norte	22° 40' 23.98'' N	-100° 25' 5.45'' W	KJ719637	KJ885593	KJ611968	KJ611992
E_SA-01	El Realejo, San Luis Potosí.	Pánuco centro	22° 40' 23.98'' N	-100° 25' 5.45'' W	KJ719638	KJ885594		

E_SA-04	Sierra de Álvarez, San Luis Potosí.	Pánuco centro	22° 01' 52.56'' N	-100° 36' 49.86'' W	KJ719639	KJ885595	KJ611969	
E_SA-20	Sierra de Álvarez, San Luis Potosí.	Pánuco centro	22° 01' 52.56'' N	-100° 36' 49.86'' W		KJ885596	KJ611970	KJ611993
E_SE-05	Rancho Santa Elena, Hidalgo.	Pánuco sur	20° 08' 7.38'' N	-98° 30' 43.50'' W	KJ719640	KJ885597	KJ611971	KJ611994
E_SE-14	Rancho Santa Elena, Hidalgo.	Pánuco sur	20° 08' 7.38'' N	-98° 30' 43.50'' W	KJ719641	KJ885598		
E_SE-18	Rancho Santa Elena, Hidalgo.	Pánuco sur	20° 08' 7.38'' N	-98° 30' 43.50'' W	KJ719642	KJ885599	KJ611972	
E_SP-01	San Pedro Tlaltizapán, Edo. de México.	Lerma sur	19° 11' 41'' N	-99° 30' 13'' W	KJ719643	KJ885600	KJ611973	KJ611995
E_SP-03	San Pedro Tlaltizapán, Edo. de México.	Lerma sur	19° 11' 41'' N	-99° 30' 13'' W	KJ719644	KJ885601		KJ611996
E_SP-05	San Pedro Tlaltizapán, Edo. de México.	Lerma sur	19° 11' 41'' N	-99° 30' 13'' W	KJ719645			
E_SP-06	San Pedro Tlaltizapán, Edo. de México.	Lerma sur	19° 11' 41'' N	-99° 30' 13'' W			KJ611974	KJ611997
E_SR-15	Playita de San Rafael, Jalisco.	Lerma centro	20° 02' 52.98'' N	-103° 09' 46.26'' W	KJ719646	KJ885602		KJ611998
E_SR-16	Playita de San Rafael, Jalisco.	Lerma centro	20° 02' 52.98'' N	-103° 09' 46.26'' W	KJ719647		KJ611975	KJ611999
E_SR-18	Playita de San Rafael, Jalisco.	Lerma centro	20° 02' 52.98'' N	-103° 09' 46.26'' W	KJ719648	KJ885603	KJ611976	KJ612000

E_VJ-02	Valle de Juárez, Jalisco.	Lerma centro	19° 57' 20.94'' N	-102° 56' 27.78'' W	KJ719649	KJ885604	KJ612001
E_VJ-03	Valle de Juárez, Jalisco.	Lerma centro	19° 57' 20.94'' N	-102° 56' 27.78'' W	KJ719650		KJ611977 KJ612002
E_VJ-07	Valle de Juárez, Jalisco.	Lerma centro	19° 57' 20.94'' N	-102° 56' 27.78'' W	KJ719651		KJ611978 KJ612003

Cuadro2. Número de individuos amplificados y secuenciados para cada gen mitocondrial y nuclear.

	<b>ATPasa</b>	<b>cyt-<i>b</i></b>	<b>Rho</b>	<b>POMC</b>
Pánuco norte	3	5	2	4
Pánuco centro	5	5	5	4
Pánuco sur	3	3	2	1
Lerma norte	2			
Lerma centro	6	8	6	8
Lerma sur	2	3	2	3
Magdalena	2	2	1	3
Balsas	3	2	2	2
<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>28</b>	<b>20</b>	<b>25</b>



La reconstrucción basada en los genes nucleares indica relaciones que no muestran un patrón geográfico tan claro como en la filogenia mitocondrial y la divergencia entre las ramas es superficial. También sugiere una conexión de Lerma con Balsas y Pánuco como la filogenia mitocondrial. El árbol muestra la formación de cuatro linajes, el clado basal se conforma por individuos de Lerma sur, que se mantienen aislados de las demás cuencas. El segundo clado abarca a la mayoría de los individuos de las regiones del Pánuco (excepto de la región sur). El tercer clado comprende dos individuos de Lerma centro, relacionados de manera separada con Balsas y Pánuco centro. El cuarto clado es más diverso, en él se ubican la mayoría de los individuos de Lerma centro, relacionados con un individuo de Magdalena, y en un sub-grupo los individuos del Pánuco norte se relacionan con un individuo del Pánuco centro y otro del Pánuco sur. La diferencia con la filogenia mitocondrial recae en la agrupación de los individuos de Lerma sur, los cuales no se relacionan con los individuos de Lerma centro (como en el clado mitocondrial C), sino con los del Pánuco centro y norte; otra diferencia es la ubicación de los individuos del Pánuco, en la filogenia mitocondrial los individuos mantienen una relación fuerte (clado D), mientras que en el árbol nuclear algunos de ellos se separaron relacionándose con Lerma centro y Magdalena, en un grupo más reciente.

Los dos árboles filogenéticos coinciden en que la región de Lerma centro es una zona de transición genética que permite compartir similitud genética con las demás cuencas.

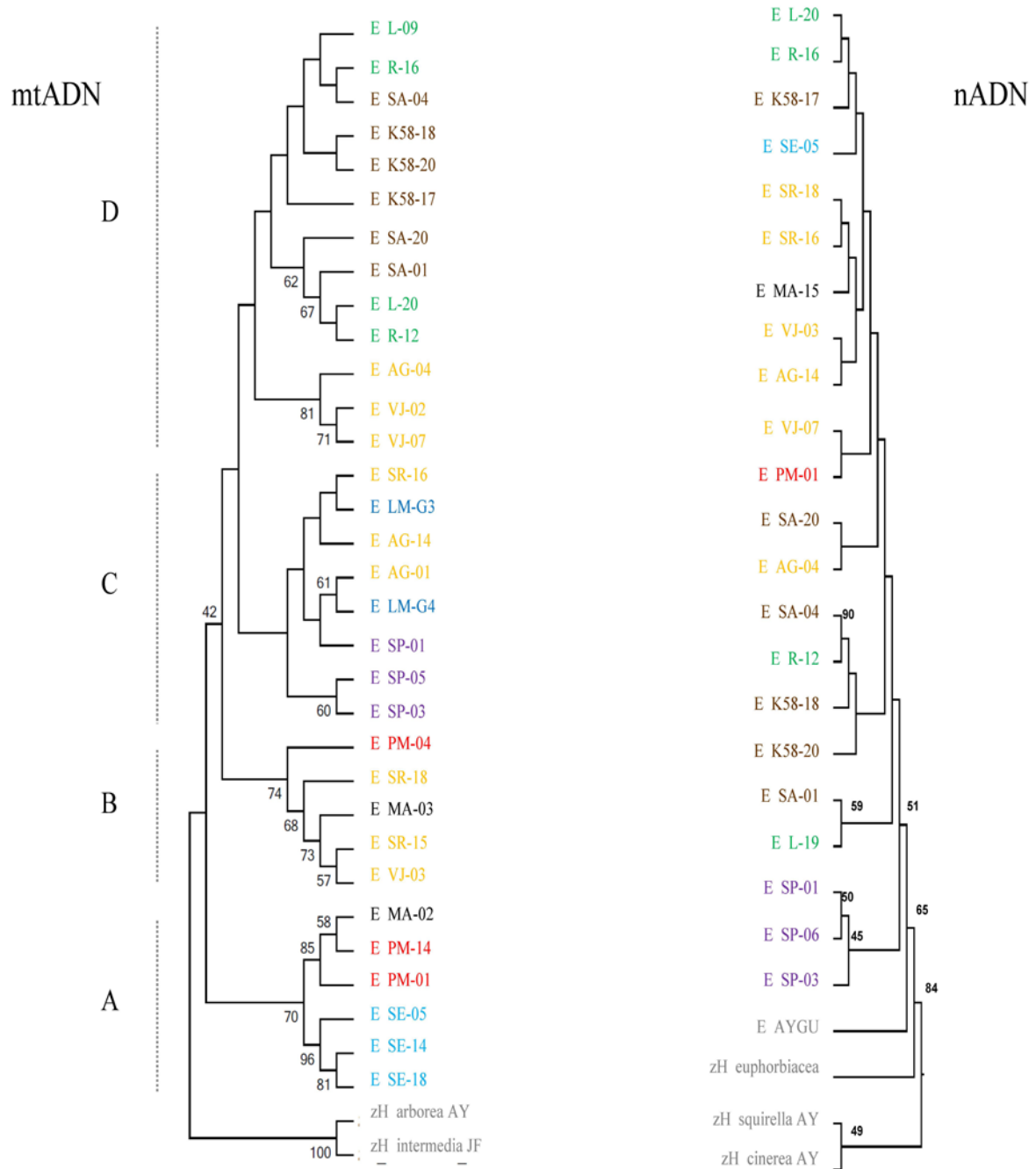


Figura 1. Filogenias de genes mitocondriales y nucleares concatenados por separado. Los individuos están separados por la región correspondiente a la cuenca: Pánuco norte (verde), Pánuco centro (café), Pánuco sur (azul turquesa), Lerma norte (azul), Lerma centro (amarillo), Lerma sur (morado), Magdalena (negro), Balsas (rojo) y grupos externos (gris). Las letras de la izquierda indican los clados mitocondriales propuestos.

### 3.6.2 Diversidad, diferenciación genética y patrones filogeográficos.

#### 3.6.2.1 Genes mitocondriales

Encontramos un total de 30 haplotipos diferentes para los genes mitocondriales concatenados (Anexo 1). En la red de haplotipos (Figura 2) aparecen 31 porque aunque el haplotipo 4 está representado por tres individuos, dos de Pánuco centro (E\_K58-17, E\_K58-20) y 1 de Pánuco norte (E\_R-16), la red los contempló por separado. Además hay un haplotipo de Lerma norte (E\_LM-G3) que no parece en la red, por eso nos da 31 haplotipos. Cabe mencionar que en Lerma norte únicamente teníamos a dos individuos y es probable que la secuencia del individuo faltante hay sido exactamente igual a otra, por lo que el programa TCS no lograra diferenciarla, descartamos que la “desaparición” del haplotipo se deba a datos faltantes (Joly *et al.*, 2007), pues la secuencia estaba completa. Esta red muestra cierta congruencia con la cuenca geográfica a la que pertenecen. Los haplotipos del Pánuco centro y norte están más conectados entre sí, mientras que Pánuco sur no se conecta con ninguna otra cuenca. Dos de los haplotipos de Balsas, también mantienen un aislamiento con las demás cuencas, excepto por un haplotipo de Magdalena (el otro haplotipo de Balsas está relacionado a haplotipos de Lerma centro). Finalmente, la cuenca del Lerma es la que posee mayor diversidad de haplotipos, tal como lo indicó el índice de diversidad nucleotídica (ver abajo). Por un lado los haplotipos de la región sur están más conectados con haplotipos del Pánuco centro (cinco pasos mutacionales representados por los haplotipos potenciales), que con los haplotipos de Lerma centro (ocho pasos mutacionales). La relación de Lerma norte es más estrecha con haplotipos de Pánuco centro que con haplotipos de Lerma centro. Lerma centro es la región más diversa, se conecta con haplotipos de las demás cuencas, excepto por Pánuco sur.

La mayor diversidad nucleotídica se encuentra en Magdalena ( $\pi = 0.4615$ ) y Balsas ( $\pi = 0.2692$ ) (Cuadro3), sin embargo como el tamaño de muestra es muy pequeño, la desviación estándar tomó valores altos, lo que disminuye la confiabilidad de este coeficiente. Por lo tanto, los valores de diversidad nucleotídica confiables son muy bajos, Lerma centro fue la cuenca con mayor diversidad nucleotídica ( $\pi = 0.0774$ ), seguida de Lerma sur y Pánuco sur (ambos con  $\pi = 0.0641$ ). Por otro lado, la diversidad haplotípica

fue muy alta en todas las regiones, sin embargo, como la muestra fue pequeña no alcanza a representar la variabilidad haplotípica, lo cual se deduce porque el número de haplotipos es igual al tamaño de la muestra. Así los coeficientes más confiables son los mostrados en las cuencas Pánuco centro ( $h = 0.8571$ ) y Pánuco norte ( $h = 0.8$ ).

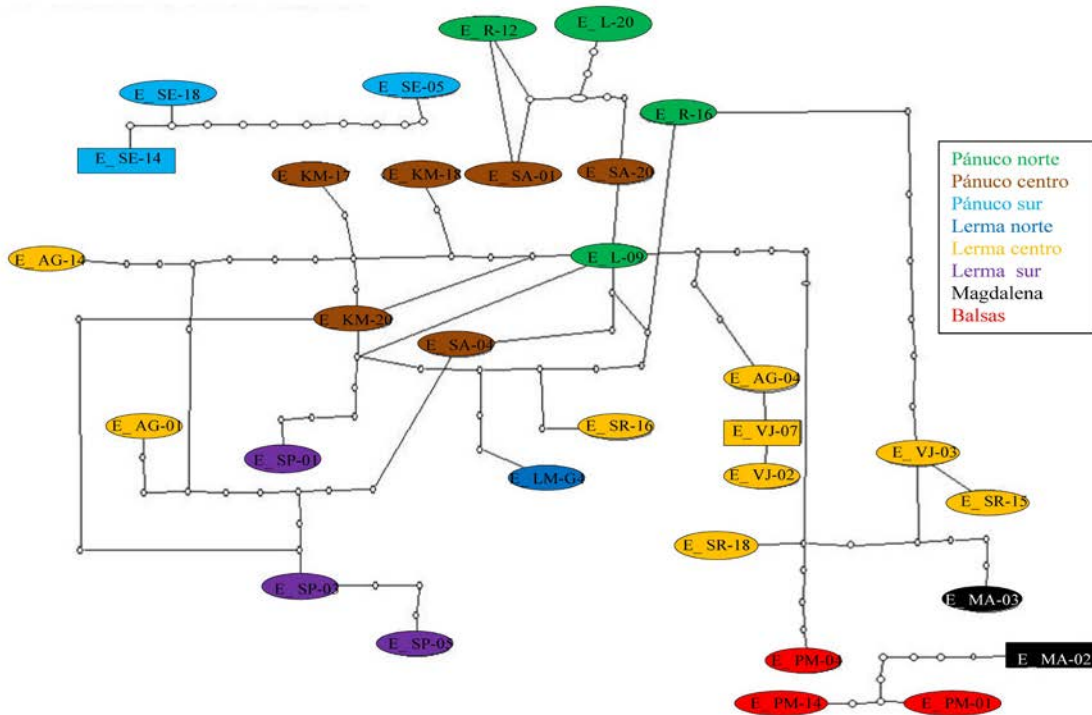


Figura 2. Red de haplotipos de genes mitocondriales concatenados. Los haplotipos correspondientes a las sub-regiones de las cuencas son representados por círculos y rectángulos a color. Los círculos pequeños y vacíos representan haplotipos potenciales o pasos mutacionales entre haplotipos. Los rectángulos corresponden a haplotipos potencialmente ancestrales. Las rayas indican las conexiones entre haplotipos. Las letras son el código del individuo del cual se obtuvo la secuencia original.

La comparación del índice de diferenciación poblacional, indica que el Pánuco sur es la cuenca más heterogénea, seguida por el Balsas y por Lerma sur (Cuadro4). Pánuco sur fue diferente de Pánuco centro ( $F_{ST} = 0.915$ ), Pánuco norte ( $F_{ST} = 0.904$ ) y Lerma centro ( $F_{ST} = 0.84$ ). Balsas difiere genéticamente de Pánuco centro ( $F_{ST} = 0.611$ ), Lerma centro

( $F_{ST} = 0.56$ ) y Pánuco norte ( $F_{ST} = 0.538$ ). Lerma sur difiere de Pánuco norte ( $F_{ST} = 0.328$ ) y centro ( $F_{ST} = 0.309$ ).

### **3.6.2.2 Genes nucleares**

Encontramos 25 haplotipos para los genes nucleares (Anexo 1). La mayor diversidad nucleotídica fue registrada en Pánuco centro ( $\pi = 0.2000$ ) (Cuadro 3) y Lerma centro ( $\pi = 0.1901$ ), en estas cuencas los tamaños de muestra fueron los más altos, proporcionando confiabilidad a los datos. Lerma sur también alcanzó valor alto de diversidad, pero su desviación estándar es alta, además de poseer un tamaño de muestra bajo. En tercer lugar podríamos resaltar a Pánuco norte ( $\pi = 0.1235$ ), con buen tamaño de muestra y con desviación estándar pequeña. Al igual que en los genes mitocondriales, el tamaño de muestra es muy pequeño para mostrar una variabilidad haplotípica confiable.

Las cuencas con mayor diferenciación genética son Lerma sur, Pánuco norte y Pánuco sur (Cuadro4). Lerma sur difiere de Pánuco norte ( $F_{ST} = 0.304$ ), Pánuco centro ( $F_{ST} = 0.239$ ) y Lerma centro ( $F_{ST} = 0.236$ ). Pánuco norte fue diferente de Magdalena ( $F_{ST} = 0.303$ ) y Lerma centro ( $F_{ST} = 0.175$ ). Pánuco sur sólo fue diferente de Lerma centro ( $F_{ST} = 0.182$ ).

La estructura genética visualizada a partir de los genes nucleares, está indicada en las Figuras 3 y 4. El método de Evanno determinó tres grupos genéticos (K=3, Figura 3) que representan mejor la muestra. El análisis de structure permite conocer cómo se relacionan los individuos y principalmente a qué grupo potencial pertenecen, razón por la cual no realizamos una red de haplotipos nucleares. En una prueba piloto realizamos un análisis con los genes nucleares concatenados, pero la estructura genética era difícil de distinguir, sobre todo para los individuos de las cuencas del Pánuco y Lerma. Sin embargo, al igual que con los genes por separado, los individuos de Magdalena y Balsas se mantuvieron en el mismo grupo genético.

Cuadro 3. Diversidad haplotípica ( $h$ ) y nucleotídica ( $\pi$ ) de cada sub-región de las cuencas. Los valores corresponden a la diversidad y la desviación estándar (en paréntesis) para genes mitocondriales y nucleares concatenados en cada población. N = número de muestras analizadas y H= número de haplotipos.

Cuenca	N, H	mtADN		N, H	Nuclear	
		$h$	$\pi$		$h$	$\pi$
Pánuco norte	6, 4	0.800 (±0.172)	0.022 (±0.016)	5, 4	0.900 (±0.161)	0.123 (±0.080)
Pánuco centro	7, 5	0.857 (±0.137)	0.023 (±0.016)	6, 5	0.933 (±0.122)	0.200 (±0.121)
Pánuco sur	3, 3	1.000 (±0.272)	0.064 (±0.052)	1, 1	1.000 (±0.000)	0.000 (±0.000)
Lerma norte	2, 2	1.000 (±0.500)	0.058 (±0.062)		-----	-----
Lerma centro	9, 9	1.000 (±0.052)	0.077 (±0.045)	8, 8	1.000 (±0.062)	0.190 (±0.109)
Lerma sur	3, 3	1.000 (±0.272)	0.064 (±0.052)	3, 3	1.000 (±0.272)	0.157 (±0.123)
Magdalena	2, 2	1.000 (±0.500)	0.461 (±0.466)	3, 3	1.000 (±0.272)	0.118 (±0.094)
Balsas	3, 3	1.000 (±0.272)	0.269 (±0.205)	2, 2	1.000 (±0.500)	0.088 (±0.095)

- Los dos individuos de Lerma norte carecieron de secuencia nuclear dado el tamaño limitado de la muestra de ADN.

Cuadro 4. Coeficiente de diferenciación poblacional ( $F_{ST}$ ) para genes mitocondriales y nucleares.  $F_{ST}$  de los genes mitocondriales (debajo de la diagonal) y  $F_{ST}$  para genes nucleares (arriba de la diagonal). El índice fue calculado con el método de distancia de diferencias pareadas. Valores de  $P$  después de 110 permutaciones, nivel de significancia de 0.05.

Cuencas	Pánuco norte	Pánuco centro	Pánuco sur	Lerma centro	Lerma sur	Magdalena	Balsas
<b>Pánuco norte</b>	-----	-0.025 (P= 0.513)	0.133 (P= 0.405)	<b>0.175</b> (P= <b>0.009</b> )	<b>0.304</b> (P= <b>0.036</b> )	<b>0.303</b> (P= <b>0.045</b> )	0.300 (P= 0.054)
<b>Pánuco centro</b>	-0.088 (P= 0.639)	-----	0.189 (P= 0.117)	0.060 (P= 0.090)	<b>0.239</b> (P= <b>0.000</b> )	0.089 (P= 0.234)	0.075 (P= 0.225)
<b>Pánuco sur</b>	<b>0.904</b> (P= <b>0.027</b> )	<b>0.915</b> (P= <b>0.018</b> )	-----	<b>0.182</b> (P= <b>0.045</b> )	0.223 (P= 0.486)	0.294 (P= 0.099)	0.363 (P= 0.333)
<b>Lerma centro</b>	0.101 (P= 0.090)	0.077 (P= 0.126)	<b>0.840</b> (P= <b>0.000</b> )	-----	<b>0.236</b> (P= <b>0.027</b> )	-0.017 (P= 0.504)	0.098 (P= 0.063)
<b>Lerma sur</b>	<b>0.328</b> (P= <b>0.027</b> )	<b>0.309</b> (P= <b>0.009</b> )	0.863 (P= 0.090)	0.131 (P= 0.063)	-----	0.268 (P= 0.063)	0.299 (P= 0.18)
<b>Magdalena</b>	0.334 (P= 0.081)	0.445 (P= 0.054)	0.565 (P= 0.099)	0.364 (P= 0.387)	0.161 (P= 0.108)	-----	-0.031 (P= 0.396)
<b>Balsas</b>	<b>0.538</b> (P= <b>0.018</b> )	<b>0.611</b> (P= <b>0.000</b> )	0.628 (P= 0.153)	<b>0.560</b> (P= <b>0.000</b> )	0.409 (P= 0.198)	-0.431 (P= 0.495)	-----

El gen “POMC” muestra que el primer grupo genético lo conforman individuos de las cuencas de Magdalena, Balsas y Lerma sur además de la mayoría de los individuos de Lerma centro y Pánuco sur (Figura 4). El segundo grupo lo comprenden dos individuos de Lerma centro (25 y 30), tres individuos del Pánuco centro (4, 18 y 17) y la mayoría de los

individuos del Pánuco norte. En el grupo tres se ubican individuos del Pánuco centro (16 y 8) y norte (3,19 y 5; grupo tres). La estructura genética encontrada en “Rho” (Figura 4) señala que los individuos de Balsas y Magdalena comparten similitud, a su vez estas cuencas se asemejan con la mayoría de los individuos de Lerma centro y Pánuco sur (grupo uno). Contrario a la estructura genética encontrada con el gen POMC, los individuos de Lerma sur (grupo dos) son más parecidos a los individuos del Pánuco centro (14, 15, 3 y 5) y norte (12). Finalmente el grupo tres es representado por individuos del Pánuco norte (13, 6 y 7) dos individuos del Pánuco centro (16 y 4) y un individuo de Lerma centro (1). Aunque hay diferencias en la agrupación de individuos en ambos genes nucleares, coinciden en la similitud entre los individuos de Magdalena y Balsas, además indican que Lerma centro y Pánuco sur son zonas de transición con los individuos de las regiones del Pánuco.



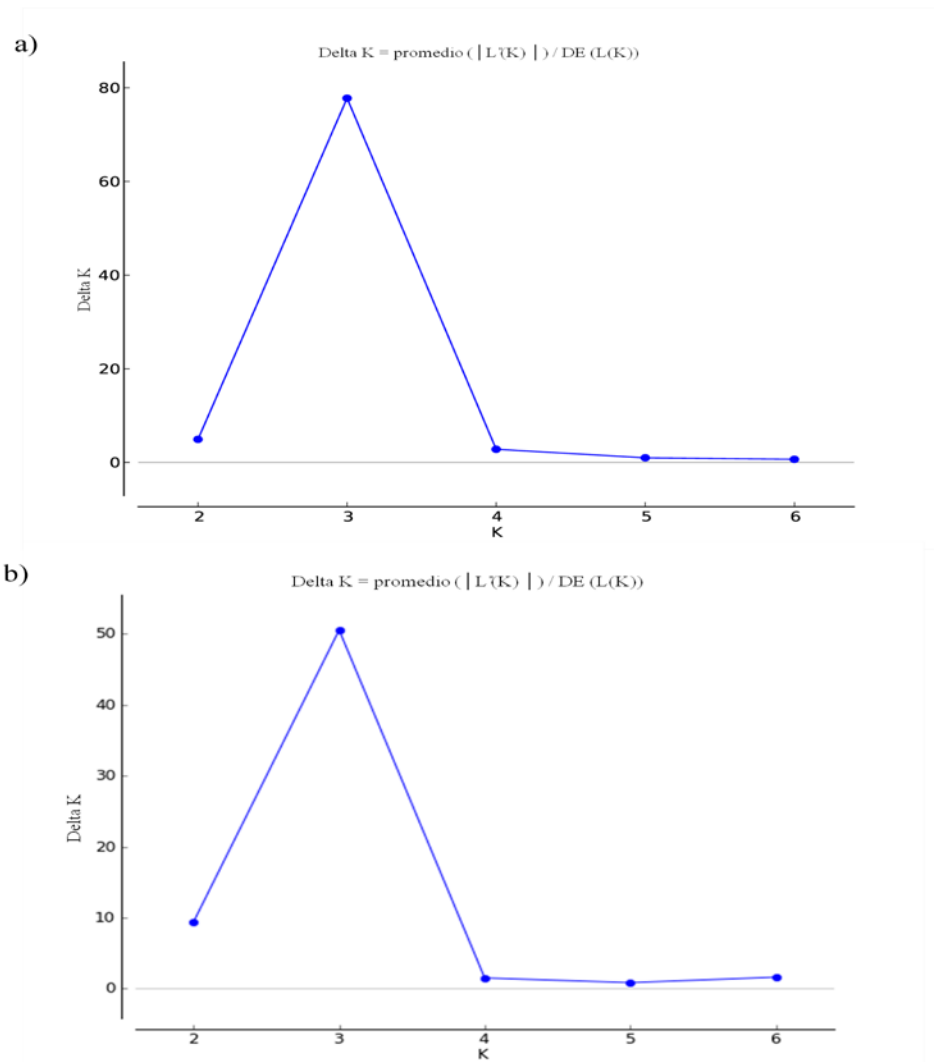


Figura 3. Número de grupos genéticos encontrados para los genes nucleares. a) grupos genéticos para el gen POMC; b) grupos genéticos para el gen Rho. El valor de K indica que los individuos presentan una estructura poblacional conformada por tres grupos genéticos.

