



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SOBRE

LOS RECURSOS NATURALES

**Plasticidad de los patrones de pigmentación
en la rana toro (*Lithobates catesbeianus*)
en respuesta a distintas condiciones de crianza**

TESIS

que presenta

Biol. Lluvia Itzihuari Marcos Camacho

Como requisito para obtener el grado académico de

Maestra en Ciencias en Ecología Integrativa

Directora de tesis: Dra en Ciencias de la Tierra. Alma Lilia Fuentes Farías

Codirectora de tesis: Dra. en Ciencias Biomédicas Esperanza Meléndez Herrera

Revisor de tesis: Dr. en Ciencias Biomédicas Gabriel Gutiérrez Ospina

Morelia, Mich. Mayo de 2016



INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. ANTECEDENTES.....	5
5. OBJETIVOS.....	16
5.1. Objetivo general.....	16
5.2. Objetivos particulares.....	16
6. HIPÓTESIS.....	17
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
7.1. Descripción de la especie.....	18
7.2. Sistema de estudio.....	19
7.3. Fotografías y procesamiento.....	20
7.4. Descripción de los patrones de pigmentación.....	21
7.5. Análisis estadísticos.....	25
8. RESULTADOS.....	26
8.1. Patrones de pigmentación entre poblaciones.....	26
8.2. Pertenencia poblacional por patrón de pigmentación.....	30
8.3. Patrones de pigmentación por sexo.....	32
9. DISCUSIÓN.....	35
9.1. Patrones de pigmentación.....	35
9.2. Dimorfismo sexual.....	36
10. CONCLUSIONES.....	39

11. LITERATURA CITADA	40
-----------------------------	----

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Interpretación esquemática del arreglo citoestructural unidad dérmica cromatóforo en anuros (tomado de Bagnara <i>et al.</i> , 1968).....	6
FIGURA 2. Fotografías del dorso de <i>Lithobates catesbeianus</i>	20
FIGURA 3. Patrón de pigmentación de rana toro (<i>Lithobates catesbeianus</i>). Área (20 cm ²) seleccionada del dorso (a), imagen binaria de la selección (b).....	21
FIGURA 4. Ejemplo del cálculo de la dimensión fractal (FD) de las manchas del dorso de <i>Lithobates catesbeianus</i> utilizando el método de conteo de celdas. La imagen en blanco y negro del dorso (a) se superpone por una malla con celdas de diferentes longitudes (e.g. Box size=512 pixeles) y el número de celdas ocupadas por al menos un pixel negro se cuenta para cada tamaño de malla (e.g. N= 30). Esto resulta en el conjunto de datos (b). Graficando log (s) frente a log (1 / N), se estima la FD de las manchas del dorso como la pendiente de la línea recta ajustada, e.g., FD= 1.813 (c). La FD capta cómo el número de cajas que contienen el patrón de manchas cambia al analizar el patrón a diferentes escalas (e.g., al cambiar el tamaño de la celda).....	24
FIGURA 5. a) Análisis de componentes principales de las tres poblaciones de rana toro (<i>Lithobates catesbeianus</i>). Se incluyen tanto las variables (líneas) como los individuos por población: rombos (La Purísima1); cuadros (La Purísima2); triángulos (Uruapilla). b) Acercamiento del gráfico A.....	27
FIGURA 6. Promedio de la Dimensión fractal por poblaciones. Las barras representan el intervalo de confianza.....	29
FIGURA 7. Promedio del área pigmentada por poblaciones. Las barras representan el intervalo de confianza.....	30
FIGURA 8. Función 1 y función 2 del análisis discriminante canónico del patrón de manchas de tres poblaciones de rana toro (<i>Lithobates catesbeianus</i>).....	31
FIGURA 9. Promedio de la dimensión fractal entre sexos. Las barras representan el intervalo de confianza	33

FIGURA 10. Promedio del área pigmentada entre sexos. Las barras representan el intervalo de confianza33

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Descriptores de forma empleados en cada una de las manchas mediante el programa ImageJ®	22
CUADRO 2. Prueba de Tukey para los componentes principales de las tres poblaciones y entre sexos. Componente principal 1 (CP1), Componente principal 2 (CP2) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001	28
CUADRO 3. Medias del número de manchas y los descriptores de forma de las manchas de la rana toro (<i>Lithobates catebesbeianus</i>) de las poblaciones Purísima1, Purísima2 y Uruapilla. El error estándar se presenta entre paréntesis	32
CUADRO 4. Medias de los descriptores de forma de las manchas de la rana toro (<i>Lithobates catesbeianus</i>) por sexo. El error estándar se presenta entre paréntesis	34

1. RESUMEN

Los patrones de pigmentación en los anfibios permiten, junto con otros factores, su adecuada adaptación al medio, sin embargo, dichos estudios son escasos. En el presente estudio trabajamos con tres poblaciones de rana toro *Lithobates catesbeianus* en dos unidades de producción ubicadas en Michoacán, México, abordando las siguientes preguntas ¿existen patrones de pigmentación en la rana toro?, ¿en caso de existir, estos podrían estar ligados a la plasticidad observada en otros ámbitos de esta especie?, ¿la pigmentación puede ser un rasgo de dimorfismo sexual en la rana toro?, y ¿de qué manera puede influir la pigmentación en la biología y ecología de la rana *L. catesbeianus*? Para contestar dichas preguntas se obtuvieron descriptores de partículas, número de manchas, área total pigmentada y dimensión fractal a partir de imágenes del dorso de los individuos, los cuales se analizaron para determinar si existen diferencias en los patrones de pigmentación entre poblaciones y entre sexos. De acuerdo a nuestros resultados, se encontraron diferencias significativas en los patrones de pigmentación entre las poblaciones: dos de las poblaciones presentaron características similares de las manchas pero difirieron con la tercera población, sin embargo, tanto el área pigmentada como la dimensión fractal mostraron diferencias significativas entre las tres poblaciones. Entre machos y hembras se encontró dimorfismo sexual en los patrones de pigmentación: las hembras presentaron mayor área pigmentada, así como una mayor complejidad de los patrones en comparación con los machos. Nuestros resultados sugieren plasticidad en los patrones de pigmentación de la rana toro, la cual les ha permitido establecerse con éxito en distintos ambientes. Por otro lado, la diferencia en los patrones de pigmentación entre machos y hembras puede permitir a estas últimas la adquisición de una mayor temperatura, beneficiando el incremento de su talla y mejorando su condición corporal, lo cual puede dar como resultado el incremento en el tamaño de la puesta y el tamaño de los huevos beneficiando con ello su adecuación y, consecuentemente, la supervivencia de la especie.

Palabras clave: patrones de pigmentación, plasticidad fenotípica, variabilidad, dimorfismo sexual, rana toro.

2. ABSTRACT

Pigmentation patterns allow amphibians, along with other factors, proper adaptation to the environment, however, such studies are scarce. In the present study we worked with three populations of American Bullfrog in two production units located in Michoacán, México, addressing the following questions: are there patterns of pigmentation in the american bullfrog?, if any, these could be linked to plasticity observed in other areas of this species?, pigmentation can be a feature of sexual dimorphism in the american bullfrog?, and how can influence pigmentation in biology and ecology of *L. catesbeianus*? To answer these questions particle descriptors, number of spots, total pigmented area and fractal dimension were obtained from images of the dorsal of individuals, which were analyzed to determine whether there are differences in patterns of pigmentation among populations and sex. According to our results, significant differences in patterns of pigmentation among populations were found: two populations were similar in some spots characteristics but differed with the third population, however, both the pigmented area as the fractal dimension showed significant differences among the three populations. Among males and females sexual dimorphism was found in pigmentation patterns: females had higher pigmented area, as well as more complex patterns compared to males. Our results suggest plasticity in pigmentation patterns of the bullfrog, which has allowed them to settle successfully in different environments. Moreover, the difference in pigmentation patterns between males and females can allow to acquire a higher temperature, benefiting their increased size and improved body condition, which can result in oviposition size increase and size of the eggs thereby benefiting their suitability and consequently the survival of the species.