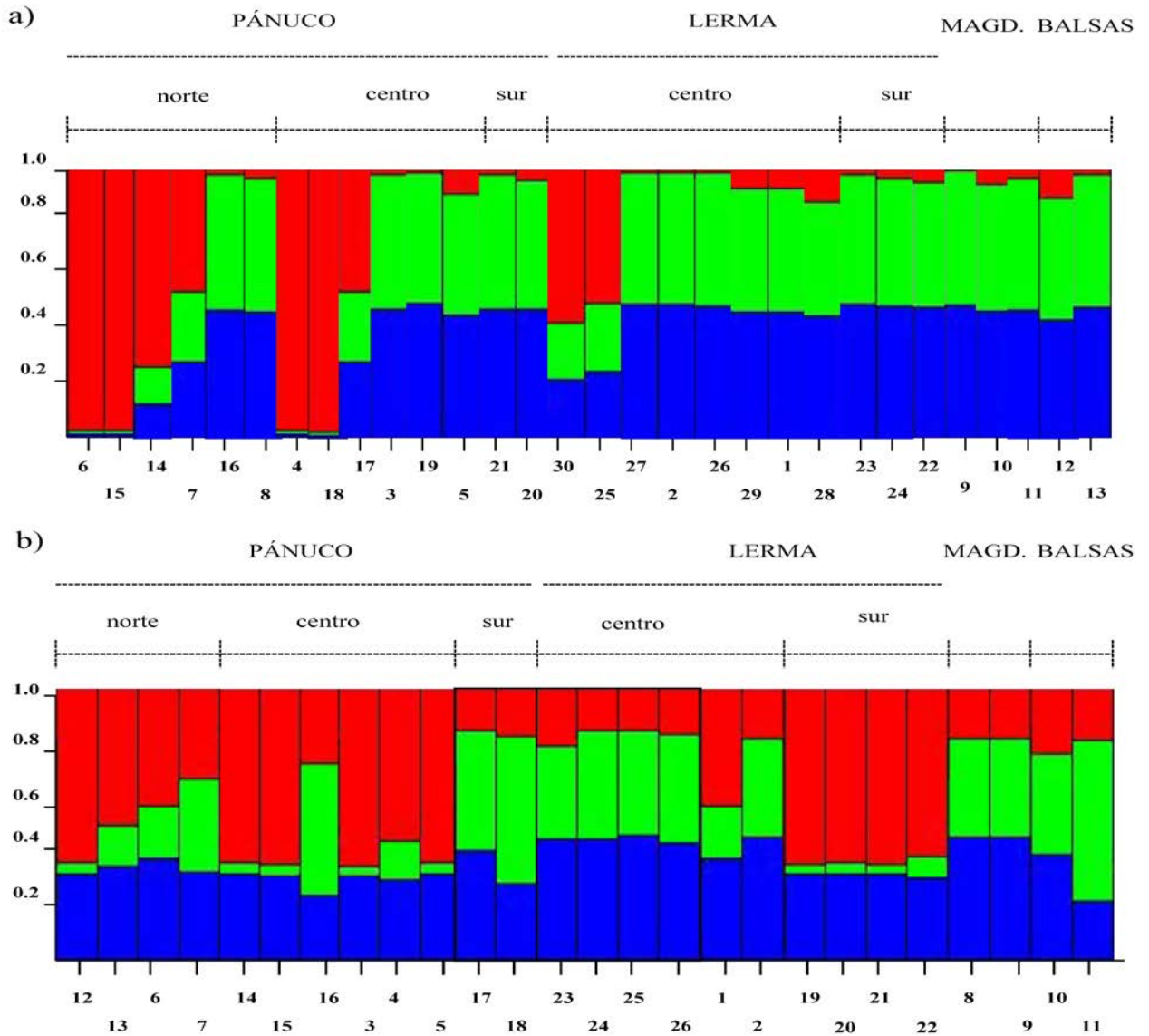


Figura 4. Estructura poblacional de los individuos muestreados de *Hyla eximia*. a) estructura de la población revelada con el gen nuclear POMC. b) estructura de la población revelada con el gen nuclear Rho. Cada barra de color corresponde a un individuo perteneciente a cada sub-región de las cuencas. El eje Y indica la probabilidad de que el individuo pertenezca a una sub-región, probabilidad que es indicada por el porcentaje de color de cada barra. El eje X presenta el código de los individuos según el orden de las secuencias en la base de datos. En la parte superior de cada gráfica se ubica la sub-región de las cuencas.

### 3. 6. 3. Correlación de distancias genéticas, acústicas y geográficas.

La prueba de Mantel indicó que no existe correlación entre la matriz del canto y la distancia genética, tanto con los genes mitocondriales ( $r= 0.022$ ,  $P= 0.409$ ) como con los nucleares ( $r= 0.426$ ,  $P= 0.108$ ), manteniéndose este patrón aún cuando se controla por distancia geográfica (Cuadro5). Tampoco existe correlación significativa entre la distancia del canto y la distancia geográfica ( $r= 0.125$ ,  $P= 0.306$ ), aún cuando la correlación es controlada por la distancia mitocondrial (Prueba parcial de Mantel:  $r= 0.126$ ,  $P= 0.218$ ) o por la nuclear (Prueba parcial de Mantel:  $r= 0.185$ ,  $P= 0.234$ ). La distancia geográfica y la distancia genética nuclear también carecen de correlación significativa ( $r= 0.097$ ,  $P= 0.311$ ), aún cuando se controla por la matriz acústica (Prueba parcial de Mantel:  $r= 0.167$ ,  $P= 0.293$ ). Sin embargo, la distancia geográfica sí se correlaciona con la distancia mitocondrial ( $r= 0.372$ ,  $P= 0.035$ ) y esta correlación se mantiene cuando controlamos por la distancia del canto (Prueba parcial de Mantel:  $r= 0.372$ ,  $P= 0.042$ ).

Cuadro 5. Correlaciones (arriba de la diagonal) y correlaciones parciales (debajo de la diagonal) de Mantel. En la correlación parcial de la distancia acústica con la distancia geográfica, hay dos valores, el primero corresponde al control por distancia mitocondrial y el segundo al control por distancia nuclear. Las correlaciones significativas están resaltadas en negro.

Correlación	Acústica	Geográfica	Mitocondrial	Nuclear
<b>Acústica</b>	-----	0.125 ( $P= 0.306$ )	0.022 ( $P= 0.409$ )	0.426 ( $P= 0.108$ )
<b>Geográfica</b>	0.126; 0.185 ( $P= 0.218$ ; $P= 0.234$ )	-----	<b>0.372</b> ( $P= 0.035$ )	0.097 ( $P= 0.311$ )
<b>Mitocondrial</b>	0.026 ( $P= 0.419$ )	<b>0.372</b> ( $P= 0.042$ )	-----	-----
<b>Nuclear</b>	0.443 ( $P= 0.128$ )	0.167 ( $P= 0.293$ )	-----	-----

## 3.7 DISCUSIÓN

### 3.7.1 Análisis filogenético

Las filogenias mitocondrial y nuclear permitieron descubrir discrepancias en las relaciones genéticas de los individuos. Por un lado, los genes mitocondriales concuerdan con la distribución geográfica de las poblaciones, mostrando cuatro grupos en la especie *H. eximia*. A pesar de que los grupos no presentan un buen soporte que nos permita considerarlos como linajes, los individuos se relacionaron con individuos de la misma cuenca, manteniendo una estructura geográfica. Por otro lado, la filogenia nuclear indica que las relaciones entre los individuos no se explican por algún patrón geográfico y los grupos derivados no son tan evidentes como en el análisis mitocondrial, los individuos del Lerma sur son la rama basal y los del Pánuco están ubicados en clados diferentes. La similitud en ambos árboles recae en la formación de cuatro clados, y la diferencia principal en la formación de las ramas basales.

La discrepancia entre genes mitocondriales y nucleares se ha encontrado en varios estudios (ver Toews y Brelsford, 2012), en parte ha sido adjudicada al polimorfismo ancestral (Avise, 2000), como los tamaños efectivos de ambos tipos de marcadores son diferentes, aproximadamente el tamaño efectivo del mtADN es la cuarta parte del nADN (Zink y Barrowclough, 2008), se esperaría que los polimorfismos ancestrales fueran más frecuentes en nADN (Funk y Omland, 2003). Si ésta fuera la causa en nuestro estudio, en las filogenias deberíamos observar que el largo de las ramas de los grupos basales sería muy diferente del largo de las ramas de los grupos derivados, pero éste no fue el caso en el árbol mitocondrial ni en el nuclear. Cuando hay similitud en el largo de las ramas indica que los alelos expresados en los grupos derivados son los mismos que los expresados en el ancestro, pero en nuestro estudio los resultados reflejan lo contrario. La diferencia entre árboles genéticos simplemente puede deberse a que ambos tipos de genes tienen diferente expresión genética. También se ha reportado que la hibridación introgresiva (incorporación de una parte de los genes de una especie en otra) puede ocasionar discrepancia, sin embargo, con nuestros resultados no podemos conocer si existe hibridación debido a que los árboles filogenéticos sólo incluyen secuencias de *H. eximia*. Finalmente, otra causa de

la discrepancia podría ser la clasificación incompleta del linaje, ésta la podemos descartar porque las muestras pertenecen a poblaciones que abarcan la mayor parte de la distribución de la especie. Deducimos que la filogenia mitocondrial difiere de la filogenia nuclear por las características propias de los marcadores (Funk y Omland, 2003), no obstante los genes mitocondriales indican que probablemente las hembras están migrando menos que los machos, tal como lo soportan los altos valores en las comparaciones del índice de diferenciación poblacional (Crawford, 2003), y por ello el patrón observado en el árbol mitocondrial –concordante con la geografía- se pierde en el árbol nuclear. Las migraciones de anuros ocurren constantemente y generalmente las hembras recorren distancias mayores que los machos (e. g. *Rana luteiventris*, Pilliod *et al.*, 2002; *Rana [Lithobates] catesbeiana*, Austin *et al.*, 2003; *Engystomops pustulosus* [antes *Physalaemus*], Lampert *et al.*, 2003; *Rana temporaria*, Palo *et al.*, 2004; Semlitsch, 2008). Nuestro tamaño de muestra y la diversidad de haplotipos no nos permiten calcular la tasa de migración, ya que al obtener mayoría de haplotipos únicos que no se están compartiendo entre las cuencas, los resultados reflejarían mayor diferenciación y por ende menor migración. Únicamente el haplotipo 4 fue compartido por dos individuos del Pánuco centro y uno del Pánuco norte, indicando una probable migración entre estas sub-regiones.

### **3.7.2 Diversidad, diferenciación genética y patrones filogeográficos**

La red de haplotipos mitocondrial mostró congruencia con la cuenca a la que pertenecen y encuentra soporte con la diversidad nucleotídica de las cuencas. Dentro de los valores confiables, Lerma centro fue la cuenca con mayor diversidad nucleotídica, tanto mitocondrial como nuclear, lo cual explica que haya sido la cuenca más relacionada con haplotipos de todas las otras cuencas. El índice de diferenciación poblacional mostró que en los genes mitocondriales, Balsas y Pánuco sur fueron las cuencas más diferentes, probablemente porque actualmente están geográficamente más separadas de las demás cuencas (Figura 5). Dentro del mismo Pánuco, la región sur fue diferente de las otras regiones, norte (Realejo) y centro (Álvarez), diferencia que la ubica en los extremos del árbol filogenético mitocondrial. Lo mismo ocurre con los genes nucleares, Lerma sur, Pánuco norte y sur fueron nucleotídicamente diferentes de las demás porque son las regiones más separadas del rango geográfico.



explica por qué un haplotipo del Balsas está conectado con Lerma centro y todos se conectan con Magdalena. La cuenca del Lerma, surgió a partir de la actividad volcánica que bloqueó las corrientes que fluían hacia el Balsas, dirigiendo el flujo del Lerma hacia el oeste, muy probablemente hacia la zona donde se ubica actualmente la Laguna de Magdalena. Este cambio de flujo soporta la conexión entre un haplotipo de Magdalena y haplotipos de Lerma centro. A su vez el origen ancestral del Lerma es una serie de lagos, lo que soportaría la diversificación de haplotipos entre las sub-regiones de la cuenca del Lerma.

Con la formación de la Sierra de las Cruces, el paso de las corrientes del Lerma hacia el Valle de México fue impedido, la evidencia geológica indica que el lago del Valle sobrepasó los límites de la cuenca y se extendió hacia el Pánuco. Esta invasión entre cuencas explicaría la conexión entre haplotipos de Lerma centro con Pánuco norte y centro. Mientras que el aislamiento de las corrientes del Lerma en el valle explicaría porque los haplotipos de Lerma sur se posicionaron en la periferia de la red, conectándose más con los haplotipos del Pánuco que con los de su propia cuenca. Probablemente la actividad volcánica posterior del eje neo-volcánico transversal, hizo que los haplotipos de Lerma sur (San Pedro Tlaltizapán) se diferenciaron más de Lerma centro que de los del Pánuco centro, con quienes mantenía mayor cercanía geográfica. Otra explicación plausible a la conexión de haplotipos de Lerma con Pánuco, está dada porque algunos ríos del Pánuco han captado corrientes del Lerma responsables de su configuración actual.

En la cuenca del Pánuco la conexión de haplotipos entre las sub-regiones es más fuerte que en Lerma. Probablemente porque es la cuenca que ha sufrido menores modificaciones geográficas. Únicamente los haplotipos del Pánuco sur se aislaron de las demás sub-regiones, probablemente porque pertenecen a la población ubicada en la parte más sureña del Pánuco.

### **3.7.3 Correlación de distancias genéticas, acústicas y geográficas**

La correlación significativa entre las distancias mitocondriales y las distancias geográficas, explica por qué en la filogenia mitocondrial las cuencas hidrológicas más cercanas, Pánuco (centro y norte) y Lerma (centro) mantienen mayor similitud y se posicionan en el mismo

grupo filogenético. Mientras que Balsas y Lerma sur, que geográficamente están distantes de las demás, se posicionan en grupos filogenéticos diferentes, mostrando menor similitud con las demás cuencas. Esperábamos que los individuos de Magdalena compartieran mayor similitud genética con los individuos de Lerma centro debido a la cercanía geográfica, sin embargo la estructura genética de Magdalena parece estar dividida entre Lerma centro y Balsas (al igual que lo confirma la red de haplotipos). Por un lado la Laguna de Magdalena al ser un afluente diferente de Lerma, la separación entre ellas ha ocasionado que los individuos de Magdalena queden aislados y este aislamiento no sólo se refleja en los genes mitocondriales, también es observado en el canto. Por otra parte, el hecho de que Magdalena y Balsas compartan similitud indica que los individuos de *H. eximia*, endémicos del centro de México, se dispersaron hacia la zona norte del país, manteniendo aún la estructura de los genes maternos.

La carencia de correlación ha sido encontrada en otros hílidos y existen algunas explicaciones para ello. La primera se relaciona con el uso de marcadores, la mayoría de los estudios con hílidos han analizado sólo el ADN mitocondrial, por lo que la falta de correlación es aducida a la imprecisión del marcador para cubrir la afinidad histórica entre las poblaciones. Por ejemplo, en *Oophaga (Dendrobates) pumilio* (Pröhl *et al.*, 2007) la correlación es perdida cuando se controla por distancia geográfica, además los individuos de una población se agruparon en dos espacios acústicos diferentes, señalando que los marcadores genéticos empleados probablemente no eran capaces de indicar la correlación entre el canto y la genética. En la rana túngara (Ryan *et al.*, 1996) encontraron correlación del canto con las distancias genéticas y geográficas, pero al menos para un subgrupo la correlación con la genética fue perdida cuando se controló por otra matriz, por lo que las aloenzimas no fueron un indicador preciso. En la actualidad las técnicas moleculares han mejorado y se ha ampliado el uso de marcadores nucleares, pero los análisis aún son poco precisos. En este estudio empleamos genes mitocondriales y nucleares basándonos en estudios previos donde su uso mostraba información relevante sobre la divergencia en los hílidos, sin embargo no detectamos correlación alguna entre canto y genética, la única correlación significativa ocurrió entre las distancias mitocondrial y geográfica. Tal vez el uso de otros marcadores nucleares proporcione información diferente de la variación del



canto mediante las relaciones filogenéticas (e. g. AFLP, Klymus y Gerhardt, 2012), o probablemente cada especie requiera un marcador o una combinación de marcadores, que reflejen la historia evolutiva de los tipos de caracteres.

La segunda explicación recae en las diferencias locales en las presiones de selección, ya sea en algún atributo morfológico (e. g. el tamaño corporal en *Dendropsophus leucophyllatus* [*Hyla leucophyllata*], Loughheed *et al.*, 2006), en la eficiencia de la transmisión de la señal (relacionada con el tipo de hábitat), la selección sexual (actuando mediante mecanismos de aislamiento reproductivo), o la competencia en el ensamble de cantos (Wollerman y Wiley, 2002). El tamaño corporal es un atributo morfológico que se relaciona con algunas características del canto, especialmente con las características espectrales (Emerson, 2001; Gerhardt y Huber, 2002), llegando incluso a variar significativamente entre linajes (e. g. *Hyla arborea*, Castellano *et al.*, 2002; *Litoria genimaculata*, Hoskin *et al.*, 2005). Previamente, encontramos que entre las poblaciones de *H. eximia* el tamaño corporal no variaba significativamente, de tal forma que la variación encontrada entre las cuencas hidrológicas no puede ser atribuida a la talla corporal de los individuos. Descartamos la influencia del ambiente físico (e. g. cobertura vegetal) como causa de diferenciación acústica porque las pozas de apareamiento son pastos inundados que no presentan arbustos y apoyamos la influencia del ambiente acústico (Velásquez *et al.*, 2013), puesto que la divergencia del canto no ocurrió en cuencas donde *H. eximia* está sola- aún cuando sostienen poblaciones muy distantes- pero sí se presentó en cuencas donde coexiste con otra especie. De tal manera pensamos que la divergencia observada en el canto de las diferentes cuencas es resultado de la influencia del espacio acústico, tal como lo sostiene la gráfica de discriminantes (Capítulo I). Cuando *H. eximia* y *T. smithii* comparten la poza de apareamiento, hay una interferencia del espacio acústico (sin importar la similitud de su cantos), provocando que el canto de *H. eximia* presente una divergencia para evitar la superposición o enmascaramiento, por lo que esta variación no puede ser adjudicada a la deriva genética o al aislamiento.

## Literatura citada

- Alleaume-Benharira, M., I. R. Pen, O. Ronce. 2006. Geographical patterns of adaptation within a species' range: interactions between drift and gene flow. *Journal of Evolutionary Biology* 19: 203-215.
- Austin, J. D., J. A. Dávila, S. C. Loughheed, P. T. Boag. 2003. Genetic evidence for female-biased dispersal in the bullfrog, *Rana catesbeiana* (Ranidae). *Molecular Ecology* 12 (11): 3165-3172.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, E. Neigel, *et al.* 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Avise, J. C. 2000. Phylogeography. The History and Formation of Species. Harvard University Press: Cambridge, Massachusetts. 417 pp.
- Benson, D. A., M. Cavanaugh, K. Clark, I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, E. W. Sayers. 2012. GenBank. *Nucleic acids research*, gks1195.
- Bernal, X. E., C. Guarnizo, H. Lüddecke. 2005. Geographic variation in advertisement call and genetic structure of *Colostethus palmatus* (Anura, Dendrobatidae) from the Colombian Andes. *Herpetologica* 61 (4): 395-408.
- Bosch, J. e I. De La Riva. 2004. Are frog calls modulated by the environment? An analysis with anuran species from Bolivia. *Canadian Journal of Zoology* 82 (6): 880-888.
- Bossuyt, F., M. C. Milinkovitch. 2000. Convergent adaptive radiations in Madagascan and Asian ranid frogs reveal covariation between larval and adult traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 6585-6590.
- Boul, K. E., W. C. Funk, C. R. Darst, D. C. Cannatella, M. J. Ryan. 2007. Sexual selection drives speciation in an Amazonian frog. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 274 (1608): 399-406.
- Brown, W. L. y E. O. Wilson. 1956. Character Displacement. *Systematic zoology* 5: 49-64.

- Brown, J. H., G. C. Stevens, D. M. Kaufman. 1996. The geographic range: size, shape, boundaries, and internal structure. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27: 597-623.
- Bryson, Jr., R. W., A. Nieto- Montes de Oca, J. R. Jaeger, B. R. Riddle. 2010. Elucidation of cryptic diversity in a widespread Nearctic treefrog reveals episodes of mitochondrial gene capture as frogs diversified across a dynamic landscape. *Evolution* 64: (8) 2315-2330.
- Castellano, S., B. Cuatto, R. Rinella, A. Rosso, C. Giacoma. 2002. The advertisement call of the european treefrogs (*Hyla arborea*): a multilevel study of variation. *Ethology* 108 (1): 75-89.
- Chek, A. A., S. C. Lougheed, J. P. Bogart, P. T. Boag. 2001. Perception and history: molecular phylogeny of a diverse group of Neotropical frogs, the 30-chromosome *Hyla* (Anura: Hylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18: 370-385.
- Clement, M., D. Posada, K. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9 (10): 1657-1660.
- Coyne, J. A. y H. A. Orr. 2004. Speciation. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, U. S. A. 545 pp.
- Crawford, A. J. 2003. Huge populations and old species of Costa Rican and Panamanian dirt frogs inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Ecology* 12 (10): 2525-2540.
- Earl, D. A. y B. M. vonHoldt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 (2) pp. 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Emerson, S. 2001. Male advertisement calls: behavioural variation and physiological processes. En: Ryan, M. (ed.). Anuran Communication. Smithsonian Institution Press, Washington y London, pp. 36-44.

- Endler, J. A. 1977. *Geographic Variation, Speciation and Clines*. Princeton University Press, Princeton, Nueva Jersey. 246 pp.
- Evanno, G., S. Regnaut, J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14 (8): 2611–2620. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Excoffier, L. y H. E. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3. 5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- Faivovich, J., C. F. B. Haddad, P. C. A. Garcia, D. R. Frost, J. A. Campbell, W. C. Wheeler. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hyliinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 294: 1-240.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17: 368–376.
- Fitzpatrick, B. M., J. A. Fordyce, S. Gavrilets. 2009. Pattern, process and geographic modes of speciation. *Journal of Evolutionary Biology* 22: 2342-2347.
- Funk, D. J. y K. E. Omland. 2003. Species-level paraphyly: frequency, causes and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 34: 397-423.
- Gamble, L. R., K. MacGarigal, B. W. Compton. 2007. Fidelity and dispersal in the pond-breeding amphibian, *Ambystoma opacum*. Implications for spatio-temporal population dynamics and conservation. *Biological Conservation* 139 (3-4): 247-257.
- Gerhardt, H. C. 1994. Reproductive character displacement of female mate choice in the grey treefrog, *Hyla chrysoscelis*. *Animal Behaviour* 47 (4): 959-969.

- Gerhardt, H. C. y F. Huber. 2002. Acoustic Communication in Insects and Anurans. Common Problems and Diverse Solutions. The University of Chicago Press, Chicago and London. 531 pp.
- Gaston, K. J. 1996. Species-range-size distributions: patterns, mechanisms and implications. *Trends in Ecology and Evolution* 11 (5): 197-201.
- Gesundheit, P. y C. Macías-García. 2005. Biogeografía cladística de la familia Goodeidae. Cap. 19 En: Llorente –Bousquets, J y J. J. Morrone (eds.). Regionalización Biogeográfica en Iberoamérica y Tópicos Afines: Primeras Jornadas Biogeográficas de la Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática (RIBES XII.I-CYTED). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. 319-338. ISBN-970-32-2509-8, pp. 319-338.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- Höbel, G. y H. C. Gerhardt. 2003. Reproductive character displacement in the acoustic communication system of green tree frog (*Hyla cinerea*). *Evolution* 57 (4): 894-904.
- Hoskin, C. J. y M. Higgie. 2010. Speciation via species interactions: the divergence of mating traits within species. *Ecology Letters* 13: 409-420.
- Hoskin C. J., M. Higgie, K. R. McDonald, C. Moritz. 2005. Reinforcement drives rapid allopatric speciation. *Nature* 437: 1353-1356.
- Jang, Y., E. H. Hahm, H. J. Lee, S. Park, Y. J. Won, J. C. Choe. 2011. Geographic variation in advertisement calls in a tree frog species: gene flow and selection hypotheses. *PloS one* 6 (8): e23297.
- Jeanmougin, F., J. D. Thompson, M. Gouy, D. G. Higgins, T. J. Gibson. 1998. Multiple sequence alignment with ClustalX. *Trends in Biochemical Sciences* 23:403-405.

- Joly, S., M. I. Stevens, B. J. Van Vuuren. 2007. Haplotype networks can be misleading in the presence of missing data. *Systematic Biology* 56 (5): 857-862.
- Kime, N. M., W. R. Tuner, M. J. Ryan. 2000. The transmission of advertisement calls in Central American frogs. *Behavioral Ecology* 11: 71-83.
- Kimura, M. 1994. Population Genetics, Molecular Evolution, and the Neutral Theory: Selected papers. University of Chicago Press, Chicago. 686 pp.
- Kirkpatrick, M. y N. H. Barton. 1997. Evolution of species' range. *The American Naturalist* 150 (1): 1-23.
- Klymus, K. E, S. C. Humfeld, V. T. Marshall, D. Cannatella, H. C. Gerhardt. 2010. Molecular patterns of differentiation in canyon treefrogs (*Hyla arenicolor*): evidence for introgressive hybridization with the Arizona treefrog (*H. wrightorum*) and correlations with advertisement call differences. *Journal of Evolutionary Biology* 23 (7): 1425-1435.
- Lampert, K.P., A. S. Rand, U. G. Mueller, M. J. Ryan. 2003. Fine-scale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the túngara frog, *Physalaemus pustulosus*. *Molecular Ecology* 12 (12): 3325-3334.
- Librado, P. y J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Lougheed, S. C., J. D. Austin, J. P. Bogart, P. T. Boag, A. A. Chek. 2006. Multi-character perspectives on the evolution of intraspecific differentiation in a neotropical hylid frog. *BMC Evolutionary Biology* 6: 23.
- Marie, C. S. N., R. Butlin, A. DeBelle, C. Kerth, R. Snook, *et al.* 2012. What do we need to know about speciation? *Trends in Ecology and Evolution* 27(1): 27-39.
- Monsen, K. J. y M. S. Blouin. 2004. Extreme isolation by distance in a montane frog *Rana cascadae*. *Conservation Genetics* 5: 827-835.

- Moritz, C., T. Uzzell, S. Spolsky, H. Hotz, I. Darevsky, L. Kupriyanova, F. Danielyan. 1992. The material [sic maternal] ancestry and approximate age of parthenogenetic species of caucasian rock lizards (Lacerta: Lacertidae). *Genetica* 87: 53–62.
- Morrone, J. 2004. Panbiogeografía, componentes bióticos y zonas de transición. *Revista Brasileira de Entomología* 48 (2): 149-162.
- Palo, J. U., D. Lesbarrères, D. S. Schmeller, C. R. Primmer, J. Merilä. 2004. Microsatellite marker data suggest sex-biased dispersal in the common frog *Rana temporaria*. *Molecular Ecology* 13 (9): 2865-2869.
- Pilliod, D. S., C. R. Peterson, P. I. Ritson. 2002. Seasonal migration of Columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) among complementary resources in a high mountain basin. *Canadian Journal of Zoology* 80 (11): 1849-1862.
- Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25(7): 1253-1256.
- Pritchard J. K, M. Stephens, P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Pröhl, H., R. A. Koshy, U. Mueller, A. S. Rand, M. J. Ryan. 2006. Geographic variation of genetic and behavioral traits in northern and southern Túngara frogs. *Evolution* 60 (8): 1669-1679.
- Pröhl, H., S. Hagemann, J. Karsch, G. Höbel. 2007. Geographic variation in male sexual signals in strawberry poison frogs (*Dendrobates pumilio*). *Ethology* 113: 825-837.
- R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL.<http://www.R-project.org/>.
- Rokas, A., E. Ladoukakis, E. Zouros. 2003. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology and Evolution* 18 (1): 411-417.
- Ryan, M. J., A. S. Rand, L. A. Weigt. 1996. Allozyme and advertisement call variation in the Túngara frog, *Physalaemus pustulosus*. *Evolution* 50 (6): 2435-2453.

- Semlitsch, R. D. 2008. Differentiating migration and dispersal processes for pond-breeding amphibians. *The Journal of Wildlife Management* 72 (1): 260-267.
- Slatkin, M. 1978. Spatial patterns in the distributions of polygenic characters. *Journal of Theoretical Biology* 70 (2): 213-228.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47 (1): 264-279.
- Stöck, M., A. Horn, C. Grossen, D. Lindtke, R. Sermier, C. Betto-Colliard, C. Dufresnes, E. Bonjour, Z. Dumas, E. Luquet, T. Maddalena, H. C. Sousa, I. Martinez-Solano, N. Perrin. 2011. Ever-young sex chromosomes in European tree frogs. *PLoS Biology*. 9 (5): E1001062.
- Stöck, M., S. Dubey, C. Klutsch, S. N. Litvinchuk, U. Scheidt, N. Perrin. 2008. Mitochondrial and nuclear phylogeny of circum-Mediterranean tree frogs from the *Hyla arborea* group. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49(3): 1019- 1024.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Toews, D. P. y A. Brelsford. 2012. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology* 21: 3907-3930.
- Velásquez, N. A., J. Marambio, E. Brunetti, M. A. Méndez, R. A. Vásquez, M. Penna. 2013. Bioacoustic and genetic divergence in a frog with a wide geographical distribution. *Biological Journal of the Linnean Society* 110 (1): 142-155.
- Vences, M. y F. Glaw. 2002. Molecular phylogeography of *Boophis tephraeomystax*: a test case for east-west vicariance in Malagasy anurans (Amphibia, Anura, Mantellidae). *SPIXIANA* 25 (1): 79-84.



- Vences, M., M. Thomas, R. M. Bonett, D. R. Vieites. 2005. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences* 360: 1859-1868.
- Vieites, D. R., K. C. Wollenberg, F. Andreone, J. Köhler, F. Glaw, M. Vences. 2009. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (20): 8267-8272.
- Wiens, J. J., J. W. Fetzner, C. L. Parkinson, T. W. Reeder. 2005. Hylid frog phylogeny and sampling strategies for speciose clades. *Systematic Biology* 54 (5): 778-807.
- Wollerman, L. y R. H. Wiley. 2002. Possibilities for error during communication by neotropical frogs in a complex acoustic environment. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 52: 465-473.
- Wycherley, J., S. Doran, T. J. C. Beebee. 2002. Frog calls echo microsatellite phylogeography in the European pool frog (*Rana lessonae*). *Journal of Zoology* 258 (4): 479-484.
- Zeisset, I. y T. J. C. Beebee. 2008. Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity* 101: 109-119.
- Zink, R. M. y G. Barrowclough. 2008. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular Ecology* 17: 2107-2121.