Keywords: pigmentation patterns, phenotypic plasticity, variability, sexual dimorphism, american bullfrog.

3. INTRODUCCIÓN

Los anfibios son un grupo de vertebrados altamente diverso (cerca de 6,333 especies; Frost, 2013, Parra-Olea *et al.*, 2014) que se encuentra ampliamente distribuido en el mundo (Duellman y Trueb, 1986). Sin embargo, debido al cambio climático y a otras perturbaciones antropogénicas, se ha documentado un declive de sus poblaciones (Suazo, 2007; Ceballos *et al.*, 2015). Si bien la razón de esta caída poblacional puede ser atribuida a factores externos, pudiese también ser el producto de que los anfibios tuviesen una limitada resiliencia o plasticidad fenotípica, circunstancia que los haría susceptibles ante cambios abruptos de su entorno. Una manera de evaluar la magnitud de la resiliencia de los anfibios es a través del estudio de la modificaciones de sus patrones de pigmentación (Alho *et al.*, 2010) ya que éstos son indicadores confiables de sus habilidades de adaptación (Forsman y Hagman, 2009) Por ejemplo, los patrones de pigmentación cutánea permiten a los anfibios regular su temperatura corporal (Rudh y Qvarnström, 2013). En particular, los especímenes más pigmentados absorben una mayor cantidad de luz (Rudh y Qvarnström, 2013), lo que les permite calentarse e incrementar su actividad metabólica, situación que se traduce en un incremento de actividades locomotoras y reproductivas (Peterson *et al.*, 1993), vitales ambas para su supervivencia y adecuación. En los anfibios, los patrones de pigmentación cutánea son también fundamentales para la adecuada ejecución de la funciones reproductivas debido a que éstos “comunican” los atributos de las potenciales parejas, por lo que son susceptibles a procesos de selección sexual (Bell y Zamudio, 2012). En los anfibios, existe dicromatismo sexual en una gran cantidad de especies (Bell y Zamudio, 2012). Éste puede presentarse en tres clases generales:

- A) Aquellos en los que los machos presentan colores brillantes y las hembras colores monótonos.
- B) Aquellos en las que las hembras presentan colores brillantes y los machos colores monótonos.
- C) Aquellos en los que ambos machos y hembras presentan pigmentaciones conspicuas pero sexualmente dimórficas. En éste último caso, la identificación de los rasgos sexualmente dicromáticos ayuda a comprender los patrones de comportamiento asociados con la selección sexual o el éxito reproductivo, así como la evolución de los rasgos de historia de vida y los sistemas de apareamiento (Kupfer, 2007, Pokhrel *et al.*, 2013).

La rana toro *Lithobates catesbeianus* constituye una excelente unidad experimental para estudiar la capacidad de resiliencia de los anfibios. Es una especie que fue introducida en nuestro país por productores interesados en la producción de ancas. En solo unas décadas, esta rana ha sido cultivada en áreas distintas del país, siendo expuestas a ambientes diferentes en el proceso de domesticación. Además diversos trabajos sugieren que la rana Toro muestra alta plasticidad de su ciclo de vida, hábitos alimenticios, biología reproductiva y morfología (Shirose *et al.*, 1993; Govindarajulu *et al.*, 2006; Boelter *et al.*, 2007). Con el objeto de estudiar con mayor detalle la resiliencia de la rana Toro, en el presente estudio se compararon los patrones de pigmentación de especímenes hembra y macho provenientes de tres granjas distintas ubicadas en el Estado de Michoacán, utilizando como índice de plasticidad el patrón de pigmentación dorsal característico de esta especie.

4. ANTECEDENTES

Mecanismos de formación de los patrones de pigmentación

En animales, la pigmentación cutánea es un rasgo fenotípico variable que juega un papel esencial en sus actividades básicas como son la supervivencia y la reproducción. Dicha pigmentación cutánea se presenta en distintos patrones que son importantes tanto para la comunicación intraespecífica, (i.e., el reconocimiento de especies, la elección de pareja y la dominación), como para la comunicación interespecífica (i.e., la coloración de advertencia, el mimetismo y camuflaje ante presas y/o depredadores) (Protas y Patel, 2008; Rudh y Qvarnström, 2013).

Estos patrones de pigmentación cutánea están elaborados con base a la distribución diferencial de células pigmentadas que derivan de la cresta neural (Le Douarin, 1999). En anfibios, las células pigmentadas se denominan cromatóforos y se dividen en tres tipos básicos: melanóforos que contienen melanina; xantóforos, que contienen pigmentos amarillos y rojos como las pteridinas y carotenoides, e iridóforos con plaquetas reflejantes (Bagnara, 1983). En la piel, los cromatóforos se encuentran dispuestos en capas ordenadas en la dermis en donde forman a la llamada unidad dérmica cromatofórica (Fig. 1) cuya sección superior está ocupada por el xantóforo, la intermedia por el iridóforo, que refleja la luz a través del xantóforo, y la inferior por el cuerpo del melanóforo. Los procesos dendríticos de este último se extienden hacia la superficie atravesando y ramificándose en los segmentos superiores de la unidad cromatofórica (Bagnara *et al.*, 1968).

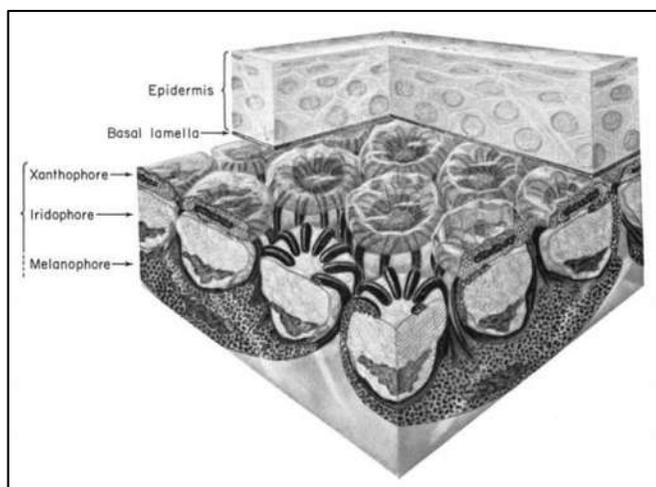


Fig.1. Interpretación esquemática del arreglo citoestructural de la unidad dérmica cromatofórica en anuros (tomado de Bagnara *et al.*, 1968).

Los mecanismos que subyacen a la formación de los patrones de pigmentación en anfibios y en otros vertebrados son poco entendidos. Sin embargo, se conoce que el proceso fundamental para que el patrón se forme requiere de la migración de los cromatoblastos no comprometidos desde la cresta neural hasta el integumento (Bagnara y Fernández, 1993). A medida que avanza el desarrollo, los cromatoblastos se dispersan desde su sitio de origen a través de los espacios extracelulares entre los tejidos embrionarios. Existen tres rutas específicas de migración: 1) dorsalmente, dentro de la aleta en expansión; 2) ventralmente, entre las somitas y el tubo neural; y 3) lateralmente, entre las somitas y el ectodermo suprayacente. La ruta que los cromatoblastos inicialmente siguen varía en las diferentes especies de anfibios (Tucker y Erickson, 1986). Los cromatoblastos son en gran parte indeterminados cuando comienza la migración, pero durante este proceso, o en algún punto después de llegar a su último destino, adquieren su fenotipo (Bagnara y Fernández, 1993).