## Anexo 1. Haplotipos de genes mitocondriales y nucleares.

Se muestran los 30 haplotipos encontrados para los genes concatenados mitocondriales, únicamente se observan los sitios variables entre haplotipos, sitios invariables y gaps fueron eliminados.

Hap\_1

CTGTGTGACTCGCCTATCTTCCCTTGTGGGACTCACCCCTACGATATCTTGCCCTCTTATATCGCGATAGCGACGGGGATC  
CTAACTCATGCGGGCAGAAAAGG

Hap\_2

CTGTGTGACTCGCCTATCTTCCCTTGTAGGACTCACGCCTACAATATCTAGCCTCCTCTATACCGCGATGGCGCGGGGAT  
CCTAACCCATGCGGGCAGAAAAGC

Hap\_3

CTGTGTGACTCGCCTATCTTCCCTTGTAGGACTCACGCCTACAACATCTAGCCTCCTTTATATCGCGATGGCGACGGGGATC  
CTAACTCATGCGGGCAGAAAAG

Hap\_4

CTGTGTGACTCGCCTATCTTCCCTTGTAGGACTCACGCCTACAATATCTAGCCTCCTTTATACCGCGATGGCGACGGGGATC  
CTAACTCATGCGGGCAGAAAAGG

Hap\_5

CTGTGTGACTCGCCTATCTTCCCTTGTAGGACTCACGCCTACAATATCCAGCCTCCTTTATACCGCGATGGCGACGGGGAT  
CCTAACTCATGCGGGCAGAAAAGC

Hap\_6

CTGTGTGACTCGCCTATCTTCCCTTGTAGGACTCACGCCTACAATATCTAGCCTCCTTTATACCGCGATGGCGACGGGGATC  
CTAACTCATGCGGGCAGAAAAGC

Hap\_7

CTGTGTGACTCGCCTATCTCCTTGTAGGACTCACGCCTACAATATCTAACCTCCTTTATACCGCGATGGCGACGGGGATC  
CTAACTCATGCGGGCAGAAAAGG

Hap\_8

CTGCGTGGCTCGCCTATCTTCCCTCGTAGGACTCACGCCTACAATATCTAGCCTCCTTTATATCGCGATGGCGACGGGGAT  
CCTAACTCATGCGGGCAGAAAAGG

Hap\_9

CTGTGTGACTCGCCTATCATCCCTTGTGGGGCTCACGCCTACAATATCTAGCCTCCTTTATATCGCGATGGCGACGGGGAT  
CCTAACTCATGCGGGCAGAAAAGG

Hap\_10

CTGTATAATTTATCTGCCTTCTCTGCAAGATCTACGCCCATAGCATCTTGCTTCTTATACCGCGACGGTGACAGAAGTT  
TCAATTCATGCGAGCACGGGAG

Hap\_11

CTGTGTGACTCGCCTATCTTCCCTTGTAGGACTCACGCTTACAATGTCTAGCCTCCTTTATACCGCGATGGCGACGGGGATC  
CTAACTCATAAGACGGAAAAGC

Hap\_12

CTGTATAATTTATCTACCTTCTCTGTAAGATCTACGCCCATAGCATCTTGCTTCTTATACCGCAACGGTGACAGGAGTT  
TCAATTCATGCGGGCAGGGAG

Hap\_13  
CTGTGTAACCTCGCCTATCTTCCCTTGTAGGACTCACGCTTACAATGTCTAGCCTCCTTTATACCACGATGGCGACGGGGATC  
CTAACTCATGCAGGCAGAAAAG

Hap\_14  
ATGTATAATTTATCTACCTTTCTCTGCAAGATCTACGCCATAGCATCTTGGCTTCCTTGTACCGCAACGGTGACAGGAGTT  
TCAATTCATGCGGGCACGGGAG

Hap\_15  
CTGTGTGACTCGCCTATCTCCTTGTAGGACTCACGCCTACAATATCTAACCTCCTTTATACCGCGATGGCGACGGGGATC  
CTAACTCATGCGGGCAGAAAAG

Hap\_16  
CTGTGTGACTCGCCTATCTCCTTGTAGGACTCACGCCTACAATATCTAACCTCCTTTATACCGCGATGGCGACGGGGATC  
CTAACTCATGCGGGCAGAAAAG

Hap\_17  
CTGTGTGACTCGCCTATCTTCCCTTGTAGGACTCACGCCTACAATATCTTGCTCCTTTATACCGCGATGGCGACGGGGATC  
CTAACTCATGCGGGCAGAAAAG

Hap\_18  
CTGTGTGACTCGCCTATCTTCTTGTAGGACTCACGCCTACAATATCTAGCCTCCTTTATACCGCGATGGCGACGGGGATC  
CTAACTCATGCGGGCAGAAAAG

Hap\_19  
CTGTACAATTTGTTTCAATTTTCTTTATAGGACTTGCGTTCGCAATACTTAGGTCTTTTCAAACCTGCGGTAACAATAAGGACT  
TTGGTTCACGCGGGAACGGAGG

Hap\_20  
CCGTACAATTTGTTTCAATTTTCTTTATAGAACTTGCGTTCGCAATACTTAGCTTTTCTTATACTGCGGTAACAATAAGGACT  
TTGGTTCACGCGGGAACGGAAAG

Hap\_21  
CCGTACAATTTGTTTCAATTTTCTTTATAGGACTTGCGTTCGCAATACTTAGCTTTTCTTATACTGCGGTAACAATAAGGACT  
TTGGTTCACGCGGGAACGGAGC

Hap\_22  
CTGTGTGACTCGCCTATCTTCCCTTGTGGGACTCATGCCTACAATATCTAGCCTCCTTTATACCGTGATGGCGACGGGGATC  
CTAACTCATGCAGGCAGAAAAG

Hap\_23  
CTATGTCACCTCGCCTATCTTCCCTTGTAGGACTCACGCCTACAATATCTTGCTCCTTTATATCGCGATGGCGACGGGGATC  
CTAACTCATGCGGGCAGAAAAG

Hap\_24  
CTATGTCACCTCGCCTATCTTCCCTTGTAGGACTCACGCCTACAATATCTTGCTCCTTTATACCGCGATGGCGACGGGGATC  
CTAACTCATGTAGGCAGAAAAG

Hap\_25  
CTGTGTGACCCGCCTATCTTCCCTTGTAGGACTCACGCTTACAATGTCTAGCCTCCTTTATACCACGATGGCGACGGGGATC  
CTAACTTATGCAGGCGGAAAAG

Hap\_26  
CTGTGTGACTCGCCTATCTTCCCTTGTAGGACTCACGCCTACAATATCTAGCCTCCTTTATGTCGCGATGGCGACGGGGATC  
CTAACTCGTGCGGCAGAAAAG

Hap\_27  
CTGTGTGACTCGCCTATCTTCCCTTGTAGGACTCACGCTTACAATGTCTAGCCTCCTTTATACCACGATGGCGACGGGGATC  
CTAACTCATGCAGGCAGAAAAG

Hap\_28

CTGTGTGACTCGCCTATCTTCCCTTGTAGGACTCAGCCTACAATATCTAGCCTCCTCTATACCGCGATGGCGGCGGGGAT  
CCTAACCCATGCGGGTAGAAAAGG

Hap\_29

CTGTGTGACTCGCCTATCTTCCCTTGTAGGACTCAGCCTACAATGTCTAGCCTCCTTATACCACGATGGCGACGGGGATC  
CTAACTTATGCAGGCGGAAAAGG

Hap\_30

CTGTGTGACTCGCCTATCTTCCCTTGTAGGACTCAGCCTACAATATCTAGCCTCCTCTATACCGCGATGGCGGCGGGGAT  
CCTAACCCATGCGGGTAGAAAAGC

Se muestran los 25 haplotipos encontrados para los genes concatenados nucleares, únicamente se observan los sitios variables entre haplotipos, sitios invariables y gaps fueron eliminados.

Hap\_1 CCCCCGCGACAGGCCACTACGGATCCAACGCCAACCCCCGCGACAGGCCACTACGGATCCAACGCCAA  
Hap\_2 CCGCCGCGTCGGGCCACTACAAGTCCAACGCCGCCGCGTCGGGCCACTACAAGTCCAACGCCGG  
Hap\_3 CCGCCGCGTGGGTCCACTAAGGGTCCAACGCCAACCGCCGCGTGGGTCCACTAAGGGTCCAACGCCAA  
Hap\_4 CCCCCGCGTGAGGCCACGACGGGTGCAACGTCAACCCCCGCGTGAGGCCACGACGGGTGCAACGTCAA  
Hap\_5 CCGCCGCGTCAGGCCACTAAGGATCCAACATCAACCGCCGCGTCAGGCCACTAAGGATCCAACATCAA  
Hap\_6 CCCCCGCGTCAGGCCGCTACGGGTGCAACGCCAACCCCCGCGTCAGGCCGCTACGGGTGCAACGCCAA  
Hap\_7 CCCCCGCGTGGGTCCACTAAGGGTCCAACGCCAACCCCCGCGTGGGTCCACTAAGGGTCCAACGCCAA  
Hap\_8 CTGCCGCGTCGGTCCACTACGGATCCAACGCCAACTGCCGCGTCGGTCCACTACGGATCCAACGCCAA  
Hap\_9 CCCCCGCGTCAGGCCACTACGGATCCGACGCCAACCCCCGCGTCAGGCCACTACGGATCCGACGCCAA  
Hap\_10 CCGCCGCGTGGGGCCACTACGGATCCAACGCCAACCGCCGCGTGGGGCCACTACGGATCCAACGCCAA  
Hap\_11 CCCCCGCGTCAGGCCACTACGGTCCGACGCCAACCCCCGCGTCAGGCCACTACGGTCCGACGCCAA  
Hap\_12 CCGCCGCGTCAGTCCACTACGGATCCGACGCCAACCGCCGCGTCAGTCCACTACGGATCCGACGCCAA  
Hap\_13 CCCCCGCGTGGGTCCACGACGGGTGCAACGTCAACCCCCGCGTGGGTCCACGACGGGTGCAACGTCAA  
Hap\_14 CCCCCGCGTGGGTCCACTAAGGGTCCGACGCCAACCCCCGCGTGGGTCCACTAAGGGTCCGACGCCAA  
Hap\_15 CCCCCGTGTCGAGTCACTACGGACCCAACGCCAACCCCCGTGTCGAGTCACTACGGACCCAACGCCAA  
Hap\_16 CCCCCACGTGGGTCCAGTACGGTCCAACGCCAACCCCCACGTGGGTCCAGTACGGTCCAACGCCAA  
Hap\_17 CTCTCGCGTGAGGCCAGTATGGGTGCACTGCCAACTCTCGCGTGAGGCCAGTATGGGTGCACTGCCAA  
Hap\_18 TTCTCGCATGAGGCCACTATGGATGTACCGCCAATCTCGCATGAGGCCACTATGGATGTACCGCCAA  
Hap\_19 CTCTCGCGTCAGGCCAGTACGGATGCACCGCCAATCTCGCGTCAGGCCAGTACGGATGCACCGCCAA  
Hap\_20 CCCCCGCGTGGGGCCACTACGGGTGCAACGCCAACCCCCGCGTGGGGCCACTACGGGTGCAACGCCAA  
Hap\_21 CTGCTGCGTCGGGCCACTACGGATCCAACGCCAACTGCTGCGTCGGGCCACTACGGATCCAACGCCAA  
Hap\_22 CTGCCGCGTGGGGCCACTCCCGATCCAACGCCGACTGCCGCGTGGGGCCACTCCCGATCCAACGCCGA  
Hap\_23 CCCCCGCGTGAGGCCAGTCCGGTCCAACGCCGACCCCCGCGTGAGGCCAGTCCGGTCCAACGCCGA  
Hap\_24 CCGCCGCGTCGGGCTACTACGGGTGCAACGCTAACCGCCGCGTCGGGCTACTACGGGTGCAACGCTAA  
Hap\_25 CCCCCGCGTGAGGCCACTCCGGTGAACGCCAACCCCCGCGTGAGGCCACTCCGGTGAACGCCAA

Anexo 2. Secuencias obtenidas de la base de datos del GenBank.

**cyt-b**

- 1 Hyla arborea gi|324497581|gb|JF31 908
- 2 Hyla arborea gi|324497583|gb|JF318120.1|
- 1 Hyla intermedia gi|324497589|gb|JF318123.1|
- 3 Hyla arborea gi|324497585|gb|JF318121.1
- 2 Hyla intermedia gi|324497591|gb|JF318124.1|
- 3 Hyla intermedia gi|324497593|gb|JF318125.1

**ATP**

- |                    |            |
|--------------------|------------|
| Hyla squirella     | FJ227035.1 |
| Hyla cf intermedia | FJ227034.1 |
| Hyla arborea       | FJ227031.1 |

**POMC**

- |                   |            |         |
|-------------------|------------|---------|
| *Hyla eximia      | AY819118.1 | Arizona |
| Hyla euphorbiacea | HM152406.1 |         |
| Hyla cinerea      | AY819116.1 |         |
| Hyla squirella    | AY819128.1 |         |

**Rho**

- |                 |            |
|-----------------|------------|
| Hyla wrightorum | GU944719.1 |
|-----------------|------------|

Hyla euphorbiacea	AY844606.1	
*Hyla eximia	GU944718.1	canyon tree frogs
Hyla squirella	AY844670.1	
Hyla cinerea	AY844597.1	
Hyla arborea	AY844575.1	

Las secuencias de \**H. eximia* probablemente corresponden a *H. wrightorum*, fue determinada como *H. eximia* ya que anteriormente se consideraba que la distribución de *H. eximia* llegaba hasta el sur de Estados Unidos.

#### 4. DISCUSIÓN GENERAL

Hemos observado que el análisis del canto por composición del coro no mostró divergencia en algún atributo. Sin embargo, los promedios de los atributos indican que el canto de *Hyla eximia* llega a ser más largo, con menor número y tasa de pulsos en pozas donde coexiste con *Hyla arenicolor*. Mientras que cuando coexiste con *Tlalocohyla smithii*, el intervalo entre cantos es mayor, aunado a un cambio evidente en la frecuencia dominante y la frecuencia pico del pulso. Considerando que las zonas simpátricas actuales no están reflejando variación alguna en el canto de anuncio, analizamos los cantos a nivel de cuencas hidrológicas, nivel que podría ser más representativo de los múltiples contactos entre las especies a lo largo de sus expansiones geográficas. Los nuevos resultados indicaron que ocurre desplazamiento de caracteres reproductivos en *H. eximia* en las cuencas donde coexiste con *T. smithii* (Balsas y Magdalena), resultado que hemos aducido a la interferencia acústica. Las notas del canto de *T. smithii* son más largas y son producidas a una frecuencia alta, por lo que pueden enmascarar fácilmente al canto de *H. eximia*. Los machos de *H. eximia* modifican la duración del canto, el intervalo entre cantos, el número de pulsos (función discriminante 1) y la frecuencia dominante (función discriminante 2), asegurando que las hembras coespecíficas reciban la señal y ocurra apareamiento concordante.

La variación del canto también podría ser resultado de diferenciación morfológica sobre los atributos que influyen en la producción del canto (e. g. el tamaño corporal en *Dendropsophus leucophyllatus*, Loughheed *et al.*, 2006; ver también Emerson, 2001; Gerhardt y Huber, 2002; Castellano *et al.*, 2002; Hoskin *et al.*, 2005). Sin embargo, en un análisis previo no encontramos diferencias significativas en el tamaño corporal entre poblaciones de *H. eximia*, así descartamos que la variación en los cantos, encontrada entre cuencas hidrológicas, se deba a diferencias de este atributo morfológico.

Otras posibles causas de diferenciación del canto incluyen las diferencias locales en el ensamble de cantos (Wollerman y Wiley, 2002), en la eficiencia de la transmisión de la señal (relacionada con el tipo de hábitat), o en la selección sexual (actuando a través de mecanismos de aislamiento reproductivo). La primera causa es compatible con nuestra

explicación de la diferenciación del canto de *H. eximia* para evitar el enmascaramiento por los cantos de *T. smithii*. Mientras que la falta de diferenciación en las cuencas donde *H. eximia* no coexiste con *T. smithii* argumenta en contra de las otras causas, pues al ser cuencas que cubren una mayor área geográfica y presuntamente son ambientalmente variables, se esperaría divergencia en el canto, lo cual no ocurrió. Así provisionalmente concluimos que la variación geográfica en los cantos de anuncio de *H. eximia* en las pozas de apareamiento de las cuencas del Balsas y Magdalena, se debe al desplazamiento de caracteres reproductivos ocasionado por la interferencia acústica y la similitud morfológica con la especie relacionada, *T. smithii*.

El análisis filogenético mitocondrial concuerda con la distribución geográfica de las poblaciones, mostrando cuatro linajes en la especie *H. eximia*. A pesar de que las relaciones de los individuos tienen un bajo soporte por los valores de bootstrap, existe una estructura geográfica evidente. La filogenia mitocondrial sugiere que las poblaciones que conforman nuestra muestra se originaron en el sureste de la distribución actual de la especie y fueron expandiendo su rango como las manecillas del reloj, colonizando lo que ahora es el Balsas, llegando a Magdalena por medio del Río Ameca, y expandiéndose hacia el Lerma mediante el centro (que es la parte más baja de esta cuenca), de ahí podrían haber alcanzado a la parte norte (Río Santiago) y sur de Lerma y finalmente se distribuyeron en la parte central y superior del Pánuco (Figura 1). La hipótesis filogeográfica publicada de *H. arenicolor* incluye pocas secuencias de *H. eximia* y cubre una porción limitada de su distribución, de manera que no existe una hipótesis filogeográfica para esta especie que pueda ser extraída (ver Bryson *et al.*, 2010; Klymus y Gerhardt, 2012). Por lo tanto proponemos provisionalmente el siguiente escenario filogeográfico de *H. eximia* basados en nuestra mejor reconstrucción mitocondrial resuelta.

La población más basal fue la de Hidalgo, cerca de la cuenca cerrada de los Llanos de Apan. Ésta actualmente forma parte de la cuenca del Pánuco, pero estuvo unida a la cuenca de la Ciudad de México en el Pleistoceno Tardío (ver Barbour, 1973), y a su vez pudo haber drenado hacia el sur intermitentemente a través del Balsas, durante el Terciario (Mooser, 1975), proporcionando un vínculo potencial entre las poblaciones de *H. eximia* en el sureste del Pánuco (actualmente) y la cuenca del Balsas. La presencia de un haplotipo de



Magdalena (cuenca del Río Ameca) en el clado mitocondrial sureste basal de *H. eximia* puede explicarse por la conectividad entre el Balsas y las corrientes del Ameca durante el Pleistoceno (ver la distribución del género Goodeido *Ilyodon* en Weeb *et al.*, 2004), lo cual también puede ser responsable de la presencia de *T. smithii* en Balsas y Magdalena. La composición del clado B sugiere que *H. eximia* puede haber alcanzado la cuenca del Lerma a través de la conexión entre Lerma y Ameca (Magdalena) durante el Pleistoceno. Del centro de Lerma las especies pueden haber colonizado la cuenca entera; es decir, la sección norte (Santiago) de la cuenca Lerma-Santiago, y la parte sur o alto Lerma, como fue sugerido por la presencia de individuos de todas las subregiones del Lerma en el clado C. El clado mitocondrial más reciente (D) incluye individuos del Pánuco norte y centro, y de Lerma centro, lo cual sugiere que *H. eximia* alcanzó al Pánuco a partir del Lerma centro donde la cuenca separó su superficie permitiendo a la fauna herpetológica moverse entre las dos (ver Manjarrez *et al.*, 2013), más que moverse hacia el norte de la región de Apan. Acorde con este escenario, la ausencia de desplazamiento de caracteres reproductivos entre *H. eximia* y *H. arenicolor* en las áreas del centro y norte de la cuenca del Pánuco, podría ser explicado porque las especies entran en contacto ahí recientemente, aunque esto no explica la carencia de desplazamiento en el Pánuco sur. Debido a que la hipótesis filogeográfica actual no distingue entre las subregiones del Pánuco (Bryson *et al.*, 2010; Klymus y Gerhardt, 2012), no podemos aclarar si esta área corresponde a una zona de contacto reciente o antigua.

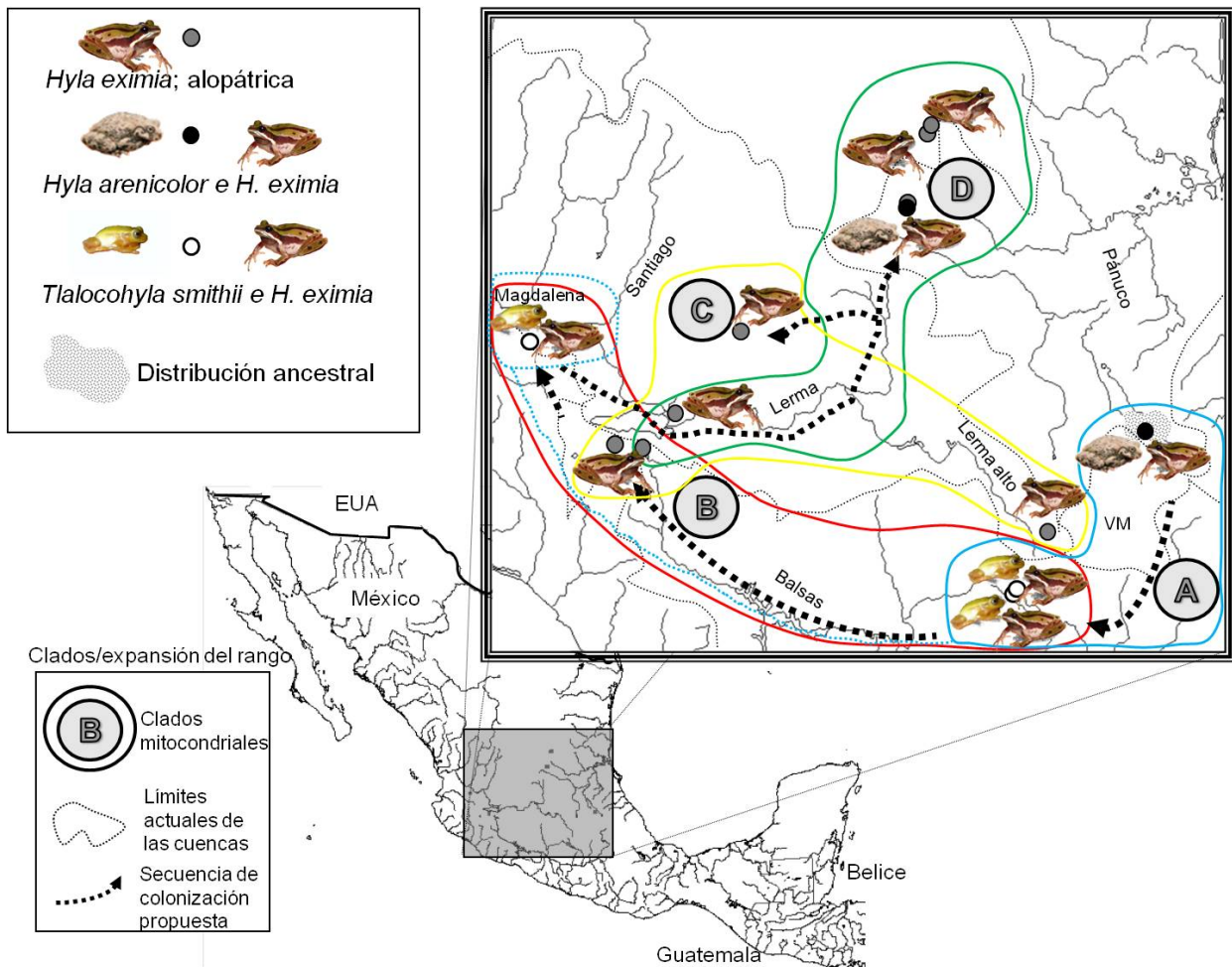


Figura 1. Hipótesis filogeográfica basada en clados mitocondriales. Los círculos indican las poblaciones, color gris para *H. eximia* alopátrica, color negro para la población simpátrica de *H. eximia* e *H. arenicolor*, color blanco para la población simpátrica de *H. eximia* y *T. smithii*. Las letras mayúsculas y las líneas a color señalan los clados mitocondriales encontrados en el árbol filogenético mitocondrial. Las flechas negras punteadas muestran la posible expansión geográfica de las poblaciones. Los nombres de las cuencas hidrológicas están ubicados sobre su cauce y VM indica el Valle de México.

La divergencia del canto entre las regiones de nuestra muestra no puede ser aleatoria (e. g. causada por deriva); está soportada por la filogenia mitocondrial y la estructura poblacional, aunque no se correlacione con las distancias genéticas o geográficas. La ausencia de la correlación entre la distancia acústica y la genética ha sido reportada en otros estudios de anuros. Por ejemplo, en *Oophaga pumilio* (antes *Dendrobates*, Pröhl *et al.*,

2007), la correlación es perdida cuando el análisis es controlado por la distancia geográfica, y un efecto similar ocurre en algunas poblaciones de la rana Túngara *Engystomops pustulosus* (antes *Physalaemus*, Ryan *et al.*, 1996). Estos resultados quizás no son sorprendentes, dado que la elección de pareja es la fuerza que forma más efectivamente a los atributos del canto, y es más efectiva cuando los errores son penalizados, como ocurre en las zonas híbridas. Así, podríamos esperar una divergencia del canto mayor entre poblaciones cuando al menos en alguna de ellas sea favorecido el desplazamiento de caracteres reproductivos (Pfennig y Pfennig, 2010), que entre poblaciones que son geográficamente distantes pero no se enfrentan a la interferencia del canto de apareamiento. Además, descartamos la posibilidad de que existiera una correlación entre la distancia acústica y genética que no fuera detectada, ya que contamos con muestras de canto adecuadas y como era de esperarse, la distancia genética mitocondrial se correlacionó con la distancia geográfica (Cuadro 5), por lo que es probable que nuestra proyección genética esté libre de sesgo.

## Literatura citada

- Barbour, C. D. 1973. A biogeographical history of *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae): a species folk from the Mexican Plateau. *Copeia* 3: 533-556.
- Bryson, Jr., R. W., A. Nieto- Montes de Oca, J. R. Jaeger, B. R. Riddle. 2010. Elucidation of cryptic diversity in a widespread Nearctic treefrog reveals episodes of mitochondrial gene capture as frogs diversified across a dynamic landscape. *Evolution* 64: (8) 2315-2330.
- Castellano, S., B. Cuatto, R. Rinella, A. Rosso, C. Giacoma. 2002. The advertisement call of the european treefrogs (*Hyla arborea*): a multilevel study of variation. *Ethology* 108 (1): 75-89.
- Emerson, S. 2001. Male advertisement calls: behavioural variation and physiological processes. En: Ryan, M. (ed.). *Anuran Communication*. Smithsonian Institution Press, Washington y London, pp. 36-44.
- Gerhardt, H. C. y F. Huber. 2002. *Acoustic Communication in Insects and Anurans. Common Problems and Diverse Solutions*. The University of Chicago Press, Chicago and London. 531 pp.
- Hoskin C. J., M. Higgie, K. R. McDonald, C. Moritz. 2005. Reinforcement drives rapid allopatric speciation. *Nature* 437: 1353-1356.
- Klymus, K. E. y H. C Gerhardt. 2012. AFLP markers resolve intra-specific relationships and infer genetic structure among lineages of the canyon treefrog, *Hyla arenicolor*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 654-667.
- Lougheed, S. C., J. D. Austin, J. P. Bogart, P. T. Boag, A. A. Chek. 2006. Multi-character perspectives on the evolution of intraspecific differentiation in a neotropical hylid frog. *BMC Evolutionary Biology* 6: 23.
- Manjarrez, J., C. Macías-García, H. Drummond. 2013. Variation in the diet of the mexican black-bellied gartersnake *Thamnophis melanogaster*: Importance of prey availability and snake body size. *Journal of Herpetology* 47 (3): 413-420.

- Mooser, F. 1975. Historia geológica de la cuenca de México. En: Departamento del Distrito Federal (ed.). Memoria de las Obras del Sistema de Drenaje Profundo del Distrito Federal. México, D. F, pp. 7-38.
- Pfffenig, D. W., K. S. Pfffenig. 2010. Character displacement and the origins of diversity. *The American Naturalist* 176 (1): S26-S44.
- Pröhl, H., S. Hagemann, J. Karsch, G. Höbel. 2007. Geographic variation in male sexual signals in strawberry poison frogs (*Dendrobates pumilio*). *Ethology* 113: 825-837.
- Ryan, M. J., A. S. Rand, L. A. Weigt. 1996. Allozyme and advertisement call variation in the Túngara frog, *Physalaemus pustulosus*. *Evolution* 50 (6): 2435-2453.
- Weeb, S. A., J. A. Graves, C. Macías-García, A. E. Magurran, D. O. Foighil, M. G. Ritchie. 2004. Molecular phylogeny of the livebearing Goodeidae (Cyprinodontiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30 (3): 527-544.
- Wollerman, L. y R. H. Wiley. 2002. Possibilities for error during communication by neotropical frogs in a complex acoustic environment. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 52: 465-473.