Actualmente, se han propuesto factores candidatos que controlan la sincronización de la migración de los cromatóforos, entre ellos se encuentran la composición de la matriz extracelular, la aparición de moléculas quimio-atrayentes/repelentes y cambios en las propiedades de adhesión de las células. También, es posible que las células de la cresta neural precursoras puedan ser forzadas a un camino específico debido a la naturaleza no atractiva de otras regiones (Painter *et al.*, 2000; Le Douarin y Dupin, 2003; Le Douarin, 2004).

Aun cuando los cromatoblastos no muestran pigmentos al comienzo de la migración, se han identificado marcadores que permiten identificarlos. Entre los marcadores tempranos de melanóforos se encuentran el *Mitf* (Kumasaka *et al.*, 2004), y dentro de la familia de las tirosinasas (la cual codifica para enzimas melanogénicas) se encuentra el gen *Dct* (Kumasaka *et al.*, 2003), por lo que el estudio de su expresión es muy útil en la conducción de trabajos encaminados a entender los mecanismos de pigmentación en anuros.

La posibilidad de que la acción de la hormona estimulante de melanocitos (MSH) secretada por la glándula pituitaria tenga un papel importante en los patrones de pigmentación, la ha convertido en un tema atractivo (Fernandez y Bagnara, 1991; Mangano *et al.*, 1992). Sin embargo, algunos estudios han mostrado que la acción de la MSH no es un factor causal en el desarrollo de patrones de pigmentación básicos (Chang, 1957; Turner *et al.*, 1977); pero puede jugar un papel modificador al estimular el reclutamiento de melanoblastos latentes (Bagnara y Fernandez, 1993).

Durante mucho tiempo se ha propuesto que el integumento contiene factores que regulan la expresión de patrones de pigmentación (Epperlein y Lofberg, 1990). Sin embargo, se ha mostrado que la expresión de los patrones de pigmentación reside en la piel embrionaria y que la diferenciación de los cromatoblastos está influenciada por factores locales (Bagnara *et al.*, 1979). Estos factores pueden incluir elementos de la matriz extracelular y factores solubles tales como el inhibitorio de la melanización (MIF) y el estimulante de la melanización (MSF). Ambos factores pueden ser elementos principales en el control de la expresión de los patrones de pigmentación en los vertebrados (Fukuzawa y Bagnara, 1989; Fukuzawa *et al.*, 1995). Por ejemplo, en la rana *Xenopus laevis* se presenta un patrón en el que la piel del dorso (donde los melanóforos están presentes en alta densidad) es moteada oscura mientras la piel del vientre es clara. Se ha observado que existen melanóforos en la piel ventral de las larvas de esta rana pero fallan en la diferenciación (Ohsugi y Ide, 1983; Fukuzawa y Ide, 1986), ya que la piel ventral produce el factor de inhibición de la melanización (MIF). Además, se ha mostrado que la MIF puede anular los efectos estimulatorios de la MSH y MSF (Fukuzawa y Bagnara, 1989). Aparentemente, la actividad de la MSF está especialmente concentrada en los puntos negros situados en la piel del dorso de *Rana pipiens* (Mangano *et al.*, 1992).

Modelos propuestos para la formación de patrones de pigmentación

A pesar de los estudios encaminados a entender la formación de patrones de pigmentación, no ha sido posible describir los procesos que los originan, por ello, ha sido necesario la generación de modelos que permitan aproximarse a los mecanismos subyacentes.

Aunque los modelos matemáticos no están diseñados para identificar los genes o rutas de señalización involucradas en la formación de patrones, pueden ayudar a predecir comportamientos fundamentales de los patrones en la piel, y pueden sugerir las condiciones necesarias para su formación (Kondo y Shirota, 2009).

Si bien hay una gran diversidad de patrones de pigmentación, Kondo y Shirota (2009) han propuesto la existencia de tres características comunes que podrían sugerir los mecanismos fundamentales: 1) la gran diversidad de patrones entre especies relacionadas, sugiriendo que la flexibilidad en los mecanismos es una característica en común entre los animales; 2) la autonomía de los patrones, los cuales parecen ser independientes de los tejidos internos y estructuras corporales; y 3) la robustez de los patrones contra las perturbaciones.

Un modelo propuesto para generar patrones lo presentó Turing en 1952, en él expone un mecanismo basado en la interacción reacción y difusión (RD), en el que dos sustancias interactúan entre sí y difunden a diferentes velocidades. Turing mostró matemáticamente que este mecanismo es capaz de formar algunos patrones espacio-temporales característicos en el campo (Kondo, 2002).

Uno de los mecanismos clásicos que cumplen las características postuladas por Turing es el llamado activador-inhibidor (Gierer y Meinhardt, 1972). Este sistema considera la existencia e interacción química y/o biológica de morfógenos llamados activador e inhibidor. Localmente, el activador se autoinduce por medio de autocatálisis y además promueve la producción del inhibidor, el cual a su vez inhibe la producción del activador. Además, es usual suponer que la difusión del inhibidor es mayor que la del activador, por lo que se habla de mecanismos de inhibición de largo alcance y de activación de corto alcance, los cuales se piensa son una característica fundamental para la formación de patrones (Martínez y Padilla, 2011). La propiedad autocatalítica del activador y el circuito de realimentación del inhibidor hace oscilar el sistema cuando las constantes catalíticas se han establecido correctamente. Como moléculas

normales, se espera que ambas sustancias se difundan en las células vecinas de acuerdo con el gradiente de concentración. La relación de las constantes de difusión de las dos sustancias juega un papel clave en la determinación del comportamiento del sistema (Kondo, 2002).

Otro modelo que se ha propuesto es el epigenético, que se refiere en un sentido amplio a las modificaciones del ADN sin la alteración directa de sus secuencias. Estas modificaciones determinan cómo se empaqueta la cromatina y por consiguiente la expresión genética. Dentro de los mecanismos epigenéticos más estudiados se encuentran la metilación del ADN y la modificación de histonas (Mendizabal *et al.*, 2014). En este modelo se entiende como epigenético no sólo a los mecanismos mencionados como la metilación, sino también a procesos tales como la comunicación celular, interacciones célula-ambiente; tensegridad (que da estabilidad estructural a un sistema por medio de mecanismos de compresión-tensión o atracción-repulsión) y otros mecanismos fisicoquímicos (Caballero *et al.*, 2012). Basado en este entendimiento de los fenómenos epigenéticos, Caballero *et al.* (2012) analizaron algunos mecanismos físicos en el establecimiento de los patrones de pigmentación. En su modelo postulan tres fundamentos: a) las células migran en un medio viscoelástico, generando grandes fuerzas debido a la tracción y contracción; b) las fuerzas de tracción de la célula deforman el sustrato y generan pistas en las que otras células son más propensas a adherirse y establecerse; y c) la presencia de pistas de tensión puede dar lugar a arreglos celulares no triviales y a mecanismos de largo alcance para generar y estabilizar los patrones. Este modelo es compatible con el modelo RD, pero se propone específicamente que las interacciones de largo y corto alcance podrían ser el resultado de patrones de tensión y afinidad célula-célula en lugar de la acción morfógeno, integrando algunas de las fuerzas mecánicas que parecen desempeñar un papel relevante en la formación de la morfogénesis y el patrón de pigmentación (Ingber, 2004; Schotz *et al.*, 2008).

Descripción de patrones de pigmentación

La amplia diversidad de patrones de pigmentación que se presentan en la naturaleza han llamado la atención tanto de científicos como de no científicos, por lo que han sido objeto de numerosos estudios por su importancia en diversas áreas como el conocimiento en la formación de patrones, el papel que juegan en un rango amplio de funciones vitales que incluyen la termorregulación, protección de la radiación ultravioleta y funciones inmunes (Jawor y Breitwisch, 2003; Griffith

et al., 2006; Rudh y Qvarnström, 2013); en su ecología como en la elección de pareja, camuflaje y comunicación (Kelsh *et al.*, 2009); y en su evolución como identificadores de taxa (Lawson y King, 1996; Joron *et al.*, 1999; Merilaita, 2001) y desarrollo ontogenético (Kenyon *et al.*, 2010) entre otras.

Debido a la importancia que representa el estudio de los patrones de pigmentación, la descripción de estos se ha convertido en una parte vital a considerar. Las metodologías que se han empleado son diversas y varían dependiendo del objetivo del estudio y la complejidad del patrón de pigmentación. La mayoría de los patrones de pigmentación pueden ser más o menos clasificados en tres configuraciones básicas: puntos, rayas y polígonos (Kondo y Shirota, 2009). Una de las herramientas más comunes para la descripción de los patrones es la extracción de valores a partir de fotografías, valores que pueden ser seleccionados por el investigador o a partir de un protocolo establecido (Biancardi y Di Cerbo, 2010). Sin embargo, los patrones más complejos requieren de una metodología más específica; entre las metodologías que se han empleado para su cuantificación se encuentran la adyacencia del color (Endler, 2012), la transformada de la distancia (Taylor *et al.*, 2013) y la dimensión fractal (Pérez *et al.*, 2013).

En el análisis de adyacencia de color se emplea un mapa de zona, el cual es una imagen o un mapa detallado de un área cubierta por un mosaico de cada una de las clases de color/luminancia. Cada clase de parche se identifica por un número en un pixel o punto de muestreo y se clasifica con base al color y la luminancia. Previo al mapa de zona se obtienen valores para cada pixel mediante diferentes métodos dependiendo del objeto de estudio (*e.g.* espectros de reflectancia, fotografías a color con valores rojo-verde-azul, “RGB por sus siglas en inglés”, para cada pixel basados en la visión humana o con fotografías con valores RGB calibrados a la visión del receptor que sean similares a los canales en que los recibe la cámara). Una vez obtenidos los valores del mapa de la zona, se realiza el análisis de adyacencia que permite conocer las clases, su frecuencia y la transición entre ellas. Esta metodología resulta útil para estudios en los que se toma en cuenta la visión del animal, como es el desarrollo evolutivo de patrones miméticos y reconocimiento de especies (Endler, 2012).

El método de transformada de la distancia es aplicado en patrones que tienen dos colores separados claramente, las imágenes se convierten en binarias y se asigna un valor para cada color (segmento). Para cada imagen se calcula la distancia entre los pixeles de cada segmento.

El resultado es la ubicación de los píxeles, permitiendo así, comparar la similitud de las distancias entre dos imágenes. Este método ha sido aplicado en patrones miméticos. Sin embargo, éste no permite evaluar la tonalidad de los colores en los patrones puesto que la imagen es convertida a binaria (Taylor *et al.*, 2013).

Pérez *et al.* (2013) proponen a la dimensión fractal como un método para describir patrones de pigmentación, obteniendo una medida de integración de diversas medidas, la cual captura la complejidad del patrón explorado a diferentes escalas, lo que sería de gran ayuda para estudiar su variabilidad y funcionalidad. La dimensión fractal puede ser calculada con distintos métodos. Por ejemplo, el método de conteo de cajas consiste en la conversión de imagen en binaria. Posteriormente, se superponen mallas de distintos tamaños, se contabilizan las celdas ocupadas por la imagen y se repite la operación para otro tamaño de celda. Finalmente se calcula la pendiente de la regresión lineal del logaritmo del número de celdas contra el logaritmo del tamaño de la celda, siendo éste valor la dimensión fractal (Pérez *et al.*, 2013). Por otro lado, los análisis estadísticos que se empleen también dependerán de la información que se quiera extraer de los patrones.

Plasticidad fenotípica en la pigmentación

La plasticidad fenotípica se define como la capacidad de un solo genotipo para producir más de una forma alternativa de morfología, estado fisiológico y/o comportamiento en respuesta a las condiciones ambientales (West-Eberhard, 1989). En muchos animales se ha estudiado la plasticidad fenotípica, desvelando a la pigmentación como uno de los rasgos fenotípicos más variables. En anfibios, se ha encontrado que la variación en la pigmentación desempeña un papel en su termorregulación, protección UV, evasión de depredadores, y en la señalización sexual (Rudh y Qvarnström, 2013). En un estudio realizado en la rana *Rana temporaria* se encontró un mayor grado de melanismo al aumentar la latitud, sugiriendo que tiene una función termorreguladora; mediante experimentos en jardines comunes mostraron que no había correspondencia con la diferenciación genética, sugiriendo a la plasticidad ontogenética y del medio ambiente como las más probables fuentes de variación (Alho *et al.*, 2010).

Estudios sobre plasticidad en la pigmentación también se han llevado a cabo en otros organismos. Por ejemplo, en copépodos se ha mostrado que cambian sus niveles de pigmentación de acuerdo al ambiente en el que viven: en regiones polares sus niveles de

pigmentación son más altos debido a que los niveles de radiación UV también lo son (Hairston, 1979; Luecke y O'Brien, 1981). Además, en regiones templadas, donde la amenaza de rayos UV es menor que en las regiones polares, los copépodos generalmente acumulan menos pigmento que en aquellas regiones con altitudes mayores (Hansson, 2000). Por otro lado, cuando los niveles de depredación por peces son altos, los niveles en la pigmentación en los copépodos suelen ser considerablemente más bajos que en lagos libres de peces (Hairston, 1979; Luecke y O'Brien, 1981). Organismos como las aves, que muestran una amplia gama de patrones en su coloración, también han sido objeto de estudio. Muchas especies muestran una variación geográfica en la pigmentación por melanina. Por ejemplo, en ambientes más húmedos como en el noroeste del Pacífico, los pájaros son más oscuros que los que habitan en los desiertos de Arizona (Zink y Remsen, 1986). En un estudio donde distintas especies de aves (*Turdus Catharus mustelinus*, gorriones de garganta blanca *Zonotrichia albicollis*, y palomas Inca *Columbina inca*) fueron criados en condiciones extremas de humedad, estos cambiaron su coloración después de la muda, volviéndose más oscuros (Beebe, 1907).

Aunque existen estudios sobre la variación en la pigmentación en algunos organismos, la mayoría se han enfocado en los cambios de pigmentación en un periodo de tiempo muy corto, especialmente en anfibios (Nilsson *et al.*, 2012; Medina, 2013), que al ser organismos ectotermos cambian su coloración de acuerdo a la temperatura o la cantidad de luz. Sin embargo, los estudios encaminados a la variación en los patrones de pigmentación son escasos.

Dimorfismo sexual

El dimorfismo sexual es la condición fenotípica que resulta de las diferencias anatómicas y funcionales conespecíficas existentes entre machos y hembras y se encuentra extendida en muchos grupos de animales (Arantes *et al.*, 2015). Los anfibios son sexualmente dimórficos en tamaño, forma, color, morfología de sus ornamentos y en características fisiológicas (Halliday y Verrell, 1986; Kupfer, 2007; Bell y Zamudio, 2012). Específicamente en anuros, la forma más común de dimorfismo sexual es el tamaño corporal, ya que se presenta en más del 90% de las especies, y estas diferencias son atribuidas a la fecundidad (cuando las hembras son más grandes; Bell y Zamudio, 2012), o a la selección sexual (cuando los machos son más grandes; Bell y Zamudio, 2012). El dimorfismo sexual puede resultar de una variedad de fuerzas selectivas que no tienen por qué implicar a la selección sexual (Halliday y Verrell, 1986). Por

ejemplo, de la selección natural pueden surgir adaptaciones ecológicas que reduzcan la competencia entre los sexos, incluyendo segregación de nichos, ontogenia y las interacciones depredador-presa (Carothers, 1984; Shine, 1989; Bell y Zamudio, 2012).