## **Apéndice A. ELECCIÓN DE PAREJA EN *Hyla eximia***

### **A. 1 RESUMEN**

En las poblaciones simpátricas de anuros la similitud de los cantos de anuncio y la interferencia acústica pueden ocasionar consecuencias negativas en la respuesta de las hembras, así el canto y la respuesta deben evolucionar a la par para que la reproducción sea exitosa. Pese a las características selectivas de las hembras, en poblaciones naturales se enfrentan a un ambiente acústico complejo, donde tienen que elegir entre machos coespecíficos y evadir a los heteroespecíficos. En este capítulo investigamos si la elección de las hembras está fijada fuertemente al macho coespecífico, sobre todo en las poblaciones simpátricas donde se enfrentan al canto de las otras especies. Encontramos que de las hembras de *H. eximia* expuestas a prueba, la mayoría realizaron una elección y siempre eligieron al estímulo coespecífico, ninguna eligió al heteroespecífico. Las hembras que realizaron elección en su mayoría provenían de poblaciones simpátricas, solo dos correspondían a poblaciones alopátricas. Fue notable que las hembras que están expuestas al canto de *H. arenicolor* respondieron más al estímulo coespecífico, en comparación con las hembras que coexisten con *T. smithii* o que pertenecen a las poblaciones alopátricas. Estos resultados son un indicio de que aunque la distribución geográfica de estas tres especies ha coincidido en ocasiones diversas del tiempo evolutivo, la respuesta de las hembras de *H. eximia* no ha sido afectada por la presencia de la otras especies, manteniéndose concordante con la señal del coespecífico.

## A. 2 INTRODUCCIÓN

El desplazamiento de caracteres reproductivos ha sido un proceso ampliamente estudiado, sin embargo la selección sobre el sistema de apareamiento actúa no sólo en las señales del macho, también en la elección de la hembra (Gerhardt, 1994). Es importante que la selección opere en ambas partes para que el reconocimiento y la elección de pareja sean concordantes y finalicen en un apareamiento exitoso, si en las poblaciones simpátricas, donde los cantos de especies cercanamente emparentadas tienden a ser más similares que los cantos de especies poco emparentadas (Ryan y Rand, 2001), estos factores no concuerdan, aunado a que la interferencia acústica se hace presente, pueden desencadenar consecuencias negativas en la respuesta de la hembra (Marshall *et al.*, 2006). Estudios previos han demostrado que si la señal heteroespecífica tiene una estructura similar al canto coespecífico, puede ser considerada por las hembras como parte del grupo de parejas potenciales (Gerhardt, 1974; Backwell y Jennions, 1993; Marshall *et al.*, 2006). En simpatría un error en la señal del macho ocasionaría que éste no sea elegido por las hembras, y un error en la selectividad iría acompañado de gasto energético extra de la hembra para encontrar una pareja apropiada y posteriormente disminución en su éxito reproductivo (Boake, 2002). Por lo tanto, ambos componentes del sistema necesitan evolucionar a la par para que la reproducción se lleve a cabo (modelo coevolutivo de señal-preferencia, ver Ritchie, 1996).

Generalmente es más fácil estudiar la divergencia en la señal del macho, ya que éste es ubicado por el canto, mientras que los estudios de elección se ven limitados por la dificultad de detectar a las hembras (más en especies en donde este sexo no canta), y por la problemática que implica reproducir condiciones ambientales en el laboratorio, similares a las mantenidas en las poblaciones naturales. Aún controlando estas condiciones e inyectando hormonas a las hembras para inducir la conducta sexual (e. g. *Alytes cisternasii*, Márquez y Verrell, 1991), éstas pueden responder menos y tardar más en responder, en comparación con las hembras recién colectadas (Gordon y Gerhardt, 2009), o pueden no realizar elección alguna.

El estudio de la comunicación acústica de los anuros ha permitido resolver varias dudas sobre la preferencia de la hembra. Los anuros son un buen modelo porque la mayoría de las especies basan su elección en una sola señal, el canto, el cual codifica mensajes múltiples sobre la identidad de la especie y la calidad de la pareja (Gerhardt, 1992). Las hembras califican la calidad genética del macho por medio de los atributos del canto, la mayoría de ellas prefieren a los machos con cantos elaborados (Ryan *et al.*, 2010), con alta tasa de canto (mayor número de cantos por minuto), con llamados más largos (Forsman y Hagman, 2006), o cantos no superpuestos (Bosch y Márquez, 2000; Marshall *et al.*, 2006). Estas características se correlacionan positivamente con el éxito de apareamiento, eclosión, metamorfosis y supervivencia (e. g. *Hyla versicolor*, Welch *et al.*, 1998; Welch, 2003).

En estudios de atracción de pareja es común el desarrollo de dos métodos: (1) *pruebas de elección de pareja* (“mate choice”) en las cuales se observa la respuesta de la hembra sometida a dos o más estímulos (generalmente coespecífico contra heteroespecífico), y (2) *pruebas de un sólo estímulo* en las cuales se cuantifica la respuesta de la hembra hacia una señal (Busch *et al.*, 2002). En los experimentos de reproducción (“playback”) de dos estímulos, la hembra constantemente prefiere el canto coespecífico al heteroespecífico (Littlejohn y Michaud, 1959; Michaud, 1962; Bernal *et al.*, 2009). En estudios más elaborados, donde existe un conocimiento detallado de los atributos del canto que permite la creación de estímulos sintéticos, las hembras mantienen preferencia por las señales con propiedades temporales típicas de los cantos de machos coespecíficos (Ryan y Rand, 1993; Gerhardt, 1994); mientras que algunas hembras cuando están expuestas a un sólo estímulo, pueden responder a la señal del heteroespecífico (Gerhardt, 1982; Gerhardt y Doherty, 1988). Además se ha reportado que las hembras no sólo son muy selectivas para la señal, también logran evitar a los cantos de los heteroespecíficos cuando éstos se encuentran a distancias menores que los coespecíficos (Gerhardt *et al.*, 1994).

Las hembras de los anuros tienen un oído altamente desarrollado, a tal grado que en algunas especies la membrana timpánica comienza a vibrar en respuesta a las frecuencias mínimas producidas por el canto del macho de su especie (e. g. *Lithobates catesbianus* [*Rana catesbeiana*]; Mason, 2007), esto demuestra por qué las hembras llegan a equivocarse poco en la elección de pareja. A pesar de ello, en simpatria los machos de las



ranas arborícolas tratan de aparearse indiscriminadamente con otros individuos de tamaño comparable a una pareja potencial, que pasan cerca del sitio donde están cantando, por lo que el contacto inadvertido entre la hembra de una especie y el macho vocalizador de otra, es una causa principal de los apareamientos heteroespecíficos (Blair, 1958; Gerhardt *et al.*, 1994). Bajo este escenario, en las poblaciones naturales las hembras están sujetas a un ambiente acústico complejo, en donde tienen que elegir entre varios machos coespecíficos, y evadir a los heteroespecíficos. Aún así las pruebas de elección realizadas en condiciones naturales funcionan de manera eficaz, proporcionando los mismos patrones de respuesta que en pruebas con múltiples estímulos (Márquez y Bosch, 1997).

Como hemos mencionado en el capítulo I, a lo largo de la amplia distribución geográfica de *Hyla eximia*, esta especie coincide con la especie relacionada, *Hyla arenicolor* y con una especie no relacionada, *Tlalocohyla smithii*. Precisamente en las zonas simpátricas es probable que las hembras de *H. eximia* que acuden a las pozas de apareamiento, se estén enfrentando a coros compuestos por machos co y heteroespecíficos, lo que hace necesario el estudio de la elección de pareja en de dichas zonas. En este capítulo, nos enfocamos en la realización de pruebas de elección de dos estímulos llevados a cabo en condiciones naturales, sometiendo a hembras de *H. eximia* de poblaciones alopátricas y simpátricas. Dado que los cantos de los machos co y heteroespecíficos son audibles (o fueron audibles para las poblaciones alopátricas, en algún momento de la expansión de la distribución geográfica de *H. eximia*), pueden provocar una respuesta en las hembras. Debido a que la distribución geográfica de *H. eximia* es muy amplia, era de esperarse que las hembras hayan estado en contacto en diversas ocasiones con otros hílidos, reforzando su capacidad auditiva y mejorando su elección hacia las parejas coespecíficas.

### **A. 3 OBJETIVOS**

#### **A. 3.1 Objetivo general:**

Realizar pruebas de preferencia con las hembras de *Hyla eximia* en poblaciones alopátricas y simpátricas, con la finalidad de evaluar si la elección hacia la pareja coespecífica está fijada fuertemente en las zonas de contacto con otras especies cercanas.

### A. 3.2 Objetivos particulares:

- Crear estímulos de los cantos de machos de *H. eximia*, *H. arenicolor* y *T. smithii*, a partir de los registros obtenidos en la temporada reproductiva previa.
- Realizar pruebas de elección de dos estímulos, uno coespecífico y otro heteroespecífico, para registrar la respuesta de las hembras de *H. eximia*.
- Analizar la elección de la hembra, comparando las respuestas de las poblaciones alopátricas *versus* las simpátricas.

## A. 4 HIPÓTESIS

La elección de las hembras de *Hyla eximia* está fijada fuertemente hacia los cantos de anuncio de los machos coespecíficos, como resultado de diversos encuentros a través del tiempo evolutivo con su congénere (*Hyla arenicolor*) y la especie relacionada (*Tlalocohyla smithii*).

### Predicciones

Tanto en zonas alopátricas y simpátricas, las hembras de *H. eximia* van a elegir el estímulo coespecífico en lugar del estímulo de *H. arenicolor* o de *T. smithii*. También cabe esperar que en las zonas simpátricas las hembras presenten menor error en la elección, que las hembras alopátricas, dado que éstas últimas no se han enfrentado a los cantos de los heteroespecíficos.

## A.5 MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología desarrollada para la creación del estímulo fue llevada a cabo en una estancia de investigación en el Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid, España, bajo la asesoría del Dr. Rafael Márquez, encargado de la Fonoteca Zoológica y del Laboratorio de Bioacústica de dicho museo.

### **A.5.1 Elección y creación del estímulo**

La elección del estímulo comenzó con una selección de cantos naturales (con naturales me refiero a que no fueron cantos sintéticos creados por algún programa acústico) de machos grabados en la temporada reproductiva del 2010. De cada población elegimos a un grupo de individuos cuyas grabaciones carecían de superposición de cantos o de saturación de volumen. Con el programa acústico Avisoft-SASLab Pro<sup>TM</sup> aplicamos filtros arriba y debajo del canto (*High y Low Pass Filter*), para eliminar los sonidos no correspondientes a la señal. El siguiente paso fue la normalización de picos por intensidad (80%), con ello logramos que los picos más altos de todos los cantos quedaran a una intensidad (volumen) determinada. Finalmente, elegimos una duración fija para ajustar todos los cantos, basándonos en la duración del canto máxima obtenida entre las tres especies.

Una vez estandarizados los cantos, los introdujimos en el programa acústico Raven para realizar una correlación de grupo (*Batch correlator*), con la finalidad de obtener el canto más representativo de la población. Decidimos elegir al canto con 1024 FFT (*Fast Fourier Transformation*), como existe una relación inversamente proporcional entre la longitud del registro y el ancho de banda (rango de frecuencias), al analizar un registro largo le damos prioridad a una mayor resolución en las frecuencias. A partir de este canto creamos el estímulo de prueba usando el programa Audacity versión 2.0.2. Primero, colocamos el canto y le insertamos un espacio de silencio antes de la señal, dicho espacio tuvo una duración que correspondía con la duración promedio del intervalo entre cantos de cada población. Segundo, una vez creado este segmento, lo copiamos y pegamos varias veces, hasta obtener un registro con 3 minutos de duración total (Guerra y Ron, 2008). Este procedimiento fue hecho para las tres especies, el espacio entre los cantos varió según el valor promedio del intervalo de cada población, pero al final todos los estímulos tuvieron la misma duración total.

### **A.5.2 Arena experimental**

La arena experimental estuvo limitada por una malla de plástico de 1.5 x 1.5 metros de longitud y de 0.50 metros de altura, permitiendo así la propagación del sonido (Figura 1). Dentro de la arena colocamos dos altavoces (Saul Mineroff modelo SME-AFS) separados

por 1 metro (Gerhardt *et al.*, 2007), enfrente de ellos ubicamos a la hembra a una distancia de 1 m. Este arreglo triangular semeja la posición de los machos y la manera en que confrontan a la hembra para elegir pareja (Murphy y Gerhardt, 1996). Además se sabe que a ángulos menores la preferencia de la hembra es más fuerte (Bosch y Márquez, 2002).

La arena experimental fue colocada en un lugar cercano a la charca de apareamiento, procurando que tuviera las mismas características ambientales (substrato, vegetación y temperatura) que la poza donde cantan los individuos. Fuimos cuidadosos de elegir un lugar en donde los cantos de los machos coespecíficos no causaran interferencia en la respuesta de la hembra. Generalmente la posición de la arena era algunos metros frente de la poza, de esta manera aunque las hembras logaran escuchar a los individuos en la charca, los estímulos reproducidos en la arena serían los primeros que escucharían y a un mayor volumen.

### **A.5.3 Prueba de elección**

Realizamos pruebas de elección de dos estímulos porque nos permitían conocer si las hembras de *Hyla eximia* identificaban a los machos de su especie como parejas potenciales, sobre todo en las poblaciones simpátricas donde la probabilidad de interferencia acústica con otra especie era muy alta. En estas pruebas, cada hembra fue expuesta a un estímulo coespecífico de un individuo de la misma población y uno heteroespecífico de la misma población o de la población simpátrica más cercana.

Las hembras empleadas en el experimento fueron colectadas preferiblemente en amplexo, de esta manera aseguramos que estuvieran receptivas (Murphy y Gerhardt, 1996). En algunas poblaciones utilizamos a las hembras que se encontraban alrededor del coro, puesto que aunque todavía no habían elegido pareja, la cercanía a la charca era un indicador de que iban a realizar una elección acústica.

Todas las hembras fueron puestas a prueba en la misma noche de captura en un tiempo no mayor de 15 minutos para evitar la oviposición (Murphy y Gerhardt, 1996). Si la hembra era capturada en amplexo, se colocaba junto con su pareja dentro de un recipiente de plástico y era separada en el momento del experimento. Una vez realizada la prueba, la

hembra era regresada al recipiente y esperábamos a que el macho nuevamente la abrazara, posteriormente ambos eran liberados. El mismo procedimiento fue aplicado a las hembras capturadas cerca de la poza reproductiva.

Previo a la prueba de elección, medimos los decibeles (dB) del canto de cinco individuos a una distancia de 1m. Registramos la medida cada 10 segundos y calculamos el promedio, el cual fue equivalente a la intensidad del canto emitido por un macho (Márquez y Bosch, 1997). La intensidad fue medida con ayuda de un medidor de niveles de sonido (SEW® 2310 SL).

A través de una computadora portátil (Toshiba nb200) conectada a los altavoces, reprodujimos un tono puro creado en un programa de sonido (Audacity versión 2. 0. 2), procurando que estuviera a la misma intensidad que el promedio calculado previamente con los cinco individuos. Ajustamos ambos altavoces a esta intensidad por medio del medidor de niveles de sonido. Después colocamos a la hembra dentro de una noria (13.6 cm de diámetro, 8.1 cm de ancho y 42.3 cm de perímetro) forrada con malla para evitar su escape y la dejamos en silencio durante un minuto. La colocación de la hembra en esta rueda, permitió que ésta permaneciera expuesta a la misma distancia entre los altavoces (Márquez *et al.*, 2008), lo cual no se habría logrado si la hembra pudiera moverse libremente por la arena. Posteriormente reprodujimos los dos estímulos de manera alternativa en cada prueba (Bosch y Márquez, 2002), para evitar sesgo en la elección de la hembra hacia el primer canto reproducido. Los estímulos fueron reproducidos a una duración máxima de 5 minutos.

Consideramos como *elección* cuando los movimientos de la hembra lograban girar la rueda en dirección a uno de los altavoces, en un tiempo aproximado de 20 segundos, y como *no elección* cuando se quedaba quieta, sin realizar movimiento alguno. La conducta de la hembra siempre fue observada bajo luz infrarroja (Bush *et al.*, 2002). En pruebas piloto donde la hembra era liberada, observamos que al momento de reproducir los estímulos la hembra siempre se dirigía hacia algún altavoz. Los escapes solo ocurrían cuando la hembra se asustaba por el movimiento de la caja que la mantenía resguardada,

más no por la reproducción de los estímulos. De tal forma, descartamos que en nuestras pruebas los movimientos de la hembra fueran intentos de escape.

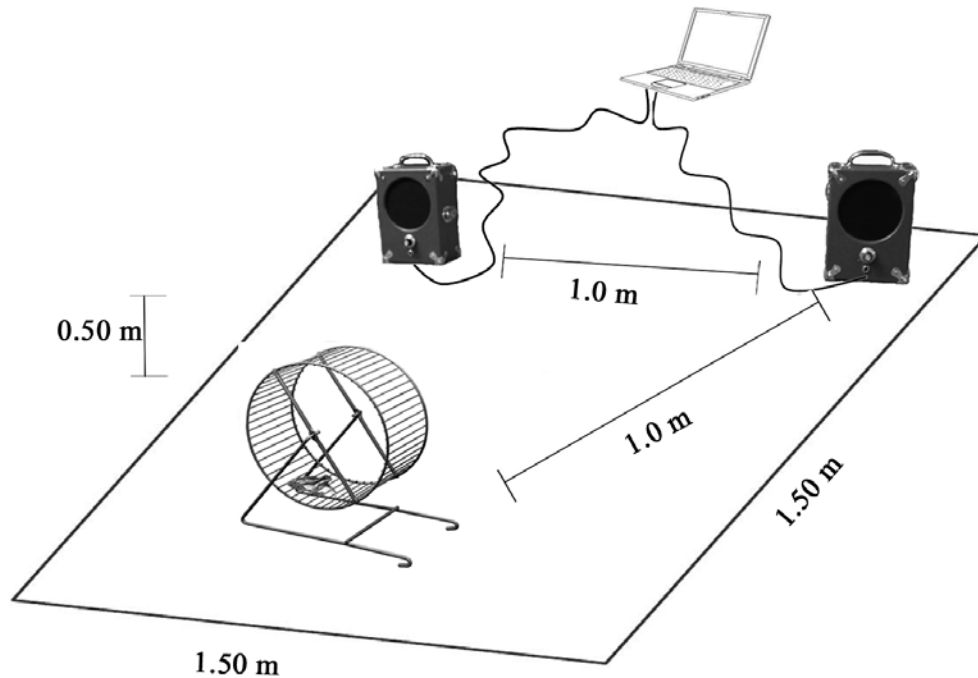


Figura 1. Arena experimental. El cuadro de la arena representa la malla de plástico con una altura de 0.50 m. Los altavoces fueron ubicados enfrente de la hembra simulando un triángulo. La hembra fue colocada dentro de una noria forrada de malla, de esta manera la dirección en la que girara la rueda indicaría la elección del altavoz.

## A.6 RESULTADOS

### A.6.1 Estímulos

Revisamos al menos 10 cantos consecutivos de cada uno de los 37 individuos que conformaron la muestra, 13 correspondieron a poblaciones alopátricas de *H. eximia*, 12 a *H. eximia* en simpatria con *H. arenicolor*, 5 a *H. eximia* en simpatria con *T. smithii*, 4 individuos de *H. arenicolor* y 3 individuos de *T. smithii*. Una vez que aplicamos los filtros y normalizamos los cantos, ajustamos la duración. *Hyla arenicolor* fue la especie que

produjo cantos más largos (duración del canto máxima= 1.418 s), por lo que decidimos ajustar todos los cantos a 1.44 s, insertando espacios de silencio antes y después del canto.

A partir de los cantos naturales generamos nueve estímulos de *H. eximia*, de los cuales cuatro fueron empleados en zonas de alopatría, dos en zonas simpátricas con *H. arenicolor* y tres en simpatría con *T. smithii*. De las otras especies, creamos un estímulo de *H. arenicolor* y dos de *T. smithii*. Los estímulos de las poblaciones alopátricas tuvieron una duración del canto promedio de 0.210 s, el intervalo entre los cantos fue de 0.615 s y un número de llamados de 97.25. Los estímulos de *H. eximia* en simpatría con *H. arenicolor* tuvieron cantos ligeramente más largos (promedio= 0.262 s), por ende menor intervalo entre cantos (0.589 s) y mayor número de llamados (104). En simpatría con *T. smithii*, los cantos de los estímulos de *H. eximia* presentaron una duración notablemente menor (0.168 s), el intervalo entre cantos fue más largo (0.636 s) y menor número de llamados (26) (Figura 2).

El estímulo de *H. arenicolor* tuvo cantos con duración promedio de 0.803 s, con intervalo entre cantos muy cortos (0.318 s) y con número de llamados pequeño (29). Mientras que los estímulos de *T. smithii* tuvieron cantos muy largos (0.444 s), producidos a un intervalo entre cantos estándar (0.498 s) y con 41.5 llamados.

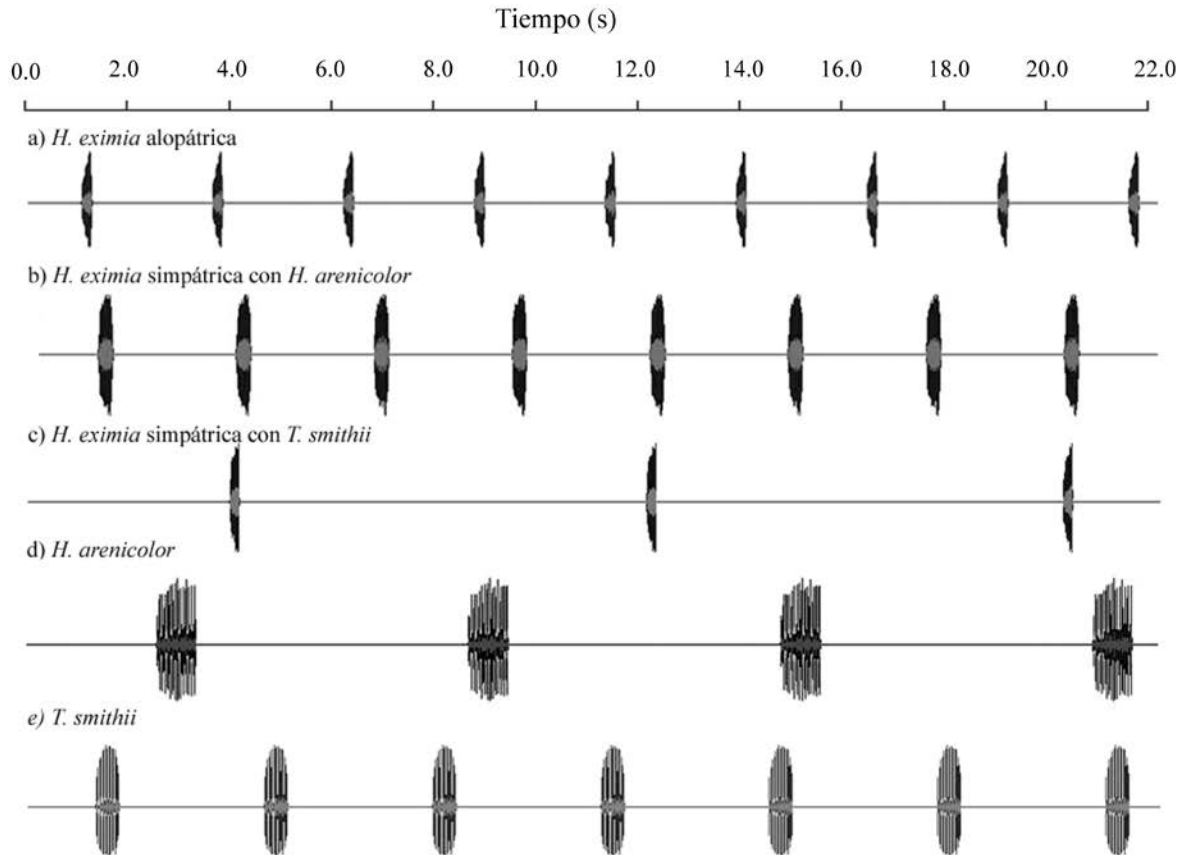


Figura 2. Secciones de los estímulos creados: a) estímulo de *Hyla eximia* utilizado en una población alopátrica, b) estímulo de *H. eximia* empleado en la zona de contacto con *H. arenicolor*, c) estímulo de *H. eximia* destinado a la región simpátrica con *Tlalocohyla smithii*, d) estímulo de *H. arenicolor* y e) estímulo que pertenece a *T. smithii*.

### A.6.2 Prueba de elección

La intensidad promedio del canto medido en los cinco individuos, previo a la elección de la prueba, fue aproximadamente de 73dB, de tal manera que el tono puro y todos los estímulos fueron reproducidos a este volumen.

Pusimos a prueba un total de quince hembras de *Hyla eximia*, cuatro pertenecientes a localidades alopátricas, cinco de simpatría con *Hyla arenicolor*, y seis de simpatría con *Tlalocohyla smithii* (Cuadro1). Seis hembras no realizaron ninguna elección, de éstas dos



eran de poblaciones alopátricas, tres de localidades en simpatría con *T. smithii* y una de simpatría con *H. arenicolor*. De las nueve hembras que hicieron elección, todas eligieron al estímulo coespecífico. Éstas fueron dos fueron de poblaciones alopátricas, cuatro de simpatría con *H. arenicolor* y tres de simpatría con *T. smithii*.

La mitad de las hembras de *Hyla eximia* que pertenecían a poblaciones alopátricas no respondieron a ninguno de los estímulos, al igual que la mitad de las hembras que están en contacto con *T. smithii* (Cuadro 1). Las hembras que coexisten con *H. arenicolor* expresaron un porcentaje menor de no elección (17%), respecto al total de hembras puestas a prueba (Figura 3). Claramente las hembras que están expuestas al canto de *H. arenicolor* responden más al estímulo coespecífico en comparación con las hembras que coexisten con *T. smithii* o que pertenecen a poblaciones alopátricas (Figura 4).

Cuadro1. Hembras de *Hyla eximia* sometidas a las pruebas de elección de dos estímulos.

	<b>Hembras experimentales</b>	<b>Elección</b>	<b>No elección</b>
Alopátrica	4	2	2
Simpátrica con <i>H. arenicolor</i>	5	4	1
Simpátrica con <i>T. smithii</i>	6	3	3
Total	15	9	6

### No elección

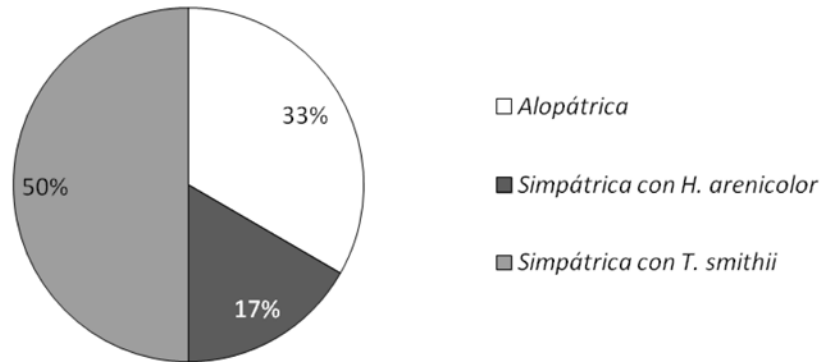


Figura 3. Porcentajes de no elección emitidos por las hembras de *Hyla eximia*. Las poblaciones alopátricas están representadas por la sección blanca, la zona gris oscura corresponde a las hembras en contacto con *H. arenicolor*, y la porción gris clara representa a las hembras simpátricas con *T. smithii*.

### Elección

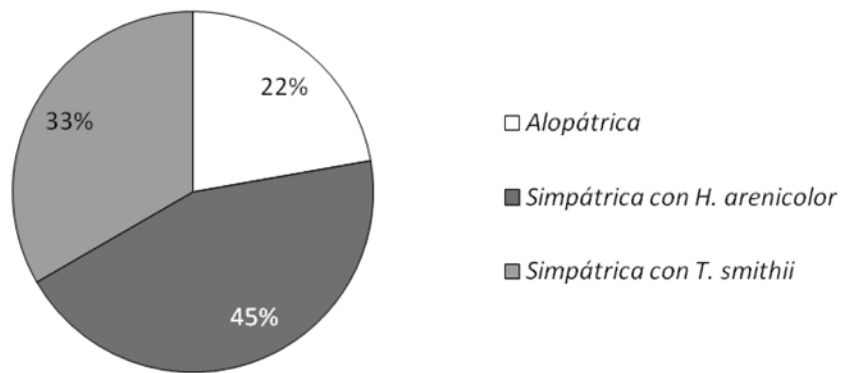


Figura 4. Porcentajes de elección emitidos por las hembras de *Hyla eximia*. En esta gráfica la elección de las hembras fue dirigida hacia el estímulo coespecífico, ninguna hembra eligió al heteroespecífico.