En anfibios, el dicromatismo es una forma de dimorfismo sexual en el que las hembras y los machos difieren en color, y aunque se ha documentado en más de 120 especies, tanto su función como su evolución son poco conocidas (Bell y Zamudio, 2012). En anuros se ha hecho una distinción entre dos grandes clases de dicromatismo sexual: dicromatismo dinámico y dicromatismo ontogenético. En el dicromatismo dinámico los machos experimentan un cambio de coloración durante la temporada de apareamiento, la duración de este cambio varía desde unas horas hasta días o semanas durante la temporada de reproducción. Por otro lado, en el dicromatismo ontogenético tanto hembras como machos experimentan un cambio de color y/o patrón de color permanente, por lo general en el inicio de la maduración sexual (Bell y Zamudio, 2012). El grado en la diferenciación de color entre los sexos varía desde diferencias sutiles en el tono (e.g. *Scaphiophryne gottlebei*; Glaw y Vences, 1994) hasta diferencias dramáticas en color y patrones (e.g. *Hyperolius argus*; Stewart 1967).

La coloración cutánea informa a los conespecíficos del estado físico, especialmente cuando se utiliza como una señal de condición dependiente de la calidad en el caso de los machos (Candolin, 1999; Keyser y Hill, 1999; Sheldon *et al.*, 2003). Estudios en *Lithobates clamitans* sugieren que los machos que tienen una señal de baja calidad (gargantas amarillo pálido) tienden a encontrarse en mal estado, y machos con una señal de alta calidad (gargantas amarillo oscuro) también tienden a estar en mal estado. Los machos en buen estado tienden a tener una señal de calidad intermedia (garganta de color amarillo medio). Este tipo de resultado puede ser una consecuencia de dos distintos escenarios: 1) un equilibrio entre la calidad y la condición corporal, si un macho está en malas condiciones puede ser incapaz de sostener un rasgo sexual costoso, y si un macho está sosteniendo un rasgo sexualmente costoso es incapaz de mantener una condición corporal alta; y 2) los machos con una señal de alta calidad pueden representar una estrategia de inversión terminal (Schulte y Schank, 2009). Aunque el grado de amarillo en la garganta no puede ser considerado una señal confiable para conocer la condición corporal, sí es un reflejo del tamaño corporal y por lo tanto de la edad debido a que los machos más viejos tienden a ser más grandes (Shirose y Brooks, 1995). Ya que los machos grandes tienen mayor

éxito en la adquisición de pareja (Howard, 1988; Howard *et al.*, 1994), el tamaño podría estar jugando un rol importante en la elección de la hembra. Esto es especialmente importante en organismos que durante el cortejo permanecen con el cuerpo parcialmente sumergido y no es posible para la hembra evaluar su tamaño corporal, por lo que el grado de amarillo en la garganta le sirve como una señal para evaluarlo (Schulte y Schank, 2009).

El patrón de pigmentación dorsal también se ha estudiado en algunos caudados, por ejemplo, en *Ambystoma maculatum* se encontraron diferencias significativas en las características de las manchas entre los sexos. Los individuos mostraron una correlación entre el color y el área cubierta por puntos y entre la variación en el color y la condición corporal. Las asociaciones entre color, sexo y calidad sugieren que los puntos amarillos de *A. maculatum* podrían funcionar como una señal honesta de la calidad del organismo y por lo tanto podría ser producto de la selección sexual (Morgan *et al.*, 2014).

En el caso específico de la rana Toro existe dimorfismo sexual en algunas características, tales como el tamaño del tímpano (Adriaens *et al.*, 2013), que son evidente durante toda su vida. Sin embargo, existen otras características que se presentan solamente durante la temporada de reproducción como las almohadillas nupciales hinchadas y la coloración amarilla en la zona gular (Adriaens *et al.*, 2013). Se ha visto que durante la reproducción los machos muestran sus gargantas cuando están interactuando con machos rivales (Ryan, 1980), teniendo quizá relación con su tamaño corporal como el mostrado para *L. clamitans*. Sin embargo, no hay estudios que muestren que la coloración dorsal en rana Toro tenga un papel para la reproducción.

La rana Toro como modelo de estudio

La rana Toro (*Lithobates catesbeianus*) es una especie nativa del este de Norteamérica que ha sido introducida en más de 40 países y cuatro continentes en el último siglo (Ficetola *et al.*, 2007). Esta rana ha sido introducida con fines comerciales, pero la falta de control en su manejo ha tenido como consecuencia la presencia de estos organismos en vida libre, por lo que se han realizado diversos estudios sobre su ecología y aspectos reproductivos (Shirose *et al.*, 1993; Govindarajulu *et al.*, 2006; Boelter *et al.*, 2007). A raíz de estos estudios, han sido evidentes las razones por las que ha tenido gran éxito como especie invasora, algunas de éstas características se mencionan a continuación:

- Desarrollo gonadal continuo, un largo periodo reproductivo y una fecundidad muy alta (Howard, 1978); una tasa alta de supervivencia de sus larvas en comparación con otros anuros (11.8%-17.6%; Cecil y Just, 1979).
- Hábitos alimenticios generalistas que le permiten comer una gran diversidad de presas (Corse y Metter, 1980; Albertini y Lanza, 1987; Beringer y Johnson, 1995).
- Es una especie que está adaptada a climas cálidos, pero de acuerdo con los modelos de nicho, la probabilidad de ocurrencia de la rana Toro es más alta para las zonas que presentan temperaturas mínimas en el mes más frío de entre -20 y 14 °C, y puede estar presente en zonas que tienen temperaturas mayores a 20 °C (Ficetola *et al.*, 2007a).
- Alta capacidad de dispersión, la cual es rápida en comparación con otros anfibios (movimientos individuales mayores a 3km; Anon, 2011). En etapas post-metamórficas son capaces de dispersarse grandes distancias y son adeptas a colonizar nuevos sitios (e.g. altitudes mayores a 1200m; Willis *et al.*, 1956). Además, su difusión mundial ha sido especialmente rápida debido a la asistencia humana (Baker, 1999).
- Puede establecerse exitosamente a partir de un número muy limitado de fundadores (Ficetola *et al.*, 2008).
- Puede ocupar un amplio rango de tipos de hábitat en humedales y es beneficiada con la interferencia humana en el paisaje (Ficetola *et al.*, 2007b).

La evidencia sobre la diversidad de fenotipos en rana toro ha dado cuenta de su plasticidad, y aunque uno de los rasgos más evidentes es la variabilidad de sus patrones de pigmentación, no se ha realizado ningún estudio sobre éstos.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Determinar si existen diferencias en los patrones de pigmentación de *L. catesbeianus* entre tres poblaciones pertenecientes a dos unidades de producción.

5.2. Objetivos Particulares

1. Describir los patrones de pigmentación característicos en individuos de tres distintas poblaciones de rana toro colectadas en dos unidades de producción, combinando la documentación fotográfica con técnicas de análisis digital de imágenes.
2. Determinar si existen diferencias en los patrones de pigmentación entre las tres poblaciones pertenecientes a dos unidades de producción.
3. Determinar si existen diferencias en los patrones de pigmentación entre machos y hembras.