## A.7 DISCUSIÓN

### A.7.1 Estímulos

Obtuvimos cuatro estímulos de *H. eximia* en alopatría, dos estímulos de las zonas de contacto con *H. arenicolor* y tres de las zonas de contacto con *T. smithii*. Los estímulos de alopatría tuvieron características del canto estándar, mientras que los estímulos utilizados en simpatría con *H. arenicolor* presentaron cantos más largos, con menor intervalo y ligeramente mayor número de llamados que en alopatría. De manera contraria, los estímulos correspondientes a simpatría con *T. smithii* presentaron cantos cortos, con mayor intervalo y menor número de llamados.

La variación en las características de los estímulos es acorde con la variación del canto encontrada a nivel de composición del coro (Capítulo I), variación que es soportada por un mayor tamaño de muestra. En el análisis de la variación del canto, los cantos de las poblaciones alopatricas tuvieron características estándar, mientras que los cantos de *H. eximia* en simpatría con *H. arenicolor* fueron más largos y los cantos en simpatría con *T. smithii* fueron producidos a intervalos mayores (Capítulo I). Esto sugiere que a pesar de que los estímulos fueron creados a partir de un tamaño de muestra pequeño, reflejan la variación encontrada a nivel poblacional.

El hecho de haber usado un estímulo por población limitó el análisis para explorar las características del canto en las que las hembras basan su elección. Los registros obtenidos en la temporada de lluvias del 2010 presentaron altos niveles de saturación, dificultando su uso en el análisis de la variación del canto y reduciendo el número de grabaciones útiles para la creación de más de un estímulo por población. Sin embargo, es probable que la tasa o el número de pulsos sean un indicador de la calidad del macho en esta especie permitiendo el reconocimiento y discriminación de pareja, como ocurre en otros anuros (e. g. *Litoria verreauxi*, Gerhardt y Davis, 1988; *Dendropsophus ebraccatus* [*Hyla ebraccata*], Wollerman, 1998; *Hyla chrysoscelis*, Gerhardt, 1994; *Hyla arenicolor*, Klymus *et al.*, 2012). Además el aumento de pulsos (Schwartz *et al.*, 2001) y el intervalo entre pulsos (Martínez-Rivera y Gerhardt, 2008) evitan la superposición de cantos en los grandes coros (como los son los de *H. eximia*), favoreciendo que en los coros simpátricos los machos

logren diferenciarse de los machos heteroespecíficos y alcancen a transmitir la información hacia las hembras de su propia especie. En el capítulo I, el análisis del espacio acústico mostró que el número de pulsos es un atributo clave que reflejó divergencia en el canto de los coros en los que *H. eximia* coexiste con *T. smithii*, lo que nos permite sugerir pruebas de elección futuras con estímulos que varíen en este atributo. En el grupo *H. eximia*, *H. arenicolor* ha sido la especie más estudiada, estudios previos señalan divergencia en la tasa de pulsos del canto (Klymus *et al.*, 2010) y remarcan la relevancia de este atributo en el aislamiento entre diferentes linajes de la especie (Klymus *et al.*, 2012). Cabe esperar que en *H. eximia* el número de pulsos desarrolle el mismo papel en la elección de pareja.

### **A.7.2 Prueba de elección**

No existe un patrón que explique la respuesta de las hembras, de las quince hembras sometidas a las pruebas de elección, nueve eligieron sólo al estímulo coespecífico, ninguna reaccionó hacia el heteroespecífico. El resto de las hembras no realizaron elección alguna, siendo éste un número similar de hembras alopátricas y simpátricas con *H. arenicolor* o con *T. smithii*.

A pesar de que los cantos de *H. arenicolor* son similares en la estructura de los pulsos y en el rango de frecuencias a los cantos de *H. eximia*, las hembras de esta última especie nunca eligieron al altavoz con el estímulo heteroespecífico. Desconocemos si las hembras de *H. eximia* evitan a los individuos heteroespecíficos, pero al menos las observaciones en el campo demuestran que no realizan movimientos hacia el heteroespecífico, como los que se han observado en otras especies simpátricas (Oldman y Gerhardt, 1975). De hecho, en pruebas piloto donde la elección de la hembra fue medida por la aproximación de ésta hacia el altavoz, observamos que las hembras siempre se dirigieron al altavoz que reproducía el canto coespecífico, incluso lo rodeaban o bien se trepaban a él, pero nunca mostraron curiosidad por el otro altavoz. La misma observación fue reportada por Marshall *et al.* (2006) en una hembra de *H. versicolor*.

El hecho de que algunas hembras de *H. eximia* no hayan realizado elección, indica que probablemente hay otros factores que intervinieron. Tal vez para algunas hembras el estímulo coespecífico no fue suficientemente estimulante para provocar una respuesta, y

para otras el estímulo heteroespecífico pudo ser reconocido como una pareja inapropiada (Gerhardt *et al.*, 1994). La literatura considera que hay otros factores como el tamaño del coro, el ruido de fondo y las características espectrales del ruido que pueden afectar la elección de la hembra (Schwartz *et al.*, 2001). En nuestro estudio no medimos el efecto de estos factores, sin embargo descartamos la posibilidad de que pudieran intervenir en las hembras que no realizaron elección, debido a que hubo hembras de la misma localidad que estuvieron sujetas a los mismos factores y sí eligieron. De la misma manera sabemos que el procedimiento de la prueba no pudo causar la *no elección* porque todas las hembras estuvieron bajo las mismas condiciones, de haber sido un factor determinante todas las hembras no hubieran respondido

Aunque el número de hembras que realizó una elección es pequeño, llama la atención que todas hayan elegido al estímulo coespecífico. De cierta forma, es un indicio de que aunque la distribución geográfica de las especies ha coincidido en diversas ocasiones del tiempo evolutivo, la respuesta de la hembra no ha sido afectada por la otra especie, o al menos se ha mantenido concordante con la señal del coespecífico. Es probable que las hembras que no manifestaron respuesta, hayan requerido más de un estímulo coespecífico para realizar una elección; o bien podrían no haberse interesado en el estímulo presentado porque habían elegido a su pareja previamente. La fuerte elección por el estímulo coespecífico también es reportada en *H. arenicolor* (Klymus *et al.*, 2012), en dicho estudio las hembras fueron expuestas a estímulos de *H. wrightorum*, pero siempre prefirieron el canto del macho de su misma especie. La fuerte elección de pareja probablemente es consecuencia de la introgresión mitocondrial unidireccional pasada entre *H. wrightorum* e *H. arenicolor* (Klymus *et al.*, 2010), es decir, en el pasado estas especies hermanas estuvieron en contacto llegando a entrecruzarse, la evidencia indica que los genes mitocondriales de *H. wrightorum* han sido detectados en *H. arenicolor*, por lo que la selección actuó reforzando las barreras de aislamiento reproductivo, como lo es la elección de pareja.

Generalmente los errores de apareamiento entre especies disminuyen debido a que la distribución geográfica actual no se superpone, por lo que las especies se aparean por separado. Otro escenario común ocurre cuando las especies se encuentran en la misma zona

de apareamiento pero en realidad se aparean en charcas vecinas (Gerhardt *et al.*, 1994), o utilizan diferentes sitios de canto, o cantan en diferentes horarios. En nuestro estudio los coros simpátricos son pozas de apareamiento donde el par de especies (*H. eximia-H. arenicolor*, *H. eximia-T. smithii*) se reúnen en la misma temporada reproductiva, mismo horario y ocupan los mismos sitios de canto, lo que ha llevado a las hembras de *H. eximia* a expresar una respuesta selectiva fuerte por el canto coespecífico, disminuyendo la probabilidad de cometer un error reproductivo. A pesar de que nuestro trabajo presenta limitantes, es un punto de partida para futuras pruebas de elección, en donde recomendamos la creación de más de un estímulo por población (los cuales pueden realizarse con los registros analizados en el capítulo I), para investigar si la elección de la hembra se mantiene por las señales coespecíficas. Basándonos en los resultados de divergencia de los atributos del canto (Capítulo I) también proponemos pruebas en donde las hembras sean presentadas a estímulos que varíen en duración, número de pulsos, intervalo entre cantos y frecuencia dominante, a fin de esclarecer si la variación en la señal del macho coevoluciona a la par con la elección de la hembra y si la divergencia acústica permite el aislamiento reproductivo en las zonas de contacto.

## Literatura citada

- Bernal, X. E., A. S. Rand, M. J. Ryan. 2009. Task differences confound sex differences in receiver permissiveness in Túngara frogs. *Proceedings of the Royal Society* 276: 1323-1329.
- Backwell, P. R. Y. y M. D. Jennions. 1993. Mate choice in the Neotropical frog, *Hyla ebraccata*: sexual selection, mate recognition and signal selection. *Animal Behaviour* 45 (6): 1248-1250.
- Blair, W. F. 1958. Mating call in the speciation of anuran amphibians. *The American naturalist* 92 (862): 27-51.
- Boake, R. B. C. 2002. Sexual signaling and speciation, a microevolutionary perspective. *Genetica* 116: 205-214.
- Bosch, J y R. Márquez. 2000. Acoustical interference in the advertisement calls of the midwife toads (*Alytes obstetricians* and *Alytes cisternasii*). *Behaviour* 137: 249-263.
- Bosch, J y R. Márquez. 2002. Female preference function related to precedence effect in an amphibian anuran (*Alytes cisternasii*): test with non-overlapping calls. *Behavioral Ecology* 13 (2): 149-153.
- Bush, S. L., H. C. Gerhardt, J. Schul. 2002. Pattern recognition and call preferences in treefrogs (Anura: Hylidae): a quantitative analysis using a no-choice paradigm. *Animal Behaviour* 63: 7-14.
- Forsman, A. y M. Hagman. 2006. Calling is an honest indicator of paternal genetic quality in poison frogs. *Evolution* 60 (10): 2148-2157.
- Gerhardt, H. C. 1974. Behavioral isolation of the treefrog *Hyla cinerea* and *Hyla andersonii*. *American Midland Naturalist* 91(2): 424-433.
- Gerhardt, H. C. 1982. Sound pattern recognition in some North American treefrogs: implications for mate choice. *American Zoologist* 22 (3): 581-595.

- Gerhardt, H. C. 1992. Multiple messages in acoustic signals. *Seminars in Neuroscience* 4: 391-400.
- Gerhardt, H. C. 1994. Reproductive character displacement of female mate choice in the grey treefrog, *Hyla chrysoscelis*. *Animal Behaviour* 47: 959-969.
- Gerhardt, H. C. y J. A. Doherty. 1988. Acoustic communication in the gray treefrog, *Hyla versicolor*: evolutionary and neurobiological implications. *Journal of Comparative Physiology A* 162: 261-278.
- Gerhardt, H. C y M. S. Davis. 1988. Variation in the coding of species identity in the advertisement calls of *Litoria verreauxi* (Anura: Hylidae). *Evolution* 42 (3): 556-565.
- Gerhardt, H. C., M. L. Dyson, S. D. Tanner, C. G. Murphy. 1994. Female treefrogs do not avoid heterospecific call as they approach conspecific calls: implications for mechanisms of mate choice. *Animal Behaviour* 47: 1323-1332.
- Gerhardt, H. C., C. C. Martínez-Rivera, J. J. Schwartz, V. T. Marshall, C. G. Murphy. 2007. Preferences based on spectral differences in acoustic signals in four species of treefrogs (Anura: Hylidae). *The Journal of Experimental Biology* 210: 2990-2998.
- Gordon, N. M. y H. C. Gerhardt. 2009. Hormonal modulation of phonotaxis and advertisement-call preferences in the gray treefrog (*Hyla versicolor*). *Hormones and Behavior* 55(1): 121-127.
- Guerra, M. A. y S. R. Ron. 2008. Mate choice and courtship signal differentiation promotes speciation in an amazonian frog. *Behavioral Ecology* 19 (6): 1128-1135 pp.
- Klymus, K. E., S. C. Humfeld, H. C. Gerhardt. 2012. Geographical variation in male advertisement calls and female preference of the wide-ranging canyon treefrog, *Hyla arenicolor*. *Biological Journal of the Linnean Society* 107 (1): 219-232.
- Klymus, K. E., S. C. Humfeld, V. T. Marshall, D. Cannatella, H. C. Gerhardt. 2010. Molecular patterns of differentiation in canyon treefrogs (*Hyla arenicolor*):



- evidence for introgressive hybridization with the Arizona treefrog (*H. wrightorum*) and correlations with advertisement call differences. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 1425-1435.
- Littlejohn, M. J. y T. C. Michaud. 1959. Call discrimination by females of Strecker's chorus frog. *Texas Journal of Science* 11: 86-92.
- Márquez, R. y J. Bosch. 1997. Female preference in complex acoustical environments in the midwife toads *Alytes obstetricans* and *Alytes cisternasii*. *Behavioral Ecology* 8 (6): 588-594.
- Márquez, R., J. Bosch, X. Eekhout. 2008. Intensity of female preference quantified through playback setpoints: call frequency versus call rate in midwife toads. *Animal Behaviour* 75: 159-166.
- Márquez, R. y P. Verrel. 1991. The courtship and mating of the Iberian midwife toad *Alytes cisternasii* (Amphibia: Anura: Discoglossidae). *Journal of Zoology* 225 (1): 125-139.
- Marshall, V. T., J. J. Schwartz, H. C. Gerhardt. 2006. Effects of heterospecific call overlap on the phonotactic behaviour of grey treefrogs. *Animal Behaviour* 72: 449-459.
- Martínez-Rivera, C. C. y H. C. Gerhardt. 2008. Advertisement-call modification, male competition, and female preference in the bird-voiced treefrog *Hyla avivoca*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63 (2): 195-208.
- Mason, M. J. 2007. Pathways for sound transmission to the inner ear in amphibians. En: Narins, P. M., A. S. Feng, R. R. Fay, A. N. Popper (eds.). *Hearing and Sound Communication in Amphibians*. Springer Verlag, New York, pp. 147-183.
- Michaud, T. C. 1962. Call discrimination by females of chorus frogs, *Pseudacris clarki* and *Pseudacris nigrita*. *Copeia* (1): 213-215.

- Murphy, C. G. y H. C. Gerhardt. 1996. Evaluating the design of mate-choice experiments: the effect amplexus on mate choice by female barking treefrogs, *Hyla gratiosa*. *Animal Behaviour* 51: 881-890 pp.
- Oldman, R. S. y H. C. Gerhardt. 1975. Behavioral isolation of the treefrogs *Hyla cinerea* and *Hyla gratiosa*. *Copeia* (2): 223-231.
- Ritchie, M. G. 1996. The shape of female mating preferences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 14628-14631.
- Ryan, M. J. y A. S. Rand. 1993. Species recognition and sexual selection as a unitary problem in animal communication. *Evolution* 47: 647-657.
- Ryan, M. J. y A. S. Rand. 2001. Feature weighting in signal recognition and discrimination by Túngara frogs. En: Ryan, M. (ed.). *Anuran Communication*. Smithsonian Institution Press, Washington and London, pp. 86-101.
- Ryan, M. J., X. E. Bernal, A. S. Rand. 2010. Female mate choice and the potential for ornament evolution in túngara frogs *Physalaemus pustulosus*. *Current Zoology* 56 (3): 343-357.
- Schwartz, J. J., B. W. Buchanan, H. C. Gerhardt. 2001. Female mate choice in the gray treefrog (*Hyla versicolor*) in three experimental environments. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 49: 443-455.
- Welch, A. M. 2003. Genetic benefits of female mating preference in gray tree frogs are context-dependent. *Evolution* 57 (4): 883-893.
- Welch, A. M., R. D. Semlitsch, H. C. Gerhardt. 1998. Call duration as an indicator of genetic quality in male gray tree frogs. *Science* 280: 1928-1930.
- Wollerman, L. 1998. Stabilizing and directional preferences of female *Hyla ebraccata* for calls differing in static properties. *Animal Behaviour* 55 (6): 1619-1630.

**Apéndice B. Artículo publicado en PeerJ.**

Rodríguez-Tejeda, R. E., Méndez-Cárdenas, M. G., Islas-Villanueva, V. y Macías-García, C. 2014. Geographic variation in the advertisement calls of *Hyla eximia* and its possible explanations. *PeerJ* 2:e420; DOI 10.7717/peerj.420

# Geographic variation in the advertisement calls of *Hyla eximia* and its possible explanations

Ruth E. Rodríguez-Tejeda<sup>1</sup>, María Guadalupe Méndez-Cárdenas<sup>2</sup>,  
Valentina Islas-Villanueva<sup>3</sup> and Constantino Macías García<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Mexico

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Antropológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Mexico

<sup>3</sup> Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Mexico

## ABSTRACT

Populations of species occupying large geographic ranges are often phenotypically diverse as a consequence of variation in selective pressures and drift. This applies to attributes involved in mate choice, particularly when both geographic range and breeding biology overlap between related species. This condition may lead to interference of mating signals, which would in turn promote reproductive character displacement (RCD). We investigated whether variation in the advertisement call of the mountain treefrog (*Hyla eximia*) is linked to geographic distribution with respect to major Mexican river basins (Panuco, Lerma, Balsas and Magdalena), or to coexistence with its sister (the canyon treefrog, *Hyla arenicolor*) or another related species (the dwarf treefrog, *Tlalocohyla smithii*). We also evaluated whether call divergence across the main river basins could be linked to genetic structure. We found that the multidimensional acoustic space of calls from two basins where *H. eximia* currently interacts with *T. smithii*, was different from the acoustic space of calls from *H. eximia* elsewhere. Individuals from these two basins were also distinguishable from the rest by both the phylogeny inferred from mitochondrial sequences, and the genetic structure inferred from nuclear markers. The discordant divergence of *H. eximia* advertisement calls in the two separate basins where its geographic range overlaps that of *T. smithii* can be interpreted as the result of two independent events of RCD, presumably as a consequence of acoustic interference in the breeding choruses, although more data are required to evaluate this possibility.

Submitted 5 December 2013

Accepted 19 May 2014

Published 17 June 2014

Corresponding author

Constantino Macías García,  
maciasg@unam.mx

Academic editor

John Measey

Additional Information and  
Declarations can be found on  
page 22

DOI 10.7717/peerj.420

© Copyright

2014 Rodríguez-Tejeda et al.

Distributed under

Creative Commons CC-BY 3.0

**OPEN ACCESS**

**Subjects** Animal Behavior, Evolutionary Studies, Zoology

**Keywords** *Hyla eximia*, Advertisement calls, Genetic and geographic distances, Acoustic interference, Geographic variation

## INTRODUCTION

Populations of species occupying large geographic ranges are likely to experience different selective pressures (*West-Eberhard, 1983; Panhuis et al., 2001; Coyne & Orr, 2004*) which, together with drift (*Wiens, 2004*), may result in phenotypic and genotypic differences between populations (e.g., *Avise, 2000; Laugen et al., 2003; Amézquita et al., 2009*). Local

differences in ecology, such as prey availability (e.g., [Arnold, 1980](#); [Bonansea & Vaira, 2007](#)) or habitat structure (e.g., [Relyea, 2002](#); [Skelly, 2004](#)) can lead to differential adaptation between populations ([Newman, 1992](#)), but in species with generalized diets and habitat requirements such variation would have a limited effect on differentiation (e.g., [Virgós, Llorente & Cortés, 1999](#)). On the other hand, environmental variation in the attributes that determine the transmission and reception of signals used in social ([Wells, 1977](#); [Sullivan & Wagner, 1988](#); [Wagner, 1989](#)) or sexual contexts ([Searcy & Andersson, 1986](#)) may lead to rapid population differentiation ([Jennions & Petrie, 1997](#); [Seehausen, van Alphen & Witte, 1997](#); [Lougheed et al., 2006](#); [Boul et al., 2007](#)). This is because signals used by animals in a breeding context may convey information about the species, sex, breeding status, and even the condition of the sender ([Gerhardt, 1992](#); [Wilczynski & Chu, 2001](#)), all of which may be relevant to conspecifics searching for mating partners ([Butlin & Ritchie, 1994](#); [Emerson, 2001](#); [Forsman & Hagman, 2006](#)). Geographic variation in mating signals has been widely reported in studies of character displacement, where specific traits (e.g., morphological, behavioral, ecological or physiological traits) differ among sympatric and allopatric populations due to the risk of maladaptive hybridization with related species ([Brown & Wilson, 1956](#); [Grant, 1972](#)). Reproductive character displacement (RCD) is often studied in systems where sister species meet at typically narrow hybrid or tension zones ([Butlin, 1987](#); [Howard, 1993](#); [Butlin & Ritchie, 1994](#)). However an approach involving the study of signal variation across wide geographic areas, coupled with genetic and geographic data, could be helpful in identifying evolutionary patterns of signal evolution and tracing the links between micro and macro evolution of mating signals ([Avise et al., 1987](#)).

Amphibians are good models for studying signal evolution and reproductive isolation since their dispersal is restricted by habitat, and they thus are highly philopatric, facilitating the study of genetic divergence amongst populations (c.f. [Gamble, MacGarigal & Compton, 2007](#)). Amphibian philopatry results in populations being genetically structured over short geographic distances, which facilitates inferences about the historic events that caused their current distribution ([Zeisset & Beebee, 2008](#)). Although other modalities (e.g., visual; [Hartmann et al., 2005](#); [Reynolds & Fitzpatrick, 2007](#); [Taylor et al., 2008](#)) are sometimes involved, it is common in anurans that species recognition and female preference depend on a single acoustic signal; the advertisement call [Wells, 1977](#); [Cocroft & Ryan, 1995](#); [Wells & Schwartz, 2007](#). This is produced by males, typically during the mating season. Several attributes of the calls vary within a species as a function of male morphology and condition. For instance, the frequency or pitch (Hertz) of the call is inversely correlated with body size ([Zug, 1993](#); [Gerhardt & Huber, 2002](#)). Calls are also affected by temperature, which influences the length of the call as well as the number of pulses that compose the call, and the pulse rate ([Gerhardt & Davis, 1988](#); [Wilczynski & Chu, 2001](#); [Gerhardt & Huber, 2002](#); [Yamaguchi et al., 2008](#)). Additionally, males at a chorus often adjust the timing of their calls to avoid masking by other vocalizations, and when choruses are formed by more than one species, acoustic interference can select for the use of different acoustic space ([Brush & Narins, 1989](#); [Schwartz, Buchanan & Gerhardt, 2002](#); [Chek, Bogart & Lougheed, 2003](#); [Hoskin & Higgie, 2010](#)). Acoustic space is a multidimensional space defined by

acoustic properties of the signals, such as frequency, duration, amplitude, temporal structure, etc.; see, for instance, [Ryan & Rand \(2003\)](#). In spite of variation, anuran songs are sufficiently stereotyped to permit females to identify and assess males (e.g., the *Hylidae*; [Gerhardt, 1991](#); [Gerhardt, 1992](#)), so much so that *Hyla* spp. have often been used as models to study pre-mating reproductive isolation amongst sister species (e.g., [Littlejohn, 1965](#); [Ball & Jameson, 1966](#); [Littlejohn, 1970](#); [Duellman, 1973](#); [Gerhardt, 1994](#); [Höbel & Gerhardt, 2003](#); [Gerhardt, 2005](#)).

*Hyla eximia* is a relatively small (ca. 3 cm) tree-frog endemic to the geologically complex Trans-Mexican Volcanic Belt (TMVB; [de Cserna, 1989](#); [Ferrari et al., 2012](#)) and adjacent Mexican High Plateau ([Duellman, 1970](#); [Duellman, 2001](#)). It gives its name to the *H. eximia* species group ([Smith et al., 2007](#)), which includes eleven other species ([Faivovich et al., 2005](#)). The very similar *H. wrightorum* replaces *H. eximia* to the north (through Arizona), and *H. euphorbiacea* is found to the south of the TMVB (allopatric with *H. eximia*). *H. plicata* is endemic to the TMVB and is partially sympatric with *H. eximia* ([Smith et al., 2007](#)), and *H. arenicolor* is sympatric with *H. eximia* in parts of the Mexican Plateau. Like *H. eximia*, *H. arenicolor* has a wide geographic range; in the Mexican Plateau it is mainly found in the mountain zones of Balsas Basin, at elevations of 300–3000 m ([Duellman, 2001](#)). *Tlalocohyla smithii* (formerly *Hyla smithii*, [Faivovich et al., 2005](#)) is distributed in the Pacific lowlands of Mexico up to elevations of about 1000 m, from central Sinaloa to southern Oaxaca, and inland within the Balsas Basin ([Duellman, 2001](#)). *Tlalocohyla smithii*, is not part of the *H. eximia* group, but occupies the same matings pools.

Previous work has shown evidence of geographic variation in *H. eximia* calls. Indeed, variation in pulse rate, call duration and the dominant frequency among recordings from several populations ([Blair, 1960](#); [Duellman, 1970](#); [Sullivan, 1986](#); [Duellman, 2001](#)) was so great that [Duellman \(1970\)](#) and [Duellman \(2001\)](#) concluded that the species lacks a typical call, though sample sizes per population were small. It has also been suggested that some variation in advertisement calls of *H. eximia* may be linked to RCD. Based on phonetic data [Cortés-Soto \(2003\)](#) suggested that *H. eximia* and *H. plicata* have evolved different advertisement calls in the 500 m altitudinal band (2400–2900 m asl) where their ranges overlap. There, the calls of *H. eximia* are shorter and contain fewer pulses than when the species are found in allopatry, suggesting that RCD has occurred. Here we describe the variation of the advertisement calls of *H. eximia* across a substantial part of its geographic range, and explore whether this variation is linked to genetic structure (based on mitochondrial and nuclear DNA sequences), geography (i.e., hydrographic basins) and/or range overlaps with its sister species, the canyon treefrog (*H. arenicolor*), and a related species, the Mexican dwarf treefrog (*Tlalocohyla smithii*).

## MATERIALS AND METHODS

### Song description

Based on information from public databases we surveyed 51 locations where *H. eximia* has been previously collected. We found *H. eximia* in nine of these locations. Surveys were carried out during a single rainy season to avoid bias due to inter-seasonal call variation

**Table 1** Populations sampled. Populations where advertisement calls of *Hyla eximia*, *Hyla arenicolor* and *Tlalocohyla smithii* were recorded.

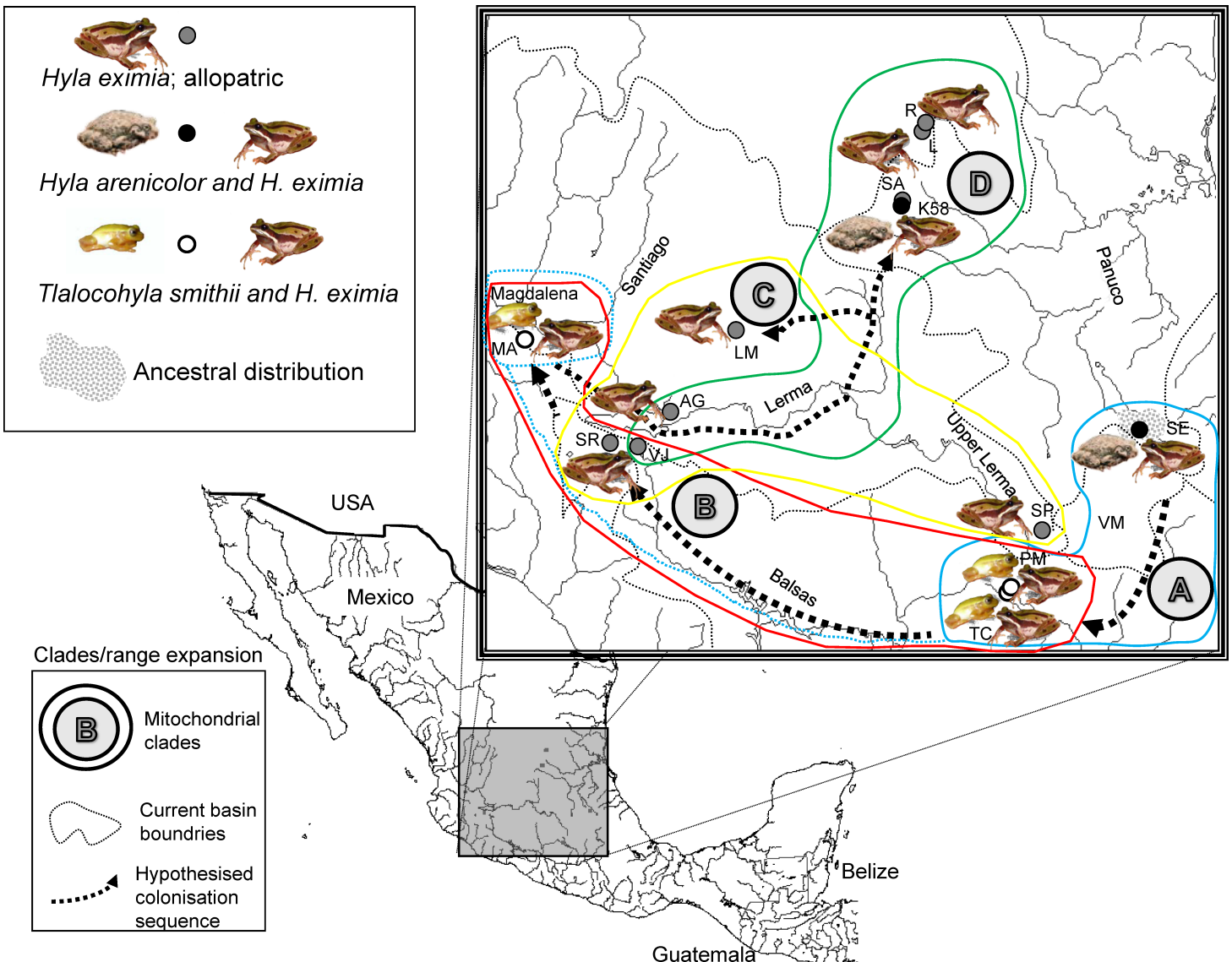
Population	Symbol map	Latitude	Longitude	Chorus composition	N
El Realejo, San Luis Potosí	R	22°40'23.98"N	−100°25'5.45"W	<i>H. eximia</i> allopatric	26
Laguna de Gerardo, San Luis Potosí	L	22°38'27.36"N	−100°26'20.94"W	<i>H. eximia</i> allopatric	29
Sierra de Álvarez, San Luis Potosí	SA	22°01'52.56"N	−100°36'49.86"W	<i>H. eximia</i> allopatric	15
Playita de San Rafael, Jalisco	SR	20°02'52.98"N	−103°09'46.26"W	<i>H. eximia</i> allopatric	25
Rancho Santa Elena, Hidalgo	SE	20°08'7.38"N	−98°30'43.50"W	<i>H. eximia</i> sympatric with <i>H. arenicolor</i>	18
Magdalena, Jalisco	MA	20°54'0.41"N	−103°59'36.85"W	<i>H. eximia</i> sympatric with <i>T. smithii</i>	20
Presa de Malinaltenango, Edo. de México	PM	18°48'32.01"N	−99°43'26.18"W	<i>H. eximia</i> sympatric with <i>T. smithii</i>	7
Rancho Santa Elena, Hidalgo	SE	20°08'7.38"N	−98°30'43.50"W	<i>Hyla arenicolor</i>	2
Km 58, San Luis Potosí	K58	22°01'12.18"N	−100°36'7.26"W	<i>Hyla arenicolor</i>	7
Magdalena, Jalisco	MA	20°54'0.41"N	−103°59'36.85"W	<i>Tlalocohyla smithii</i>	12
Presa de Malinaltenango, Edo. de México	PM	18°48'32.01"N	−99°43'26.18"W	<i>Tlalocohyla smithii</i>	5
Tecomatepec, Edo. de México	TC	18°50'9.06"N	−99°41'40.62"W	<i>Tlalocohyla smithii</i>	3

and to ensure the presence of the species in the breeding pools. *Hyla eximia* was alone (allopatric) in four of the nine locations that were sampled. In two locations, *H. eximia* was sympatric and formed breeding choruses with *H. arenicolor*, and in the remaining three with *T. smithii* (Table 1, Fig. 1). Here we considered “sympatric” the populations in which two species were found to simultaneously occupy the same microhabitat during the breeding season (form breeding choruses); this preliminary classification that will have to be confirmed with repeated sampling.

During the summer of 2011 we recorded advertisement calls from males of the three species. Calls were recorded in natural breeding aggregations with a directional microphone (Sennheiser™ME66) connected to a digital recorder (Marantz™PMD660). The microphone was held 1 m in front of the calling male, and the recording volume was adjusted to avoid saturation (0–6 dB). Each male was recorded for 1–1.5 min to ensure that adequate call series were obtained. Then we measured the body temperature of the frog by holding it from a hind limb and pointing an infrared thermometer (Extech™42529; ±0.05 °C) at its body, thus preventing heat transfer from the observer. Finally, we measured the frog’s snout-vent length with a digital calliper (±0.05 mm) and collected a toe-clip from the distal phalanx of the fourth right front-leg digit for subsequent DNA extraction (see *Gonser & Collura, 1996*).

We used only recordings containing at least 10 advertisement calls. In order to maximize the opportunity to detect differences in the songs of *H. eximia* between populations, we measured a large number of variables from our recordings. Using Avisoft-SASLab Pro™ we quantified the following attributes (definition, abbreviation; units): call duration (length of the call, continuous trace in the sonogram, CD; s), inter-call duration (silent





**Figure 1** Localities sampled, chorus composition and mitochondrial clades. Hypothesized colonization routes of *H. eximia* in central Mexico. The distribution of frogs belonging to clades A–D from a phylogenetic analysis of two concatenated mitochondrial genes (see text) is indicated with globes of different color (clade A, turquoise blue; clade B, red; clade C, yellow; D, green). Dotted arrows indicate the possible direction of the colonization, and are not intended to show the exact paths followed by the frogs. The occurrence of one individual from Magdalena in clade A is indicated with a dotted turquoise-blue line. Thin grey dotted lines represent boundaries between the major basins (Panuco, Lerma, Balsas and the currently closed Valley of Mexico), whereas rivers are indicated with continuous grey lines. Lerma River flows northwards until it meets the Santiago, which drains in the Pacific Ocean to the west. Balsas drains southwards, also in the Pacific, whereas the Panuco drains to the east, in the Gulf of Mexico. See Table 1 for population codes.

period between consecutive calls, IC; s), call period (sum of CD + IC, CP; s), number of pulses (number of short signals that compose the call, NP; count), pulse duration (length from the beginning to the end of the pulse, PD; s), inter-pulse duration (length of the silent period between the end of one pulse and the beginning of the next, ID; s), pulse amplitude (peak intensity of the pulse, PA; V), pulse peak frequency (highest energy within the



pulse, PPF; kHz), pulse period (the sum of PD + IP, PP; s), pulse rate (pulses per second measured from the start of the first pulse to the start of the last pulse, PR; Hz), dominant frequency (frequency with the highest energy within the call, DF; kHz) and fundamental frequency (the lowest, or reference frequency of series of frequencies -called harmonics- that are its integer multiples, FF; kHz). Temporal variables were measured directly on the spectrogram, all the pulse variables were extracted with the *Pulse Train Analysis* option, and the frequency variables were obtained with *Power spectrum logarithmic* function (Fig. S1). Individual frogs were represented in the analyses by the average value of each call attribute.

To detect the call variation in *H. eximia* we defined three chorus compositions: (1) allopatric, composed of *H. eximia* males only, (2) *H. eximia* in mixed choruses with *H. arenicolor*, and (3) *H. eximia* in mixed choruses with *T. smithii*. We also analyzed the calls of (4) *H. arenicolor* males in mixed choruses with *H. eximia*, and (5) *T. smithii* males in mixed choruses with *H. eximia*.

### Call variation

To reduce the number of variables included in multivariate analyses in an objective way, we calculated for each chorus composition the correlation matrix of the twelve variables and discarded one attribute of any pair that had a correlation coefficient of  $\geq 0.7$ . Since temperature is known to affect several amphibian call attributes (Blair, 1958; Zweifel, 1959; Zweifel, 1968; Gerhardt & Mudry, 1980; Gayou, 1984; Gerhardt & Huber, 2002) we performed an analysis of covariance (ANCOVA) for each species and variable to assess the potential effect of temperature on call attributes from different chorus compositions. Since ANCOVAs showed a significant effect of temperature on call variables, we used ANCOVA residuals for all subsequent analyses.

Once the number of variables had been reduced and the effect of temperature removed, we compared the attributes of the calls of *H. eximia* from the three chorus compositions using a multivariate analysis of variance (MANOVA) to determine whether and to what extent call variation was determined by locality and/or chorus composition. The absence of a significant effect of locality on call attributes might suggest that song variation occurs at a larger geographical scale, such as by basin, thus when there was no locality effect we repeated the analysis replacing locality with major river basins (Panuco, Lerma, Magdalena and Balsas). All analyses were performed using R (*R Development Core Team, 2011*). The above analyses were designed to evaluate whether the vocalizations of *H. eximia* produced at different chorus compositions were different in some -or in a combination of- attributes. To visualize such differences we performed a canonical discriminant analysis on the calls of *H. eximia*, and used the resulting discriminant function to plot the distribution of the calls of *H. arenicolor* and *T. smithii* in the same canonical space. This allowed the visualization of any significant differences revealed by the MANOVA as displacements away the calls of sympatric species in a canonical multivariate space. Finally we ran an analysis of variance to compare the first two canonical scores of *H. eximia* amongst basins—a major geographic source of variation. Analyses in this section were conducted with NCSS<sup>TM</sup> (Kaysville, UT).

## Genetic variation

Using mitochondrial and nuclear genes we analyzed phylogenetic patterns to explore the extent to which geographic variation of songs across populations is related to genetic variation. Total genomic DNA of 30 individuals of *Hyla eximia* from 12 localities was extracted from EtOH-preserved toe clippings using the DNeasy Tissue Kit (Qiagen<sup>TM</sup> Inc., Valencia, CA, USA). Standard PCRs were carried out in 25 µl reaction mixes with final concentrations of 1 µM of each primer, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 1xNH<sub>4</sub> reaction buffer (50 mM Tris–HCl pH 8.8; 16 mM [NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>), 1.25 units of Taq DNA polymerase, and 1–4 µl of DNA. Successful amplifications were performed using the following protocol: initial denaturing for 5 min at 95 °C, denaturing for 45 s at 94 °C, annealing for 45 s at 48 °C (for Cyt b) and 57 °C (for ATP), extension for 1 min at 72 °C, final extension min for 7 min at 72 °C; denaturing, annealing and the first extension stage were cycled 35–40 times.

We amplified two mitochondrial gene regions; cytochrome-*b* (754 bp) with the primers MVZ16-H AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT and MVZ15-L GAAC-TAATGGCCACACWWTACGNAA (Moritz *et al.*, 1992; Stöck *et al.*, 2008; Stöck *et al.*, 2011), and ATPase subunits 8 and 6 (778 bp) with the primers LysAF CAACCAC-CCTTGATGAATGCC and C3FR GGGCTGGGGTTKACTATGTG (Stöck *et al.*, 2008; Bryson *et al.*, 2010; Table S2). These mitochondrial gene regions have been found to be informative at different levels of variation within hylid frogs (references given above). We also amplified two nuclear gene regions using the same protocol as above, with a slight modification (see below). The Pro-opiomelanocortin gene region (POMC; 447 pb) with the primers POMC\_DRV\_F1 ATATGTCATGASCCAYTTYCGCTGGAA and POMC\_DRV\_R1 GGCRTTYTTGAAWAGAGTCATTAGWGG (annealing temperature = 58 °C; modified from Wiens *et al.*, 2005; Bryson *et al.*, 2010), and the Rhodopsin (Rho) gen region (291 pb) with the primers Rho1A ACCATGAACGGAACAGAAGGYCC and Rho1C CCAAGGGTAGCG AAGAARCCTTC (Bossuyt & Milinkovitch, 2000; Faivovich *et al.*, 2005; Klymus *et al.*, 2010; Table S2).

PCR products were sent for sequencing to the University of Washington High-Throughput Genomics Unit, Department of Genome Sciences, to the Service of DNA Sanger Sequencing. Sequences were aligned with Clustal X (Jeanmougin *et al.*, 1998). Some regions were difficult to align, and were therefore adjusted manually using BioEdit (Hall, 1999). DNAsp (Librado & Rozas, 2009) was used to determine the number of unique haplotypes and invariable and polymorphic sites.

Phylogenetic analyses were performed for each gene using the maximum likelihood algorithm (ML; Felsenstein, 1981). We used the Hasegawa–Kishino–Yano model (HKY) – G + I (gamma distribution with invariable sites) for mitochondrial genes and the GTR + I + G for nuclear genes. In both analyses the nearest neighbor interchange (NNI) was used. The best model was identified with the program Modeltest 3.7 and MrModeltest modified version of Modeltest version 3.6 (Posada, 2008) using the Akaike information criterion (AIC).

We also constructed a haplotype network using TCS 2.1.1 for preliminary exploration of the phylogeographic relationships of the obtained haplotypes (Clement, Posada & Crandall, 2000). Genetic diversity was calculated as nucleotide ( $\pi$ ) and haplotype ( $h$ ) diversity for each of the sub-regions of the basins (northern, central and southern) using Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010), for both pairs of concatenated genes (mitochondrial and nuclear). We also calculated the population differentiation index  $F_{ST}$  and its significance levels, between pairs of basins, using Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010). To visualize the differences in nuclear genes between basins, the genetic structure was investigated using Structure 2.3 (Pritchard, Stephens & Donnelly, 2000) with the Admixture model and correlated frequencies. A 500,000 burnin was employed and 5,000,000 generations of K 1 to 10 were performed with 10 iterations for each gene. We used the Evanno method to determine the true value of K (Evanno, Regnaut & Goudet, 2005) with the program Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2012). This analysis was employed only for nuclear genes, as it is not designed to find structure in linked or haploid genes.

### Phenotypic, genetic and geographical distance

We performed Mantel tests and partial Mantel tests with 1000 resamplings using R v. 2.15.1 (R Development Core Team, 2011) to evaluate the correlation between acoustic (phenotypic), genetic and geographic distances. To calculate the acoustic matrix we employed the distances between canonical variables for each basin obtained from a discriminant analysis. The geographic distance was constructed with the geo-reference points taken at each locality; as the basin could include several localities, an average geo-reference was employed. The genetic distance matrix was built using the  $D_{xy}$  values.

The project was reviewed and approved by the Consejo Técnico de la Investigación Científica (CTIC) of UNAM.

## RESULTS

### Song description

We obtained 169 good quality recordings of male advertisement calls. These came from nine *Hyla arenicolor*, 20 *Tlalocohyla smithii* and 140 *Hyla eximia* from both sympatric and allopatric localities. A detailed description of the calls of *H. eximia* based on our complete sample is available in the [Supplemental Information](#) (see song description S1) along with descriptions of those of *H. arenicolor* and *T. smithii* which are also summarized in [Tables 2](#) and [3](#). Briefly, the calls of *H. eximia* consist of a single note that lasts less than a quarter of a second, has a dominant frequency of about 2.6 kHz, and is composed of ca. 18 pulses. The call of *Hyla arenicolor* ([Table 3](#)) is roughly three times longer, (0.88 s), although it is composed of only a few more (about 20 pulses) but these pulses are longer and louder than the calls of *H. eximia*. Calls of *H. arenicolor* are lower-pitched than those of *H. eximia* (dominant frequency = 1.26 kHz). The structure of the call of male *T. smithii* is very different from those of *H. eximia* and *H. arenicolor*. Often the males emit calls with two elements; a long note followed by an extremely short one. Most individuals, however, produce more long than short notes, and in several recordings short notes are absent.

**Table 2** Descriptive data for *H. eximia*. Descriptive data of morphology, body temperature and attributes of the advertisement calls of *H. eximia*.

Variable (units)	<i>H. eximia</i> allopatric (n = 95)			<i>H. eximia</i> (sympatric with <i>H. arenicolor</i> ) (n = 18)			<i>H. eximia</i> (sympatric with <i>T. smithii</i> ) (n = 27)		
	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV
SLV (mm)	<b>28.149</b>	2.426	8.618	<b>32.252</b>	1.734	5.376	<b>31.011</b>	3.197	10.311
T (°C)	<b>17.634</b>	2.041	11.572	<b>14.478</b>	1.663	11.489	<b>19.556</b>	3.226	16.497
CD (s)	<b>0.199</b>	0.015	7.417	<b>0.267</b>	0.019	7.018	<b>0.196</b>	0.025	12.907
IC (s)	<b>0.401</b>	0.124	30.826	<b>0.548</b>	0.133	24.344	<b>0.657</b>	0.416	63.282
CP (s)	<b>0.599</b>	0.123	20.58	<b>0.815</b>	0.127	15.563	<b>0.853</b>	0.432	50.669
NP	<b>20.435</b>	1.791	8.766	<b>16.133</b>	1.605	9.947	<b>12.066</b>	2.925	24.244
PD (s)	<b>0.005</b>	0	9.148	<b>0.005</b>	0	4.587	<b>0.007</b>	0.002	24.963
ID (s)	<b>0.009</b>	0.001	12.086	<b>0.017</b>	0.002	9.455	<b>0.016</b>	0.005	29.066
PA (V)	<b>0.184</b>	0.135	73.674	<b>0.437</b>	0.149	34.216	<b>0.261</b>	0.111	42.48
PPF (kHz)	<b>2.380</b>	2.147	9.023	<b>2.260</b>	0.079	3.5	<b>2.760</b>	0.484	17.51
PP (s)	<b>0.014</b>	0.001	9.381	<b>0.021</b>	0.002	7.367	<b>0.023</b>	0.006	24.969
PR (Hz)	<b>98.139</b>	9.776	9.961	<b>56.641</b>	5.196	9.174	<b>57.241</b>	15.683	27.398
DF (kHz)	<b>2.590</b>	0.207	8.004	<b>2.410</b>	0.135	5.61	<b>3.003</b>	0.618	20.59
FF (kHz)	<b>0.649</b>	0.293	45.19	<b>0.647</b>	0.216	33.4	<b>0.534</b>	0.222	41.5

**Notes.**

SVL, snout vent length; T, corporal temperature; CD, call duration; IC, inter-call duration; CP, call period; NP, number of pulses; PD, pulse duration; ID, inter-pulse duration; PA, pulse amplitude; PPF, pulse peak frequency; PP, pulse period; PR, pulse rate; DF, dominant frequency; FF, fundamental frequency.

Some males produced a third note with different structure and duration than the previous two, but it is not clear whether this is also part of the advertisement call. For our analyses we considered just the first note, as it is the most constant element in our recordings, and it is the one more likely to interfere with the advertisement calls of *H. eximia* calls. Spectrograms of typical advertisement calls of the three species are shown in [Fig. 2](#).

**Call variation**

The following variables were highly correlated in the calls of *Hyla eximia* in allopatry: pulse amplitude and interval between calls (0.997), and call period and inter-call duration (0.993). In sympatry with *H. arenicolor*, the correlated variables of calls of *H. eximia* were: call period and inter-call duration (0.991), pulse rate and inter-pulse duration (−0.984), pulse period and inter-pulse duration (0.954), and pulse rate and pulse period (−0.953). Correlated variables in the contact zone between *H. eximia* and *T. smithii* were: call period and inter-call duration (0.999), pulse period and pulse duration (0.996), pulse rate and inter-pulse duration (−0.966), dominant frequency and pulse peak frequency (0.943), and pulse rate and number of pulses (0.920).

The following attributes of the calls of *H. arenicolor* were intercorrelated: pulse rate and inter-pulse duration (−0.985), pulse period and inter-pulse duration (0.965), pulse rate and pulse period (−0.941), and call period and inter-call duration (0.917). In the case of *T. smithii* the highest correlations amongst variables were: call period and inter-call duration (0.998), pulse period and inter-pulse duration (0.990), pulse rate and inter-pulse duration (−0.979) and pulse rate and pulse period (−0.967).

**Table 3** Descriptive data for *H. arenicolor* and *T. smithii*. Descriptive data of morphology, body temperature and attributes of the advertisement calls of *H. arenicolor* and *T. smithii*.

Variable (units)	<i>H. arenicolor</i> (n = 9)			<i>T. smithii</i> (n = 20)		
	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV
SLV (mm)	<b>42.664</b>	2.999	7.029	<b>24.523</b>	1.299	5.297
T (°C)	<b>19.044</b>	2.783	14.613	<b>18.285</b>	1.446	7.91
CD (s)	<b>0.884</b>	0.182	20.623	<b>0.469</b>	0.055	11.714
IC (s)	<b>1.6</b>	0.473	29.583	<b>1.18</b>	0.923	78.266
CP (s)	<b>2.499</b>	0.527	21.089	<b>1.649</b>	0.902	54.714
NP	<b>22.613</b>	4.453	19.693	<b>23.735</b>	4.935	20.794
PD (s)	<b>0.008</b>	0.003	42.701	<b>0.005</b>	0.001	9.823
ID (s)	<b>0.039</b>	0.007	16.904	<b>0.02</b>	0.004	16.95
PA (V)	<b>0.368</b>	0.209	56.86	<b>0.214</b>	0.152	71.076
PPF (kHz)	<b>1.470</b>	0.66	45.031	<b>4.320</b>	0.163	3.8
PP (s)	<b>0.047</b>	0.009	19.567	<b>0.025</b>	0.003	13.41
PR (Hz)	<b>24.837</b>	4.91	19.767	<b>48.218</b>	7.661	15.888
DF (kHz)	<b>1.264</b>	0.666	52.662	<b>4.450</b>	0.158	3.6
FF (kHz)	–	–	–	<b>1.920</b>	1.515	79.1

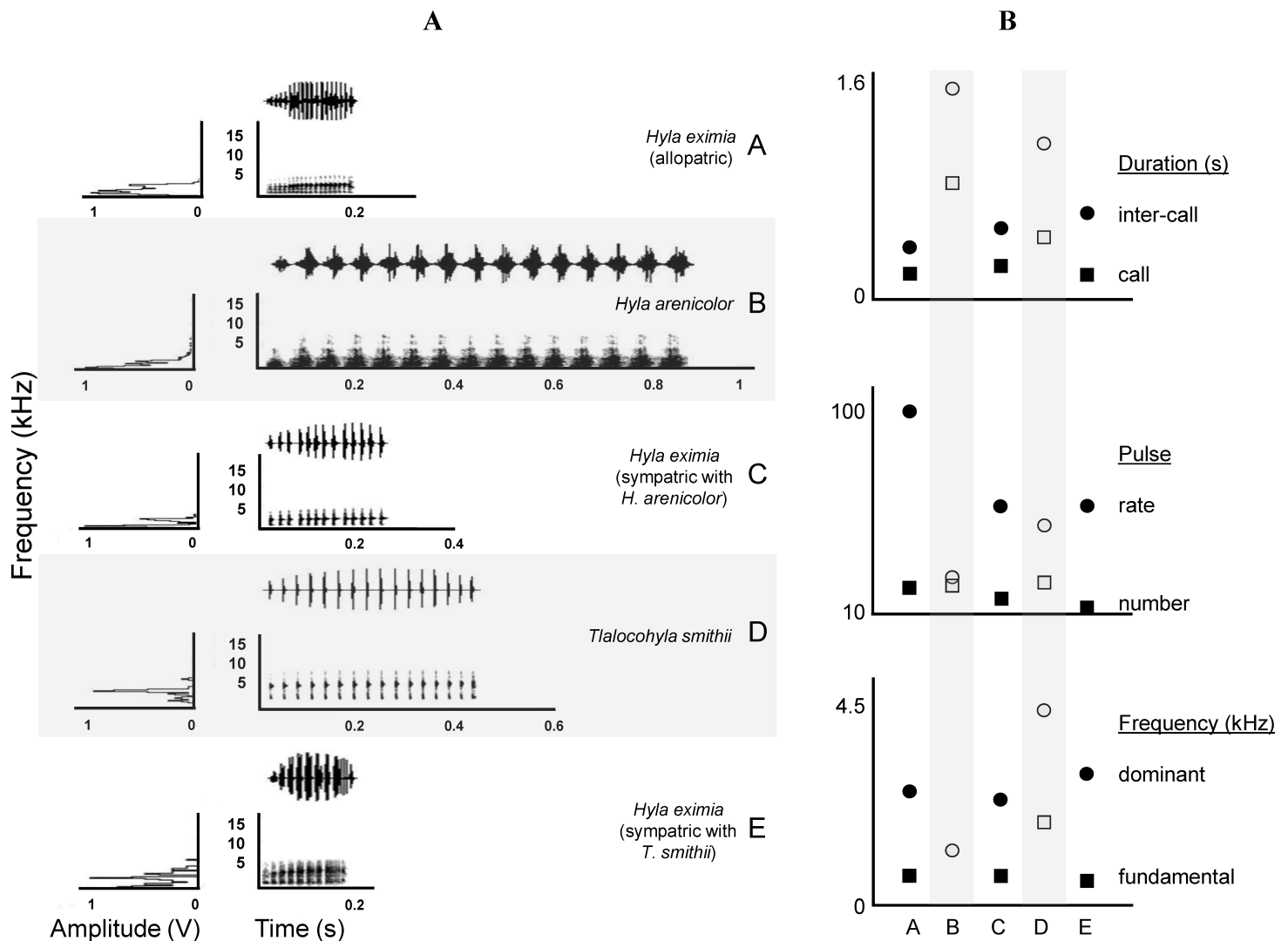
**Notes.**

SVL, snout vent length; T, corporal temperature; CD, call duration; IC, inter-call duration; CP, call period; NP, number of pulses; PD, pulse duration; ID, inter-pulse duration; PA, pulse amplitude; PPF, pulse peak frequency; PP, pulse period; PR, pulse rate; DF, dominant frequency; FF, fundamental frequency. The calls of *H. arenicolor* showed no fundamental frequency.

Considering that correlations  $\geq 0.7$  indicate redundant variables, we dropped from the analyses the following variables: call period (CP), pulse period (PP), pulse rate (PR), inter-pulse duration (ID) and pulse peak frequency (PPF). Consequently, analyses were performed using seven variables: call duration (CD), inter-call duration (IC), number of pulses (NP), pulse duration (PD), pulse amplitude (PA), dominant frequency (DF) and fundamental frequency (FF).

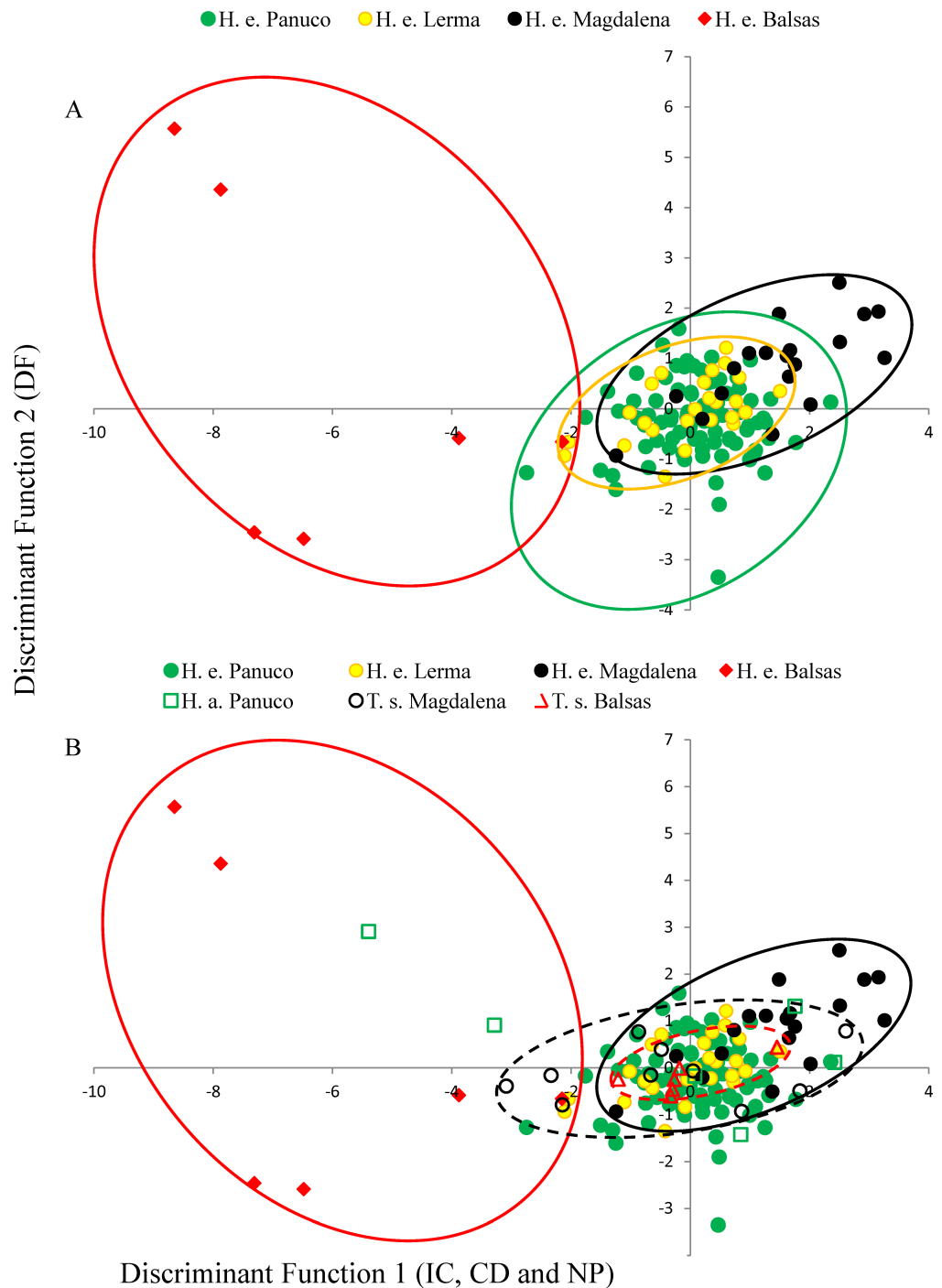
Covariance analyses revealed that temperature, chorus composition and the interaction between them affect call attributes of each species in different ways (Table S1). To control for the effect of temperature, in cases where the interaction between temperature and chorus composition was significant we used the residuals from the ANCOVA, rather than the original variable, in all subsequent analyses.