6. HIPÓTESIS

De acuerdo a estudios que han mostrado que la rana Toro posee plasticidad en su ciclo de vida, hábitos alimenticios, biología de la reproducción y morfología, y dado el papel de la pigmentación como factor coadyuvante en el establecimiento de las especies, la exposición a distintas condiciones de crianza en esta especie podría generar variaciones en los patrones de pigmentación entre tres poblaciones de rana toro *L. catesbeianus*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Descripción de la especie

Posición taxonómica.

Clase: Amphibia

Orden: Anura

Familia: Ranidae

Género: *Lithobates*

Especie: *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802).

Descripción: Esta rana es la más grande en Norteamérica y va de entre 10 a 20 cm de longitud del hocico a la cloaca y presenta un peso de entre 60 y 900g en adultos. Sus larvas son excepcionalmente grandes, midiendo entre 15 y 18 cm. El color de su dorso varía de verde claro u oliva a café verdoso, generalmente con manchas cafés. Su cabeza es ancha y plana, presenta un pliegue de piel a cada lado, el cual va de atrás del ojo hasta el tímpano, bordeándolo. Su vientre es de color blanquecino con algunas manchas color gris y en sus patas traseras presenta barras o manchas oscuras. Todos los dedos de sus patas traseras, excepto el cuarto, presentan membranas interdigitales. En los machos, el tímpano tiene un diámetro mayor que el ojo y presenta un borde oscuro; en las hembras es del mismo tamaño que el ojo (AmphibiaWeb, 2006; Álvarez-Romero *et al.*, 2008; Bury y Whelan, 1984; IUCN 2015).

Hábitos: La rana toro es tanto diurna como nocturna. Los adultos son carnívoros y los renacuajos y juveniles son herbívoros, aunque se pueden alimentar de pequeños invertebrados (IUCN, 2015).

Hábitat: Como especie nativa y como invasora, la rana toro se asocia a ambientes acuáticos y semiacuáticos. Requiere de una fuente permanente de agua y prefiere cuerpos de agua estancados con vegetación acuática. Puede establecerse con éxito en charcas, lagos, depósitos de agua, pantanos, oasis, márgenes de corrientes, zanjas de irrigación y lagos artificiales (Bury

y Whelan, 1984).

Distribución: La rana toro es una especie de amplio rango de distribución. Su rango nativo es desde Nueva Escocia y New Brunswick al sur de Quebec, Canadá, hasta el sur y este de Norteamérica, además, ha sido introducida en más de 40 países y cuatro continentes en el último siglo (Ficetola *et al.*, 2007).

Estatus en la Lista Roja de la IUCN: Preocupación menor (LC=Least Concern) (IUCN).

7.2. Sistema de estudio

El estudio se realizó en dos unidades de producción de rana toro *L. catesbeianus* en el estado de Michoacán. Estas unidades cuentan con un sistema empleado para la ranicultura, el cual consiste en un módulo con estanques de concreto semisecos, dentro de una cubierta de invernadero (Sistema producto rana, A.C.).

La primera unidad de producción se encuentra ubicada en La Purísima, municipio de Álvaro Obregón. Esta unidad cuenta con 41 estanques de 2 x 1.80 m con una densidad de 500-800 organismos por estanque, los cuales son separados por tamaños, por lo que se encuentran estanques con organismos en etapa juvenil y estanques con adultos de ambos sexos; por otro lado, los estanques empleados para los renacuajos tienen una dimensión de 3 x 3 m con una densidad de 100 mil organismos por estanque. Los organismos son alimentados tres veces al día con alimento El Pedregal®. El invernadero no cuenta con un diseño que le permita controlar la temperatura, por lo que las temperaturas fluctúan de los 16°C a los 50°C, aproximadamente. La unidad mantiene su producción mediante la reproducción de sus propios organismos, sin embargo, cuando no cuentan con el número adecuado para satisfacer la demanda, se proveen de ranas de una unidad de producción en Mazatlán. En esta unidad de producción se consideraron dos poblaciones: una proveniente de Mazatlán (La Purísima 1, n=40) y una segunda población de organismos reproducidos en la misma unidad (La Purísima 2, n=40).

La segunda unidad de producción se encuentra ubicada en Uruapilla, municipio de Morelia. Esta unidad cuenta con 36 estanques de 2.80 x 1.50 m con una densidad de 200 organismos por estanque, al igual que en la Purísima, los organismos son separados por tamaño, pero en los adultos difiere ya que en ésta unidad son además separados por sexo. Los organismos son

alimentados dos veces al día con alimento Purina®. Esta unidad también carece de un diseño para controlar la temperatura, por lo que ésta oscila entre los 6°C y los 40°C, aproximadamente. En esta unidad no se realiza reproducción ya que no cuenta con las condiciones necesarias para que los renacuajos logren la metamorfosis, por lo que se proveen de organismos de distintas unidades de producción. Debido a que no se conoce el origen de cada organismo se consideró como una población (n=80).

7.3. Fotografías y procesamiento

Se tomaron fotografías del dorso de cada individuo en las tres poblaciones con una cámara Nikon® Coolpix L120, colocando una regla al costado del organismo para definir la escala al momento de procesar las imágenes (Fig. 2). Las fotografías fueron impresas y se eligió un área de 20 cm² de la misma región del dorso. Se obtuvo el patrón de manchas de esa región sobre papel vegetal de cada fotografía para después ser escaneado y convertido en imagen binaria con el programa ImageJ (V1.48, NIH USA) (Fig. 3).



Fig. 2. Fotografías del dorso de *Lithobates catesbeianus*.

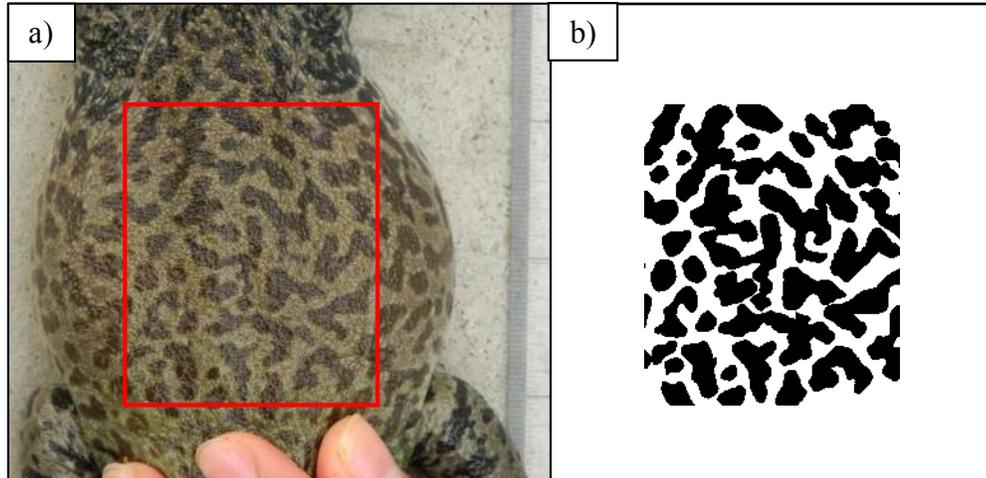


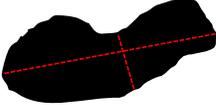
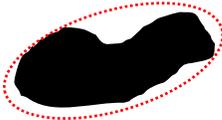
Fig. 3. Patrón de pigmentación de rana toro (*Lithobates catesbeianus*). Área (20 cm²) seleccionada del dorso (a), imagen binaria de la selección (b).

7.4. Descripción de los patrones de pigmentación

El patrón de coloración es un atributo que no es sencillo de estudiar y es sorprendentemente difícil de cuantificar, además de ser altamente variable dentro y entre poblaciones, y aunque actualmente existen distintos métodos para describir patrones (Pérez *et al.*, 2013), estos métodos pueden o no ser útiles dependiendo del objetivo del estudio, por lo que es necesario emplear distintas técnicas y análisis que se ajusten al fin deseado.

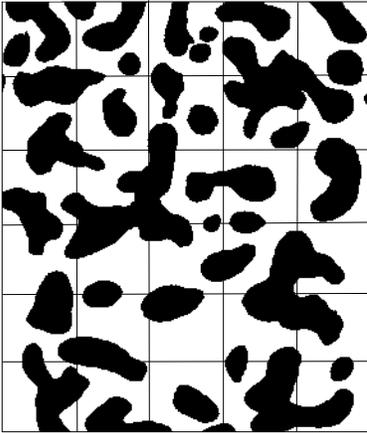
Para la descripción de los patrones de pigmentación se empleó el programa ImageJ, el cual permite identificar partículas en imágenes binarias, es decir, imágenes en las que cada pixel asume sólo dos valores discretos, blanco fondo de pantalla y negro partícula. El programa cuenta con un módulo de análisis de partículas en el cual se obtuvieron los valores de los descriptores de forma para cada una de las manchas (Cuadro 1). Por otro lado, se obtuvo el área total pigmentada.

Cuadro 1. Descriptores de forma empleados en cada una de las manchas mediante el programa ImageJ®

Descriptor	Descripción de la variable
Área	
Perímetro	
Circularidad	$4\pi \times \frac{\text{Área}}{[\text{Perímetro}]^2}$ con un valor de 1.0 indica un círculo perfecto. A medida que el valor se aproxima a 0.0, indica una forma cada vez más alargada.
Relación de aspecto	<p>La relación de aspecto de la elipse ajustada de la forma, es decir, (Eje mayor) / (Eje Menor).</p> 
Redondez	$\frac{4 * \text{Área}}{\pi * (\text{Eje mayor})^2}$. La redondez (o su antónimo, la angularidad), expresa las variaciones en las esquinas.
Solidez	$\frac{\text{Área}}{(\text{Área convexa})}$ 
Diámetro de Feret	<p>Distancia perpendicular entre líneas paralelas tangentes al perímetro en lados opuestos de un objeto bidimensional. Es la distancia más larga entre dos puntos cualesquiera a lo largo del límite de selección.</p> 

Además de los descriptores de forma, los patrones de pigmentación se describieron mediante la dimensión fractal (FD, por sus siglas en inglés). La FD es un parámetro altamente integrativo, cuyo valor está influenciado por propiedades tales como el número, longitud, tortuosidad y conectividad de los elementos dentro de un objeto dado, por lo que es extremadamente útil para estudiar las formas complejas y patrones de pigmentación desplegado en los animales y puede ser aplicado potencialmente a cualquier tipo de patrón (manchas, barras o formas irregulares; Pérez, et al. 2013). Para calcular la FD se utilizó el método de conteo de celdas o cajas (Box counting method), usando el programa ImageJ. En este método, cada imagen está cubierta por una secuencia de redes de tamaño descendente, y para cada una de las redes se registran dos valores, el número de cajas que intersectan a la imagen $N(s)$, y la longitud del lado de los cuadrados de la red (s). La pendiente de la regresión lineal de $\log(N(x))$ contra $\log(1/s)$ indica el grado de complejidad o FD, éste parámetro se encuentra entre 1 y 2 (valores más altos indican mayor complejidad; Fig. 4).

a)



b)

s	N	log(s)	log(1/N)
2	800868	0.693147181	-13.59345142
3	359409	1.098612289	-12.79221629
4	203987	1.386294361	-12.22581155
6	92245	1.791759469	-11.43220336
8	52815	2.079441542	-10.87455052
12	24260	2.48490665	-10.09658418
16	14161	2.772588722	-9.558246986
32	3990	3.465735903	-8.29154651
64	1241	4.158883083	-7.123672785
128	404	4.852030264	-6.001414878
256	118	5.545177444	-4.770684624
512	30	6.238324625	-3.401197382

c)

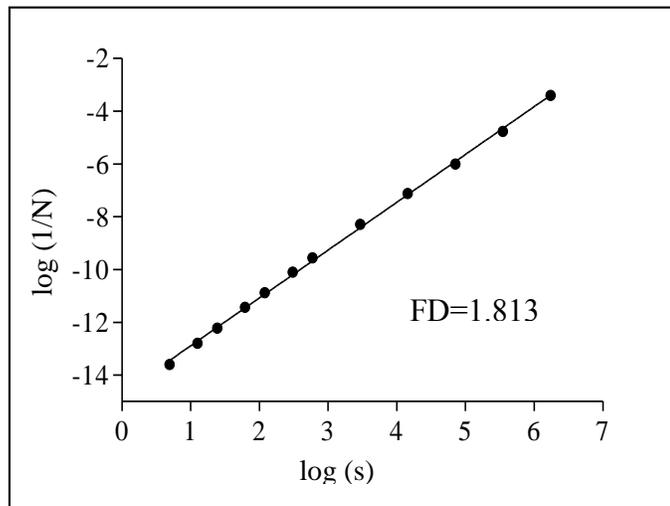


Fig. 4. Ejemplo del cálculo de la dimensión fractal (FD) de las manchas del dorso de *Lithobates catesbeianus* utilizando el método de conteo de celdas. La imagen en blanco y negro del dorso (a) se superpone por una malla con celdas de diferentes longitudes (e.g. Box size=512 pixeles) y el número de celdas ocupadas por al menos un pixel negro se cuenta para cada tamaño de malla (e.g. N= 30). Esto resulta en el conjunto de datos (b). Graficando $\log(s)$ frente a $\log(1/N)$

N), se estima la FD de las manchas del dorso como la pendiente de la línea recta ajustada, e.g., $FD = 1.813 (c)$. La FD capta cómo el número de cajas que contienen el patrón de manchas cambia al analizar el patrón a diferentes escalas (e.g., al cambiar el tamaño de la celda).

7.5. Análisis estadísticos

Se aplicó un análisis de componentes principales (PCA) a los descriptores de forma (área de la mancha, perímetro, circularidad, diámetro de Feret, relación de aspecto, redondez y solidez), incluyendo el número de manchas encontradas en el área analizada (20 cm^2) con el objetivo de reducir la dimensionalidad de las variables y adquirir nuevas variables representadas por los scores de los componentes principales (se seleccionaron los componentes principales en base al criterio propuesto por Pla (1986) de incluir sólo aquellos componentes con valores propios (eigenvalores) mayores o igual a uno).

Para determinar si existen diferencias en las características de los patrones de pigmentación entre las poblaciones y entre sexos se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, utilizando para ello los scores de las nuevas variables obtenidas previamente mediante el PCA. Además, se aplicó una prueba *post hoc* Tukey para identificar cuáles poblaciones difirieron entre sí, considerándose significativo un valor de $p < 0.05$. Asimismo, se realizaron dos ANOVA's de dos vías para contrastar entre poblaciones y sexo, en el primero se usó exclusivamente la dimensión fractal, debido a que ésta variable es un factor de complejidad que describe al patrón completo y por lo mismo no fue incluido en el PCA; el segundo fue para contrastar el área total pigmentada entre poblaciones y sexo.