MANOVA results show that call variability in *H. eximia* is due to the locality ( $F_{(6,42)} = 3.91, P = 1.66e^{-14}$ ), whereas the fact that individuals call in allopatry or sympatry does not contribute significantly to call variation. However, when populations are grouped according to watershed (Panuco, Lerma, Magdalena y Balsas), it is amongst basins, rather than localities, that calls diverge significantly ( $F_{(3,21)} = 7.7241, P < 2e^{-16}$ ). The seven call variables entered in the MANOVA analyses allow for the discrimination between the four basins with a 34% reduction in classification error, classifying correctly 51% of the calls according to the basin of origin. The first two canonical functions explain 99.8% of the variance and define a multivariate acoustic space where the calls of



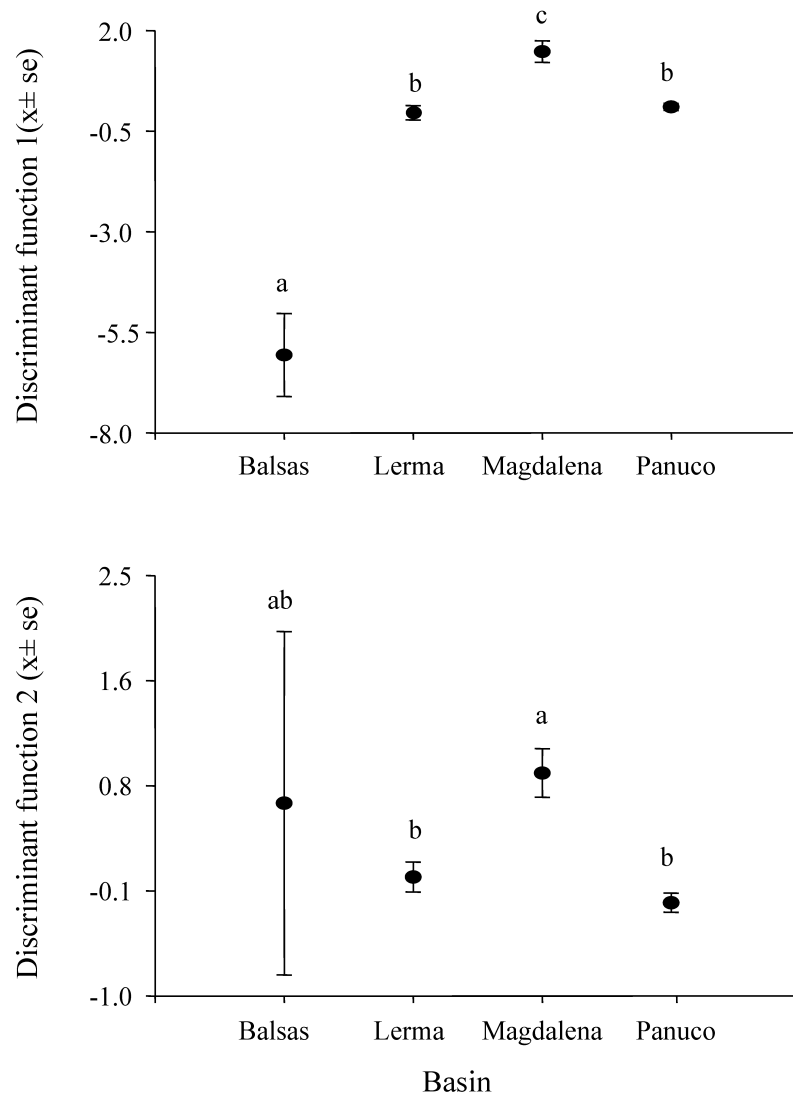
**Figure 2** Call spectrograms and averages of call attributes. (A) Spectrograms of advertisement calls produced by individuals of each chorus composition (A, allopatric *Hyla eximia*; B, *Hyla arenicolor*; C, *H. eximia* sympatric with *H. arenicolor*; D, *Tlalocohyla smithii*; and E, *H. eximia* sympatric with *T. smithii*). (B) From top to bottom, mean temporal, pulse and frequency variables. Categories in the X axis correspond to the chorus composition. Variable identity, indicated next (right) to the solid symbols, apply also to the open symbols (e.g., circles of both types represent the same variable). Solid symbols indicate *H. eximia* populations and open symbols represents the heterospecific species.

*H. eximia* from Balsas and Magdalena are distinct from those from the other basins (Figs. 2 and 3). Subsequent ANOVAs and Tukey tests confirm that these differences are significant (function 1,  $F_{3,134} = 87.67, P < 0.0001$ ; function 2,  $F_{3,134} = 6.84, P = 0.0002$ ; Fig. 4). Discriminant function 1 distinguishes amongst calls from different basins based on the interval between calls ( $r = -0.809$ ), call duration ( $r = -0.274$ ) and number of pulses ( $r = 0.254$ ), while the discriminant function 2 discriminates by dominant frequency ( $r = 0.974$ ). Applying the functions that discriminate between calls of *H. eximia* from different basins to the call attributes (or the ANCOVA residuals) of *H. arenicolor* and



**Figure 3 Discriminant plot.** (A) Discriminant functions of advertisement call attributes of *Hyla eximia*. Discriminant function 1 represents the inter-call duration (ID), call duration (CD) and number of pulses (NP); function 2 is loaded by dominant frequency (DF). (B) Discriminant functions of advertisement call attributes of *Hyla eximia* (H. e.), *Hyla arenicolor* (H. a.) and *Tlalocohyla smithii* (T. s.) separated according to basin. Discriminant function 1 is largely loaded by ID, CD and NP, and function 2 by DF. The dashed line encompasses the canonical space occupied by calls of *T. smithii* from Balsas (red) and Magdalena (black) based on the functions generated using the calls of *H. eximia*.





**Figure 4** Scores of *Hyla eximia* calls from the first two canonical functions. Post hoc tests reveal significant differences (indicated by different letters above the bars) between the mean values of canonical scores of calls from different basins.

*T. smithii* reveals no overlap of canonical acoustic space between the calls of *H. eximia* from the Balsas basin and those of co-occurring *T. smithii*, and a partial overlap between the calls of *H. eximia* at Magdalena those of the local *T. smithii* (Fig. 3). There is complete overlap between the canonical acoustic space of calls of *H. eximia* from the several populations in the Panuco basin, whether they are sympatric with *H. arenicolor* or not, and between those and the calls of *H. eximia* in the Lerma basin (Fig. 3).

### Genetic variation

We found a total of 31 different haplotypes of concatenated mitochondrial genes (Table 4). Nucleotide diversity, number of analyzed samples and total haplotypes per basin for each



**Table 4** Genetic diversity of populations of *H. eximia*. Haplotype ( $h$ ) and nucleotide ( $\pi$ ) diversity of populations of *H. eximia* from each sub-region of the sampled basins. The two mitochondrial genes were concatenated as well as the two nuclear genes.

Basin	mtDNA			Nuclear		
	$N, H$	$h$	$\pi$	$N, H$	$h$	$\pi$
Northern Panuco	6, 4	0.800 ( $\pm 0.172$ )	0.022 ( $\pm 0.016$ )	5, 4	0.900 ( $\pm 0.161$ )	0.123 ( $\pm 0.080$ )
Central Panuco	7, 5	0.857 ( $\pm 0.137$ )	0.023 ( $\pm 0.016$ )	6, 5	0.933 ( $\pm 0.122$ )	0.200 ( $\pm 0.121$ )
Southern Panuco	3, 3	1.000 ( $\pm 0.272$ )	0.064 ( $\pm 0.052$ )	1, 1	1.000 ( $\pm 0.000$ )	0.000 ( $\pm 0.000$ )
Northern Lerma	2, 2	1.000 ( $\pm 0.500$ )	0.058 ( $\pm 0.062$ )	–	–	–
Central Lerma	9, 9	1.000 ( $\pm 0.052$ )	0.077 ( $\pm 0.045$ )	8, 8	1.000 ( $\pm 0.062$ )	0.190 ( $\pm 0.109$ )
Southern Lerma	3, 3	1.000 ( $\pm 0.272$ )	0.064 ( $\pm 0.052$ )	3, 3	1.000 ( $\pm 0.272$ )	0.157 ( $\pm 0.123$ )
Magdalena	2, 2	1.000 ( $\pm 0.500$ )	0.461 ( $\pm 0.466$ )	3, 3	1.000 ( $\pm 0.272$ )	0.118 ( $\pm 0.094$ )
Balsas	3, 3	1.000 ( $\pm 0.272$ )	0.269 ( $\pm 0.205$ )	2, 2	1.000 ( $\pm 0.500$ )	0.088 ( $\pm 0.095$ )

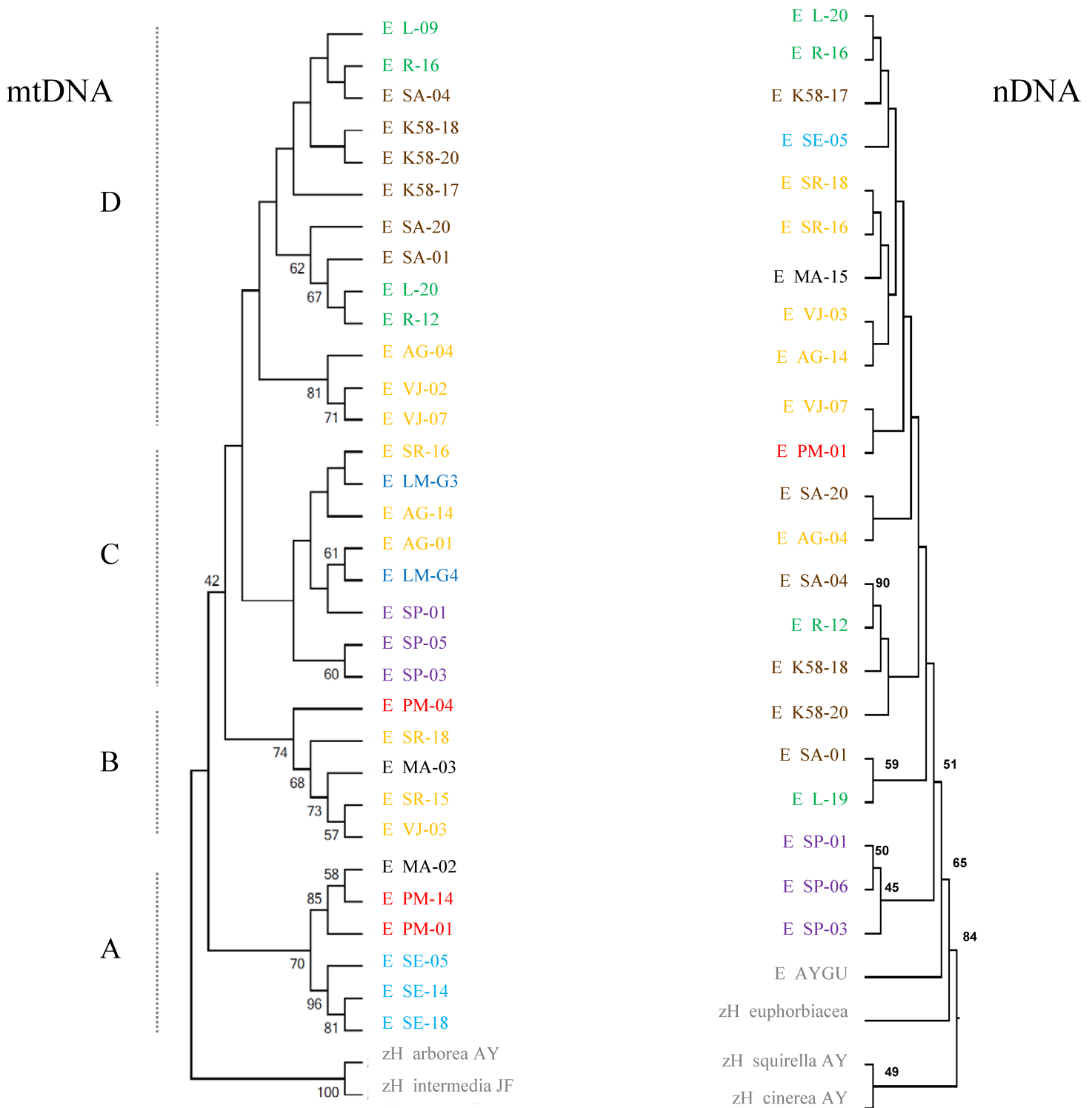
**Notes.**

Standard deviation in parentheses.

$N$ , analyzed samples number;  $H$ , number of haplotypes.

concatenated gene pair are shown in Table 4. Mitochondrial nucleotide diversity was generally low, and the high values from Magdalena ( $\pi = 0.462$ ) and Balsas ( $\pi = 0.269$ ) are probably not reliable since standard deviations are high due to small sample size (Table 4). Mitochondrial haplotype diversity was very high in all regions (Table 4). Since in most cases the number of haplotypes is identical to the sample size, it does not represent the populations' haplotype diversity.

The phylogenetic reconstruction based on mitochondrial genes recovers four major lineages of *H. eximia* loosely grouped by basin, with some admixture (Fig. 5). The basal clade (A) includes frogs from the southern reaches of the Panuco drainage, at the edge of the ancient closed basin of Apan, as well as frogs from the Balsas and one from Magdalena. This is the best-supported clade with bootstrap values of 56–96%. The next mitochondrial clade to diverge (B) includes frogs from central Lerma, Magdalena and Balsas basins. The most recent, sister clades include only Lerma (C) frogs, or frogs from north and central Panuco and central Lerma (D). Bootstrap values are higher in mitochondrial genes than in nuclear genes, and for the basal groups more than for the recent groups. As expected from the above reconstruction, the populations comprising clade A (southern Panuco, Balsas and Magdalena) are the most differentiated; they differ mostly (and significantly) from populations in clade D; central and northern Panuco, as well as from central Lerma as shown by the  $F_{ST}$  values (see Table 5).



**Figure 5** Phylogeny of concatenated mitochondrial (*ATPase* and *cyt-b*) and nuclear (*POMC* and *Rho*) genes. Individuals are separated by basin: northern Panuco (green), central Panuco (brown), southern Panuco (turquoise blue), northern Lerma (blue), central Lerma (yellow), southern Lerma (purple), Magdalena (black), Balsas (red) and out groups (gray). Letters to the left designate proposed clades.

**Table 5** Population differentiation of *H. eximia*.

Basin	Northern panuco	Central panuco	Southern panuco	Central lerma	Southern lerma	Magdalena	Balsas
Northern Panuco	–	–0.025 ( <i>P</i> = 0.513)	0.133 ( <i>P</i> = 0.405)	<b>0.175</b> ( <i>P</i> = <b>0.009</b> )	<b>0.304</b> ( <i>P</i> = <b>0.036</b> )	<b>0.303</b> ( <i>P</i> = <b>0.045</b> )	0.300 ( <i>P</i> = 0.054)
Central Panuco	–0.088 ( <i>P</i> = 0.639)	–	0.189 ( <i>P</i> = 0.117)	0.060 ( <i>P</i> = 0.090)	<b>0.239</b> ( <i>P</i> = <b>0.000</b> )	0.089 ( <i>P</i> = 0.234)	0.075 ( <i>P</i> = 0.225)
Southern Panuco	<b>0.904</b> ( <i>P</i> = <b>0.027</b> )	<b>0.915</b> ( <i>P</i> = <b>0.018</b> )	–	<b>0.182</b> ( <i>P</i> = <b>0.045</b> )	0.223 ( <i>P</i> = 0.486)	0.294 ( <i>P</i> = 0.099)	0.363 ( <i>P</i> = 0.333)
Central Lerma	0.101 ( <i>P</i> = 0.090)	0.077 ( <i>P</i> = 0.126)	<b>0.840</b> ( <i>P</i> = <b>0.000</b> )	–	<b>0.236</b> ( <i>P</i> = <b>0.027</b> )	–0.017 ( <i>P</i> = 0.504)	0.098 ( <i>P</i> = 0.063)
Southern Lerma	<b>0.328</b> ( <i>P</i> = <b>0.027</b> )	<b>0.309</b> ( <i>P</i> = <b>0.009</b> )	0.863 ( <i>P</i> = 0.090)	0.131 ( <i>P</i> = 0.063)	–	0.268 ( <i>P</i> = 0.063)	0.299 ( <i>P</i> = 0.18)
Magdalena	0.334 ( <i>P</i> = 0.081)	0.445 ( <i>P</i> = 0.054)	0.565 ( <i>P</i> = 0.099)	0.364 ( <i>P</i> = 0.387)	0.161 ( <i>P</i> = 0.108)	–	–0.031 ( <i>P</i> = 0.396)
Balsas	<b>0.538</b> ( <i>P</i> = <b>0.018</b> )	<b>0.611</b> ( <i>P</i> = <b>0.000</b> )	0.628 ( <i>P</i> = 0.153)	<b>0.560</b> ( <i>P</i> = <b>0.000</b> )	0.409 ( <i>P</i> = 0.198)	–0.431 ( <i>P</i> = 0.495)	–

**Notes.**

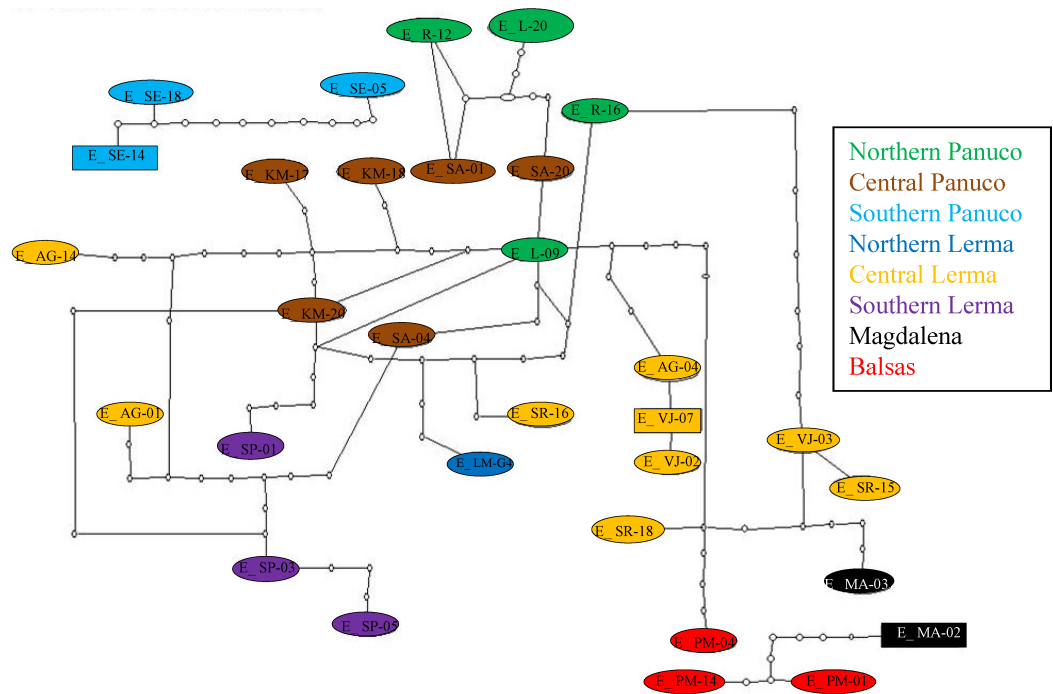
Mitochondrial  $F_{ST}$  below, and nuclear  $F_{ST}$  above the diagonal.

The mitochondrial haplotype network seems to reflect the distribution of individuals into the major basins (Fig. 6). Again, haplotypes from southern Panuco are not connected to any other basin. Two of the three Balsas haplotypes are also isolated from those from other basins, except for one haplotype from Magdalena (the other Balsas haplotype is linked to haplotypes from central Lerma). By and large, the haplotypes from central and northern Panuco are closely linked, and relatively closely linked also to those from the three Lerma sub basins (Fig. 6).

We found 25 different haplotypes of concatenated nuclear genes (Table 4). The greatest nucleotide diversity of nuclear genes was found in central Panuco ( $\pi = 0.200$ ) central ( $\pi = 0.190$ ) and southern Lerma (0.157), but the latter has a high standard deviation (Table 4). Just as with mitochondrial genes, nuclear haplotype diversities were often  $\simeq 1$  and are certainly overestimations.

The reconstruction based on nuclear genes is much less clear, with very shallow branches, although it also suggests a link between Lerma and both Balsas and Panuco (Fig. 5). The degree of nuclear genetic differentiation of *H. eximia* between regions is roughly consistent with that shown by mitochondrial genes: populations from southern Lerma (mitochondrial clade A) are significantly differentiated from those in northern and central Panuco, as well as central Lerma (mitochondrial clade D), yet this latter clade is formed by frogs from regions that are significantly differentiated by nuclear genes. Frogs from Magdalena (mitochondrial clade B) are significantly differentiated from those from northern Panuco (mitochondrial clade D; Table 5).

The Evanno method obtained a true value of  $K = 3$  which is, however, not too sharply delimited. Both genes show different patterns among the populations analyzed and little correspondence to the patterns inferred from mitochondrial genes (Fig. 7). This could be due to recombination or to the fact that Structure fails to find differentiation when



**Figure 6** Haplotype network of concatenated mitochondrial genes. Haplotypes correspond to each of the basins' sub-regions.

the population structure is too subtle (*Latch et al., 2006*), which could be our case as the reduced sample size failed to produce significant values of population differentiation.

### Phenotypic, genetic and geographical distance

There was no significant correlation between call variation and geographic distance (Mantel test  $r = 0.125$ ,  $P = 0.306$ ) even when controlling for mitochondrial (Mantel partial test  $r = 0.126$ ,  $P = 0.218$ ) or nuclear ( $r = 0.185$ ,  $P = 0.234$ ),  $D_{xy}$ . Nuclear  $D_{xy}$  was not correlated with geographic distance ( $r = 0.097$ ,  $P = 0.311$ ). This pattern remains when controlling for call variation ( $r = 0.167$ ,  $P = 0.293$ ). We did find a significant correlation between geographic distance and mitochondrial  $D_{xy}$  ( $r = 0.372$ ,  $P = 0.035$ ), and this association remained when controlling for call variation ( $r = 0.372$ ,  $P = 0.042$ ). Call variation was not correlated with either mitochondrial ( $r = 0.022$ ,  $P = 0.409$ ) or nuclear ( $r = 0.426$ ,  $P = 0.108$ ),  $D_{xy}$ , even when controlling for geographic distance (mitochondrial  $D_{xy}$ ,  $r = 0.026$ ,  $P = 0.419$ ; nuclear  $D_{xy}$ ,  $r = 0.443$ ,  $P = 0.128$ ).

## DISCUSSION

### Song description

Intraspecific variation in the attributes of the advertisement calls of *H. arenicolor* and of the *H. eximia* species group is common (e.g., *Blair, 1960*; *Klymus et al., 2010*), but its origin and biological significance are not fully understood. A comprehensive study of call variation



across the whole geographic range of the Canyon treefrog revealed that such differences are not large enough to promote speciation, although a degree of assortative mating preferences was evident over large geographic scales (Klymus & Gerhardt, 2012), and at least some of that variation may be linked to introgression with species in the *H. eximia* group (see Klymus et al., 2010). Three populations of *Hyla wrightorum*, a member of the latter group, were found to produce calls of different dominant frequency (and two differed in the duration of their calls; Gergus, Reeder & Sullivan, 2004). Pulse rate, an attribute often involved in mate recognition in these treefrogs (e.g., Klymus & Gerhardt, 2012), was not different between populations, thus the authors suggested that call variation in *H. wrightorum* is unlikely to promote mating isolation (although we note that differences in dominant frequency may be due to local adaptation to facilitate transmission (Littlejohn, 1970) and could thus lead to assortative mating).

Variation in the calls of *H. eximia* has been less comprehensively studied. An early report by Blair (1960) classified some populations as either producing “slow” (PR ~50 Hz) or “fast” (PR ~100 Hz) calls. That study was not concerned with exploring the possible origin of such variation but we now know that two populations then categorized as producing slow calls correspond to chorus where *H. eximia* is sympatric with *T. smithii*; in these we recorded songs with low PR and relatively high PPF and DF. In fact, the calls of frogs recorded in sympatry with *T. smithii* were more variable (mean CV = 29%) than those recorded elsewhere (see Table 2 and Fig. 2). This is unlikely to be an artifact of a small sample size, as this estimate is based on a larger sample than that used to assess variation in the attributes of calls produced in sympatry with *H. arenicolor*. In mixed choruses, calls of *H. eximia* may be masked by the long and/or the short notes of *T. smithii* calls. This may mean that males of *H. eximia* confront unpredictable note periodicity, since calls of *T. smithii* are made of different notes, both of variable length, and each with a different and also variable period (Table 3). This would promote high variation of inter-call interval in *H. eximia*, which may explain the high coefficient of variation of IC in those sympatric localities (Table 2).

We could not discern a link between type of variable (temporal, frequency, structural) and the amount of variation it harbors (Table 2; Fig. 2), but pulse peak frequency, dominant frequency, call duration and pulse duration were the least variable elements of *H. eximia* calls, and may thus be useful elements for species recognition.

### Call variation

In his comprehensive work, Duellman (1970) and Duellman (2001) suggested that *H. eximia* lacks a typical call. This was puzzling since anuran advertisement calls are often stereotypical, which is why they often constitute pre-mating barriers between closely-related species. We did find a substantial degree of variation in calls, but mostly restricted to two geographic regions: Balsas and Magdalena (Fig. 3). Calls of *H. eximia* from these two basins were significantly different from calls elsewhere, mostly in structure/length (IC, CD, NP; discriminant function 1). Number of pulses (NP) was highly correlated with pulse rate (PR; e.g., *H. eximia* in contact with *T. smithii*: 0.9204), which together with dominant

frequency plays an important role in species recognition (Littlejohn, 1965; Gerhardt & Davis, 1988; Gerhardt, 1994) and mate discrimination in other hylids (e.g., *Dendropsophus ebraccatus* (*Hyla ebraccata*), Wollerman, 1998). There are no published studies of mate choice in *H. eximia*, but in the related *H. arenicolor* female mate choice is influenced by call PR (Klymus & Gerhardt, 2012), which is a key element for maintaining isolation between lineages of *H. arenicolor* and might also lead, through its correlation with NP, to reproductive isolation between populations of *H. eximia*. Call (CD) and inter-call duration (IC) reflect calling effort, and the energy required to increase them depends on body size (Gerhardt, 1994). We found no differences between populations or basins in body size, thus it is possible that variation of call structure in the Balsas localities is adaptive, enabling *H. eximia* to avoid interference from the calls of *T. smithii* (see below).

Calls of *H. eximia* in Balsas and Magdalena were also different in frequency (DF; function 2) from calls elsewhere. This is a static trait (Gerhardt, 1991) that, like other such attributes of treefrog calls, is determined by morphology (several body structures, muscle size, larynx structure, among others; Dubley & Rand, 1991; McClelland, Wilczynski & Ryan, 1996; Wells, 2001; Gerhardt & Huber, 2002), resulting in structural similarity of notes and seemingly simple calls (compared to the more complex bird song). A change in this attribute would be energetically costly, and it is therefore likely that the observed variation in DF is the result of selection to improve communication efficiency, which may include avoiding interference from heterospecific calls.

In the Balsas and Magdalena basins, *H. eximia* shares choruses with *T. smithii*. Calls of *H. eximia* from Balsas are very variable, and their canonical acoustic space (as defined by discriminant functions 1 and 2; Fig. 3) is different from that of the local *T. smithii*, which seems to indicate reproductive character displacement, a possibility that requires corroboration from more intense sampling and phonotaxis studies. Interestingly, the distribution in the same canonical space of the calls of *H. eximia* from Magdalena shows that they are shifted in the opposite canonical direction than in Balsas. This can be caused by random differences being selected in different populations, as long as they reduce overlap with *T. smithii*. However, we note that in Magdalena *H. eximia* also faces interference with another frog species; *Gastrophryne* sp. Probably because this is a larger frog, its calls are much longer and lower-pitched (Duellman, 2001) than to those of *H. eximia*. This results in a more limited acoustic space available for *H. eximia* to accommodate its call to avoid masking, being simultaneously limited by the temporal and spectral attributes of the calls of *T. smithii* and of *Gastrophryne* sp.

While at Balsas and Magdalena the calls of *H. eximia* differ significantly from those of their conspecifics elsewhere (and are completely different from those of *T. smithii* in Balsas), calls from localities sympatric with *H. arenicolor* (mostly in the Panuco basin) were similar to those from allopatric populations. This was unexpected since, although both species are morphologically very different (*H. arenicolor* has a rough, granulated skin and is somewhat larger than smooth-skinned *H. eximia*, which is more similar to the smaller *T. smithii*), they belong to the same phylogenetic group, share the same mating ponds, and in the Balsas (where we did not sample mixed choruses of these two species) there



is evidence suggesting ancient mitochondrial introgression (Bryson *et al.*, 2010; Klymus & Gerhardt, 2012), thus mating interference between them was expected. It may be that, since the calls of *H. eximia* and *H. arenicolor* are substantially different, there is no, or little, interference between their calls to drive character displacement, although it may also be that the interaction of the two species is too recent in northern and central Panuco (see below).

### Genetic variation

While call variation between some regions covered in our sample is supported by mitochondrial phylogeny and population structure, it cannot be properly interpreted as a consequence of the phylogeny of *H. eximia*. The mitochondrial reconstruction is generally well supported, although it draws a puzzling phylogenetic history of *H. eximia*. It suggests, very preliminarily, that the populations in our sample originated in the south-east of the current species distribution, and expanded clockwise in their colonization of what are now the basins of rivers Balsas, Magdalena (Ameca), and central (lower) Lerma, from where they may have reached the northern (Santiago) and southern (upper) Lerma, as well as the central and upper Panuco basins (Fig. 1). Published phylogeographic hypotheses for *H. arenicolor* often include a few sequences of *H. eximia* and cover a limited portion of its geographic range, so that no phylogeographic hypotheses for this species can be drawn from them (see Bryson *et al.*, 2010; Klymus & Gerhardt, 2012). Thus we provisionally propose the above phylogenetic scenario of *H. eximia* based on our best-resolved (mitochondrial) reconstruction (Fig. 1).

### Phenotypic, genetic and geographical distance

Call variation between the regions covered in our sample may not be random (i.e., due to drift); it was greater in particular basins (Balsas and Magdalena) and chorus compositions (*H. eximia*–*T. smithii*), but did not correlate with genetic or geographic distance. Absence of a correlation between acoustic and genetic distance has been reported in other studies. For instance, in *Oophaga (Dendrobates) pumilio* (Pröhl *et al.*, 2007), the correlation is lost when the analysis controls for geographic distance, and a similar effect occurred in some populations of the Túngara frog *Engystomops (Physalaemus) pustulosus* (Ryan, Rand & Weigt, 1996). These findings are perhaps not surprising, since one of the forces that most effectively shape anuran call attributes is female mate choice (Boul *et al.*, 2007), and this is most effective when mistakes are penalized as in a hybrid zone. Thus we should in fact expect greater call variation between populations when reproductive character displacement is favored in at least one of them (Pfennig and Pfennig, 2010), than when populations are distant geographically but do not face mating call interference. Indeed, we rule out the possibility that a correlation between genetic and acoustic distance exists but was undetected, since we have adequate call samples, and, as expected, mitochondrial genetic distance was correlated with geographic distance, making it likely that our genetic screening is unbiased.

We have argued that call variation in the regions where *H. eximia* and *T. smithii* coexist is consistent with the expected effects of acoustic interference, but it might also be the



result of morphological differentiation in attributes that influence call production (e.g., the body size in *Hyla leucophyllata*, [Lougheed et al., 2006](#); see also [Emerson, 2001](#); [Gerhardt & Huber, 2002](#); [Castellano et al., 2002](#); [Hoskin et al., 2005](#)). However, an exploratory analysis failed to detect significant differences in body size among populations of *H. eximia*, thus it is unlikely that the variation in calls found between basins is due to differences in the body size. Other causes of call differentiation include local differences in call assemblage ([Wollerman & Wiley, 2002](#)), in signal transmission efficiency (related to the type of habitat), or in sexual selection (acting through reproductive isolation mechanisms). The first is compatible with our explanation of call differentiation to avoid masking by the calls of *T. smithii*, whereas the reported lack of differentiation amongst the populations not sympatric with *T. smithii*, which cover a much larger and presumably environmentally variable geographic area, argues against the other two. We thus provisionally propose that the geographic variation of advertisement calls of *H. eximia* in the Balsas and Magdalena basins populations is due to reproductive character displacement produced by sharing mating choruses with the related and morphologically similar *T. smithii* and with the distantly related *Gastrophryne* sp.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Field work was conducted under SEMARNAT license SGPA/DGVS/03580/09, and was made possible by the help of J Ávila, A Archundia, A Briones, J Carillo, C Chávez, MA Martínez, M Nuñez, Tomás, MJ Godínez, B Peña, I Barbosa, C Montes, N Lifshitz, E Quiróz, N Miranda, M Suárez, M Méndez, E Bermúdez, R Beamonte, F Mendieta, A Freyermuth, C Ríos, A García, E Vázquez and E Ávila-Luna, who also provided logistical support. G Cortés-Soto and A Ríos-Chelén helped with the initial sound analyses, S Benitez-Vieyra and a former referee provided useful statistical advice and L Kiere helped improving the English. This project was founded with a grant from CONACyT (83779) to CMG, and a scholarship to RERT also from CONACyT. This paper constitutes RERT's partial fulfilment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of Mexico (UNAM).

## ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

### Funding

This work was financed with funds from a CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; the Mexican Science Council) grant 83779 to CMG, and a scholarship to RERT from CONACyT. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:

CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; the Mexican Science Council): 83779.

### Competing Interests

The authors declare there are no competing interests.

### Author Contributions

- Ruth E. Rodríguez-Tejeda conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, wrote the paper, prepared figures and/or tables, reviewed drafts of the paper.
- María Guadalupe Méndez-Cárdenas performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, reviewed drafts of the paper.
- Valentina Islas-Villanueva analyzed the data, prepared figures and/or tables, reviewed drafts of the paper.
- Constantino Macías García conceived and designed the experiments, contributed reagents/materials/analysis tools, wrote the paper, prepared figures and/or tables, reviewed drafts of the paper.

### Animal Ethics

The following information was supplied relating to ethical approvals (i.e., approving body and any reference numbers):

The project was approved by the Consejo Técnico de la Investigación Científica (CTIC), the Science Council of our university (UNAM). There is no specific ethical committee in our university for reviewing proposals of this type (the ethical committees deal mostly with medical proposals and with the ethics of academic interactions), but all projects have to be approved by the internal council of scientific research which looks at, amongst other things, the ethical aspects of all projects.

### Field Study Permissions

The following information was supplied relating to field study approvals (i.e., approving body and any reference numbers):

Secretaría de Manejo y Aprovechamiento de los Recursos Naturales (SEMARNAT)—the Mexican Ministry for the Environment—provided the licence to conduct field work on the species included in this report, and to collect tissue samples for DNA extraction (SGPA/DGVS/03580/09).

### DNA Deposition

The following information was supplied regarding the deposition of DNA sequences:

We have submitted the sequences to GenBank and have accession numbers for the nuclear and mitochondrial genes; these can be found in [Table S2](#) (GenBank submission ID 1700625).

### Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.420>.

## REFERENCES

- Amézquita A, Lima AP, Jehle R, Castellanos L, Ramos Ó, Crawford AJ, Gasser H, Hödl W. 2009.** Calls, colours, shape, and genes: a multi-trait approach to the study of geographic variation in the Amazonian frog *Allobates femoralis*. *Biological Journal of the Linnean Society* **98**:826–838 DOI [10.1111/j.1095-8312.2009.01324.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01324.x).
- Arnold SJ. 1980.** The microevolution of feeding behaviour. In: Kamil A, Sargent T, eds. *Foraging behaviour: ecological, ethological and psychological approaches*. New York: Garland.
- Avice JC. 2000.** *Phylogeography. The history and formation of species*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel E, Reeb CA, Saunders NC. 1987.** Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**:489–522.
- Ball RW, Jameson DL. 1966.** Premating mechanisms in sympatric and allopatric *Hyla regilla* and *Hyla californiae*. *Evolution* **20**(4):533–551 DOI [10.2307/2406588](https://doi.org/10.2307/2406588).
- Blair WF. 1958.** Mating call in the speciation of anuran amphibians. *The American naturalist* **92**(862):27–51 DOI [10.1086/282007](https://doi.org/10.1086/282007).
- Blair WF. 1960.** Mating call as evidence of relations in the *Hyla eximia* group. *The Southwestern Naturalist* **5**(3):129–135 DOI [10.2307/3669508](https://doi.org/10.2307/3669508).
- Bonanse MI, Vaira M. 2007.** Geographic variation of the diet of *Melanophryniscus rubriventris* (Anura: Bufonidae) in Northwestern Argentina. *Journal of Herpetology* **41**(2):231–236 DOI [10.1670/0022-1511\(2007\)41\[231:GVOTDO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1670/0022-1511(2007)41[231:GVOTDO]2.0.CO;2).
- Bossuyt F, Milinkovitch MC. 2000.** Convergent adaptive radiations in Madagascan and Asian ranid frogs reveal covariation between larval and adult traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:6585–6590 DOI [10.1073/pnas.97.12.6585](https://doi.org/10.1073/pnas.97.12.6585).
- Boul KE, Funk WC, Darst R, Cannatella DC, Ryan MJ. 2007.** Sexual selection drives speciation in an Amazonian frog. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* **274**:399–406 DOI [10.1098/rspb.2006.3736](https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3736).
- Brown WL, Wilson EO. 1956.** Character displacement. *Systematic Zoology* **5**:49–64 DOI [10.2307/2411924](https://doi.org/10.2307/2411924).
- Brush JS, Narins PM. 1989.** Chorus dynamics of a neotropical amphibian assemblage: comparison of computer simulation and natural behaviour. *Animal Behaviour* **37**:33–44 DOI [10.1016/0003-3472\(89\)90004-3](https://doi.org/10.1016/0003-3472(89)90004-3).
- Bryson Jr RW, de Oca AN, Jaeger JR, Riddle BR. 2010.** Elucidation of cryptic diversity in a widespread nearctic treefrog reveals episodes of mitochondrial gene capture as frogs diversified across a dynamic landscape. *Evolution* **64**(8):2315–2330.
- Butlin RK. 1987.** Speciation by reinforcement. *Trends in Ecology & Evolution* **2**:8–13 DOI [10.1016/0169-5347\(87\)90193-5](https://doi.org/10.1016/0169-5347(87)90193-5).
- Butlin RK, Ritchie MG. 1994.** Slater PJB, Halliday TR, Barret P, eds. *Behaviour and evolution*. New York: Cambridge University Press.
- Castellano S, Cuatto B, Rinella R, Rosso A, Giacoma C. 2002.** The advertisement call of the european treefrogs (*Hyla arborea*): a multilevel study of variation. *Ethology* **108**(1):75–89 DOI [10.1046/j.1439-0310.2002.00761.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.2002.00761.x).
- Chek AA, Bogart JP, Lougheed SC. 2003.** Mating signal partitioning in multi-species assemblages: a null model test using frogs. *Ecology Letters* **6**(3):235–247 DOI [10.1046/j.1461-0248.2003.00420.x](https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00420.x).

- Clement M, Posada D, Crandall K. 2000.** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**(10):1657–1660 DOI [10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x).
- Cocroft RB, Ryan MJ. 1995.** Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. *Animal Behaviour* **49**:283–303 DOI [10.1006/anbe.1995.0043](https://doi.org/10.1006/anbe.1995.0043).
- Cortés-Soto G. 2003.** Diferenciación en el canto de *Hyla eximia* e *Hyla plicata* en zonas de simpatria. BSc thesis, Universidad Autónoma del Estado de México.
- Coyne JA, Orr HA. 2004.** *Speciation*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- de Cserna Z. 1989.** An outline of the geology of Mexico. In: Bally AW, Palmer AR, eds. *The geology of north america—an overview*, Vol. A. Colorado: Geological Society of North America, 233–264.
- Dubley R, Rand AS. 1991.** Sound production and vocal sac inflation in the Túngara Frog, *Physalaemus pustulosus* (Leptodactylidae). *Copeia* (2):460–470.
- Duellman WE. 1970.** *Hylid frogs of Middle America, Monographs of the Museum of Natural History*, Vol. 1. Lawrence: University of Kansas. i-xi, 1–753.
- Duellman WE. 1973.** Frogs of the *Hyla geografica* group. *Copeia* (3):515–533 DOI [10.2307/1443117](https://doi.org/10.2307/1443117).
- Duellman WE. 2001.** *Hylid frogs of Middle America*. Vol 1. Ithaca, NY: Society for the Study of Amphibians and Reptiles, 694 pp.
- Earl DA, vonHoldt BM. 2012.** STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**(2):359–361 DOI [10.1007/s12686-011-9548-7](https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7).
- Emerson S. 2001.** Male advertisement calls: behavioural variation and physiological processes. In: Ryan M, ed. *Anuran communication*. Washington and London: Smithsonian Institution Press, 36–44.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005.** Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**(8):2611–2620 DOI [10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x).
- Excoffier L, Lischer HE. 2010.** Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**:564–567 DOI [10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x](https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x).
- Faivovich J, Haddad CFB, Garcia PCA, Frost DR, Campbell JA, Wheeler WC. 2005.** Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylineae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **294**:1–240 DOI [10.1206/0003-0090\(2005\)294\[0001:SROTFF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1206/0003-0090(2005)294[0001:SROTFF]2.0.CO;2).
- Felsenstein J. 1981.** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**:368–376 DOI [10.1007/BF01734359](https://doi.org/10.1007/BF01734359).
- Ferrari L, Orozco-Esquivel T, Manea V, Manea M. 2012.** The dynamic history of the Trans-Mexican Volcanic Belt and the Mexico subduction zone. *Tectonophysics* **522–523**:122–149 DOI [10.1016/j.tecto.2011.09.018](https://doi.org/10.1016/j.tecto.2011.09.018).
- Forsman A, Hagman M. 2006.** Calling is an honest indicator of paternal genetic quality in Poison Frogs. *Evolution* **60**(10):2148–2157 DOI [10.1111/j.0014-3820.2006.tb01852.x](https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2006.tb01852.x).
- Gamble LR, MacGarigal K, Compton BW. 2007.** Fidelity and dispersal in the pond-breeding amphibian, *Ambystoma opacum*: implications for spatio-temporal population dynamics and conservation. *Biological Conservation* **139**(3–4):247–257 DOI [10.1016/j.biocon.2007.07.001](https://doi.org/10.1016/j.biocon.2007.07.001).
- Gayou DG. 1984.** Effects of temperature on the advertisement call of *Hyla versicolor*. *Copeia* **3**:733–738 DOI [10.2307/1445157](https://doi.org/10.2307/1445157).

- Gergus EWA, Reeder TW, Sullivan BK. 2004.** Geographic variation in *Hyla wrightorum*: advertisement calls, allozymes, mtDNA, and morphology. *Copeia* 4:758–769 DOI 10.1643/CG-04-061R.
- Gerhardt HC. 1991.** Female mate choice in treefrogs: static and dynamic criteria. *Animal Behaviour* 42:615–635 DOI 10.1016/S0003-3472(05)80245-3.
- Gerhardt HC. 1992.** Multiple messages in acoustic signals. *Seminars in the Neurosciences* 4:391–400 DOI 10.1016/1044-5765(92)90047-6.
- Gerhardt HC. 1994.** Reproductive character displacement of female mate choice in the grey treefrog, *Hyla chrysoscelis*. *Animal Behaviour* 47:959–969 DOI 10.1006/anbe.1994.1127.
- Gerhardt HC. 2005.** Advertisement-call preferences in diploid-tetraploid treefrogs (*Hyla chrysoscelis* and *Hyla versicolor*): implications for mate choice and the evolution of communication systems. *Evolution* 59(2):395–408 DOI 10.1111/j.0014-3820.2005.tb00998.x.
- Gerhardt HC, Davis MS. 1988.** Variation in the coding of species identity in the advertisement calls of *Litoria verreauxi* (Anura: Hylidae). *Evolution* 42(3):556–565 DOI 10.2307/2409039.
- Gerhardt HC, Huber F. 2002.** *Acoustic communication in insects and Anurans. Common problems and diverse solutions.* Chicago and London: The University of Chicago Press.
- Gerhardt HC, Mudry KM. 1980.** Temperature effects on frequency preferences and advertisement call frequencies in the treefrog, *Hyla cinerea* (Anura: Hylidae). *Journal of Comparative Physiology* 137:1–6 DOI 10.1007/BF00656911.
- Gonser RA, Collura RV. 1996.** Waste not, want not: toe-clips as a source of DNA. *Journal of Herpetology* 30(3):445–447 DOI 10.2307/1565192.
- Grant PR. 1972.** Convergent and divergent character displacement. *Biological Journal of the Linnean Society* 4:39–68 DOI 10.1111/j.1095-8312.1972.tb00690.x.
- Hall TA. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95–98.
- Hartmann MT, Giasson LOM, Hartmann PA, Haddad CFB. 2005.** Visual communication in Brazilian species of anurans from the Atlantic forest. *Journal of Natural History* 39(19):1675–1685 DOI 10.1080/00222930400008744.
- Höbel G, Gerhardt C. 2003.** Reproductive character displacement in the acoustic communication system of green tree frogs (*Hyla cinerea*). *Evolution* 57(4):894–904 DOI 10.1111/j.0014-3820.2003.tb00300.x.
- Hoskin CJ, Higgie M. 2010.** Speciation via interactions: the divergence of mating traits within species. *Ecology Letters* 13:409–420 DOI 10.1111/j.1461-0248.2010.01448.x.
- Hoskin CJ, Higgie M, McDonald KR, Moritz C. 2005.** Reinforcement drives rapid allopatric speciation. *Nature* 437:1353–1356 DOI 10.1038/nature04004.
- Howard DJ. 1993.** Reinforcement: origin, dynamics and fate of an evolutionary hypothesis. In: Harrison RG, ed. *Hybrid zones and the evolutionary process.* New York: Oxford University Press, 46–69.
- Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ. 1998.** Multiple sequence alignment with ClustalX. *Trends in Biochemical Sciences* 23:403–405 DOI 10.1016/S0968-0004(98)01285-7.
- Jennions MD, Petrie M. 1997.** Variation in mate choice and mating preferences: a review of causes and consequences. *Biological Reviews* 72(2):283–327 DOI 10.1017/S0006323196005014.

- Klymus KE, Humfeld SC, Marshall VT, Cannatella D, Gerhardt HC. 2010. Molecular patterns of differentiation in canyon treefrogs (*Hyla arenicolor*): evidence for introgressive hybridization with the Arizona treefrog (*H. wrightorum*) and correlations with advertisement call differences. *Journal of Evolutionary Biology* 23(7):1425–1435 DOI 10.1111/j.1420-9101.2010.02008.x.
- Klymus KE, Gerhardt HC. 2012. AFLP markers resolve intra-specific relationships and infer genetic structure among lineages of the canyon treefrog, *Hyla arenicolor*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65:654–667 DOI 10.1016/j.ympev.2012.07.028.
- Latch EK, Dharmarajan G, Glaubitz JC, Rhodes OEJ. 2006. Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation. *Conservation Genetics* 7:295–302 DOI 10.1007/s10592-005-9098-1.
- Laugen AT, Laurila A, Räsänen K, Merilä J. 2003. Latitudinal countergradient variation in the common frog (*Rana temporaria*) development rates—evidence for local adaptation. *Journal of Evolutionary Biology* 16:996–1005 DOI 10.1046/j.1420-9101.2003.00560.x.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452 DOI 10.1093/bioinformatics/btp187.
- Littlejohn MJ. 1965. Premating isolation in the *Hyla ewingi* complex (Anura: Hylidae). *Evolution* 19:234–243 DOI 10.2307/2406376.
- Littlejohn MJ. 1970. A reappraisal of mating call differentiation in *Hyla cadaverina* (= *Hyla californiae*) and *Hyla regilla*. *Evolution* 25:98–102 DOI 10.2307/2406502.
- Lougheed SC, Austin JD, Bogart JP, Boag PT, Chek AA. 2006. Multi-character perspectives on the evolution of intraspecific differentiation in a neotropical hylid frog. *BMC Evolutionary Biology* 6:23 DOI 10.1186/1471-2148-6-23.
- McClelland BE, Wilczynski W, Ryan M. 1996. Correlations between call characteristics and morphology in male cricket frogs (*Acris crepitans*). *The Journal of Experimental Biology* 199:1907–1919.
- Moritz C, Uzzell T, Spolsky S, Hotz H, Darevsky I, Kupriyanova L, Danielyan F. 1992. The material ancestry and approximate age of parthenogenetic species of caucasian rock lizards (Lacerta: Lacertidae). *Genetica* 87:53–62 DOI 10.1007/BF00128773.
- Newman RA. 1992. Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis. *Bioscience* 42(9):671–678 DOI 10.2307/1312173.
- Panhuis TM, Butlin R, Zuk M, Tregenza T. 2001. Sexual selection and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 16:364–371 DOI 10.1016/S0169-5347(01)02160-7.
- Pfennig DW, Pfennig KS. 2010. Character displacement and the origins of diversity. *The American Naturalist* 176(1):S26–S44 DOI 10.1086/657056.
- Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25(7):1253–1256 DOI 10.1093/molbev/msn083.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.
- Pröhl H, Hagemann S, Karsch J, Höbel G. 2007. Geographic variation in male sexual signals in strawberry poison frogs (*Dendrobates pumilio*). *Ethology* 113:825–837 DOI 10.1111/j.1439-0310.2007.01396.x.
- R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Available at <http://www.R-project.org/>.



- Relyea RA. 2002. Local population differences in phenotypic plasticity: predator-induced changes in wood frog tadpoles. *Ecological Monographs* 72:77–93 DOI 10.1890/0012-9615(2002)072[0077:LPDIPP]2.0.CO;2.
- Reynolds RG, Fitzpatrick BM. 2007. Assortative mating in poison-dart frogs based on an ecologically important trait. *Evolution* 61(9):2253–2259 DOI 10.1111/j.1558-5646.2007.00174.x.
- Ryan MJ, Rand AS. 2003. Sexual selection in female perceptual space: how female túngara frogs perceive and respond to complex population variation in acoustic mating signals. *Evolution* 57(11):2608–2618.
- Ryan MJ, Rand AS, Weigt LA. 1996. Allozyme and advertisement call variation in the Túngara frog, *Physalaemus pustulosus*. *Evolution* 50(6):2435–2453 DOI 10.2307/2410711.
- Schwartz JJ, Buchanan BW, Gerhardt HC. 2002. Acoustic interactions among male gray treefrogs, *Hyla versicolor*, in a chorus setting. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 53:9–19 DOI 10.1007/s00265-002-0542-7.
- Searcy WA, Andersson M. 1986. Sexual selection and the evolution of song. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17:507–533 DOI 10.1146/annurev.es.17.110186.002451.
- Seehausen O, van Alphen J, Witte F. 1997. Cichlid fish diversity threatened by eutrophication that curbs sexual selection. *Science* 277:1808–1811 DOI 10.1126/science.277.5333.1808.
- Skelly DK. 2004. Microgeographic countergradient variation in the wood frog, *Rana sylvatica*. *Evolution* 58(1):160–165 DOI 10.1111/j.0014-3820.2004.tb01582.x.
- Smith SA, de Oca AN, Reeder TW, Wiens JJ. 2007. A phylogenetic perspective on elevational species richness patterns in Middle American treefrogs: why so few species in lowland tropical rainforests? *Evolution* 61:1188–1207 DOI 10.1111/j.1558-5646.2007.00085.x.
- Stöck M, Dubey S, Klutsch C, Litvinchuk SN, Scheidt U, Perrin N. 2008. Mitochondrial and nuclear phylogeny of circum-Mediterranean tree frogs from the *Hyla arborea* group. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49(3):1019–1024 DOI 10.1016/j.ympev.2008.08.029.
- Stöck M, Horn A, Grossen C, Lindtke D, Sermier R, Betto-Colliard C, Dufresnes C, Bonjour E, Dumas Z, Luquet E, Maddalena T, Sousa HC, Martinez-Solano I, Perrin N. 2011. Ever-young sex chromosomes in European tree frogs. *PLoS Biology* 9(5):E1001062 DOI 10.1371/journal.pbio.1001062.
- Sullivan BK. 1986. Advertisement call variation in the Arizona tree frog, *Hyla wrightorum* Taylor, 1938. *Great Basin Naturalist* 46:378–381.
- Sullivan BK, Wagner Jr E. 1988. Variation in advertisement and release calls, and social influences on calling behaviour in the gulf coast toad (*Bufo valliceps*). *Copeia* 4:1014–1020 DOI 10.2307/1445726.
- Taylor RC, Klein BA, Stein J, Ryan MJ. 2008. Faux frogs: multimodal signalling and the value of robotics in animal behaviour. *Animal Behaviour* 76:1089–1097 DOI 10.1016/j.anbehav.2008.01.031.
- Virgós E, Llorente M, Cortés Y. 1999. Geographical variation in genet (*Genetta genetta*) diet: a literature review. *Mammal Review* 29(2):119–128 DOI 10.1046/j.1365-2907.1999.00041.x.
- Wagner Jr WE. 1989. Social correlates of variation in male calling behaviour in Blanchard's cricket frog, *Acris crepitans blanchardi*. *Ethology* 82(19):27–45 DOI 10.1111/j.1439-0310.1989.tb00485.x.
- Wells KD. 1977. The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour* 25:666–693 DOI 10.1016/0003-3472(77)90118-X.

- Wells KD. 2001.** The energetics of calling in frogs. In: Ryan M, ed. *Anuran communication*. Washington and London: Smithsonian Institution Press, 45–60.
- Wells KD, Schwartz JJ. 2007.** The behavioral ecology of anuran communication. In: Narins PM, Feng AS, Fay RR, Popper AN, eds. *Hearing and sound communication in amphibians*. New York: Springer, 44–86.
- West-Eberhard MJ. 1983.** Sexual selection, social competition, and speciation. *The Quarterly Review of Biology* **58**(2):155–183 DOI [10.1086/413215](https://doi.org/10.1086/413215).
- Wiens JJ. 2004.** What is speciation and how should we study it? *American Naturalist* **163**:914–923 DOI [10.1086/386552](https://doi.org/10.1086/386552).
- Wiens JJ, Fetzner JW, Parkinson CL, Reeder TW. 2005.** Hylid frog phylogeny and sampling strategies for speciose clades. *Systematic Biology* **54**(5):778–807 DOI [10.1080/10635150500234625](https://doi.org/10.1080/10635150500234625).
- Wilczynski W, Chu J. 2001.** Acoustic communication, endocrine control, and the neurochemical systems of the brain. In: Ryan M, ed. *Anuran communication*. Washington and London: Smithsonian Institution Press, 23–35.
- Wollerman L. 1998.** Stabilizing and directional preferences of female *Hyla ebraccata* for calls differing in static properties. *Animal Behaviour* **55**(6):1619–1630 DOI [10.1006/anbe.1997.0697](https://doi.org/10.1006/anbe.1997.0697).
- Wollerman L, Wiley RH. 2002.** Possibilities for error during communication by neotropical frogs in a complex acoustic environment. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **52**:465–473 DOI [10.1007/s00265-002-0534-7](https://doi.org/10.1007/s00265-002-0534-7).
- Yamaguchi A, Gooler D, Herrold A, Patel S, Pong WW. 2008.** Temperature-dependent regulation of vocal pattern generator. *Journal of Neurophysiology* **100**:3134–3143 DOI [10.1152/jn.01309.2007](https://doi.org/10.1152/jn.01309.2007).
- Zweifel RG. 1959.** Effect of temperature on call of the frog, *Bombina variegata*. *Copeia* **4**:322–327 DOI [10.2307/1439890](https://doi.org/10.2307/1439890).
- Zweifel RG. 1968.** Effects of temperature, body size, and hybridization on advertisement calls of toads, *Bufo a. americanus* and *Bufo woodhousii fowleri*. *Copeia* **2**:269–285 DOI [10.2307/1441753](https://doi.org/10.2307/1441753).
- Zeisset I, Beebee TJC. 2008.** Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity* **101**:109–119 DOI [10.1038/hdy.2008.30](https://doi.org/10.1038/hdy.2008.30).
- Zug GR. 1993.** *Herpetology. An introductory biology of amphibians and reptiles*. New York: Academic Press.