Finalmente, se usaron los descriptores de forma (área de la mancha, perímetro, relación de aspecto, redondez, circularidad, solidez y diámetro de Feret) y el número de manchas en dos análisis canónicos discriminantes (DCA); el primero considerando las 3 poblaciones y el segundo para los sexos, esto con el fin de determinar si las características de las manchas de los individuos permite que los individuos sean asignados a la población de la que provienen, asimismo, el análisis nos permitió identificar las características de forma que permiten discriminar los patrones de pigmentación observados entre poblaciones y sexos. Para los análisis estadísticos se emplearon los softwares STATISTICA 7 y SPSS 17.

8. RESULTADOS

Se obtuvieron 40 imágenes binarias para cada población de la unidad de producción La Purísima y 80 para la unidad de producción Uruapilla. En La Purísima1 el número promedio de manchas encontradas fue de 40.95 ($ES \pm 2.35$) con un mínimo de 6 y máximo de 65 manchas. Se identificó el sexo de 39 individuos, de los cuales 15 fueron hembras y 24 machos. En La Purísima2 el número promedio de manchas encontradas fue de 33.92 ($ES \pm 2.11$) con un mínimo de 12 y máximo de 64 manchas. Se identificó el sexo de los 40 individuos: 21 hembras y 19 machos. En la unidad de producción Uruapilla el número de manchas promedio fue de 39.35 ($ES \pm 1.51$) con un mínimo de 7 y máximo de 76 manchas. Se identificó el sexo de 59 individuos, de los cuales 27 fueron hembras y 32 machos.

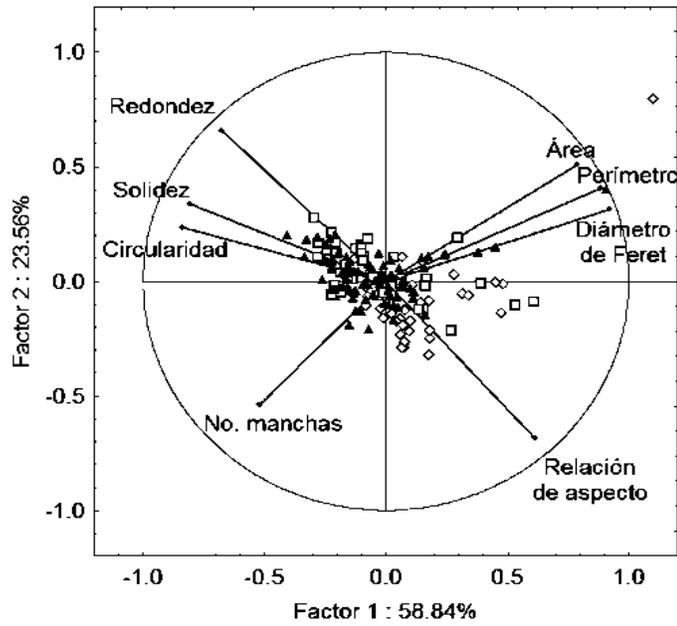
8.1. Patrones de pigmentación entre poblaciones

Se obtuvieron dos componentes principales con eigenvalor > 1 : CP1 explicó el 58.84% de la varianza y el CP2 explicó el 23.55%, explicando entre ambos componentes el 82.4% de la varianza. Las variables con mayor contribución en el CP1 fueron el diámetro de Feret, perímetro y circularidad, mientras que en el CP2 las variables de mayor contribución fueron la relación de aspecto y redondez.

Se graficaron las variables y los individuos en los dos componentes principales (Fig. 5 a, b), en donde se observó que las variables área, perímetro y diámetro de Feret están relacionadas positivamente entre sí y negativamente con el número de manchas, por otro lado, la redondez, solidez y circularidad están relacionadas positivamente entre sí, y negativamente con relación de aspecto (Fig. 5 a, b).

En cuanto a los individuos, se observó un solapamiento en las características de las manchas entre las poblaciones, sin embargo, se puede distinguir que La Purísima1 se encuentra influenciada por la relación de aspecto, los individuos de La Purísima2 se encuentran más influenciados por la circularidad, solidez y redondez y los individuos de Uruapilla, aunque se observan individuos dispersos, la mayor parte se encuentran influenciados por la circularidad, solidez y redondez (Fig. 5 b).

a



b

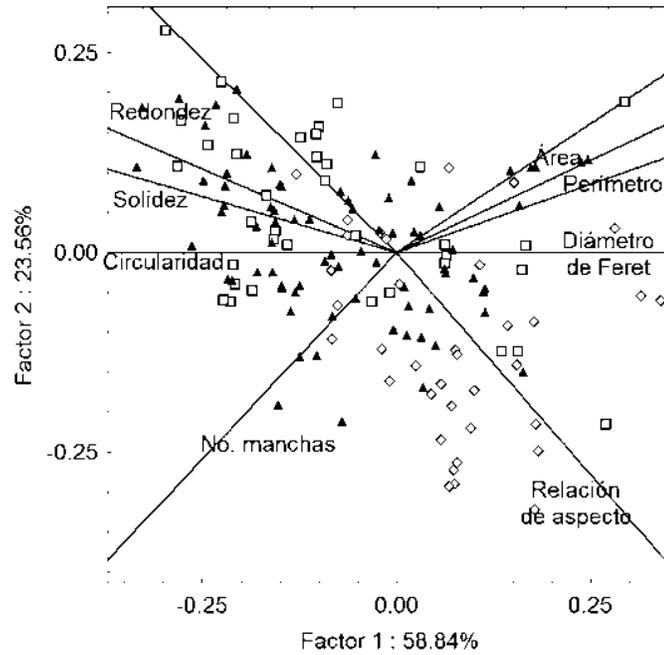


Fig. 5. a) Análisis de componentes principales de las tres poblaciones de rana toro (*Lithobates catesbeianus*). Se incluyen tanto las variables (líneas) como los individuos por población: rombos (La Purísima1); cuadros (La Purísima2); triángulos (Uruapilla). b) Acercamiento del gráfico a.

El ANOVA mostró que el CP1 difirió significativamente entre poblaciones ($F=13.99$, $df=2$, $P<0.001$) pero no entre sexos ($F=0.23$, $df=1$, $P=0.63$) la interacción población*sexos tampoco resultó significativa ($F=1.47$, $df=2$, $P=0.23$). En el CP2 se encontraron diferencias significativas tanto entre poblaciones ($F=9.39$, $df=2$, $P<0.001$), como entre sexos ($F=5.09$, $df=1$, $P<0.05$), asimismo la interacción población*sexos resultó significativa ($F=3.61$, $df=2$, $P<0.05$). Se muestran las diferencias significativas obtenidas mediante la prueba de Tukey en ambos componentes (Cuadro 2).

Cuadro 2. Prueba de Tukey para los componentes principales de las tres poblaciones y entre sexos. Componente principal 1 (CP1), Componente principal 2 (CP2) * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

		Purísima1		Purísima2		Uruapilla	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂
Purísima	♀	—	CP2**	CP1**	—	CP1**	CP1***
1	♂	CP2**	—	CP1*	CP2***	CP1*	CP1***
				CP2***		CP2***	CP2***
Purísima	♀	CP1**	CP1*	—	—	—	—
2			CP2***				
	♂	—	CP2***	—	—	—	—
Uruapilla	♀	CP1**	CP1*	—	—	—	—
			CP2***				
	♂	CP1***	CP1***	—	—	—	—
			CP2***				

En la dimensión fractal se encontraron diferencias significativas entre poblaciones ($F=11.1$, $df=2$, $P<0.001$) y entre sexos ($F=5$, $df=1$, $P<0.05$) pero no lo fue la interacción población*sexos ($F=0.1$, $df=2$, $P=0.8$). Entre poblaciones, la Purísima1 presentó una mayor dimensión fractal, seguida de Uruapilla y finalmente la Purísima2 (Fig. 6).

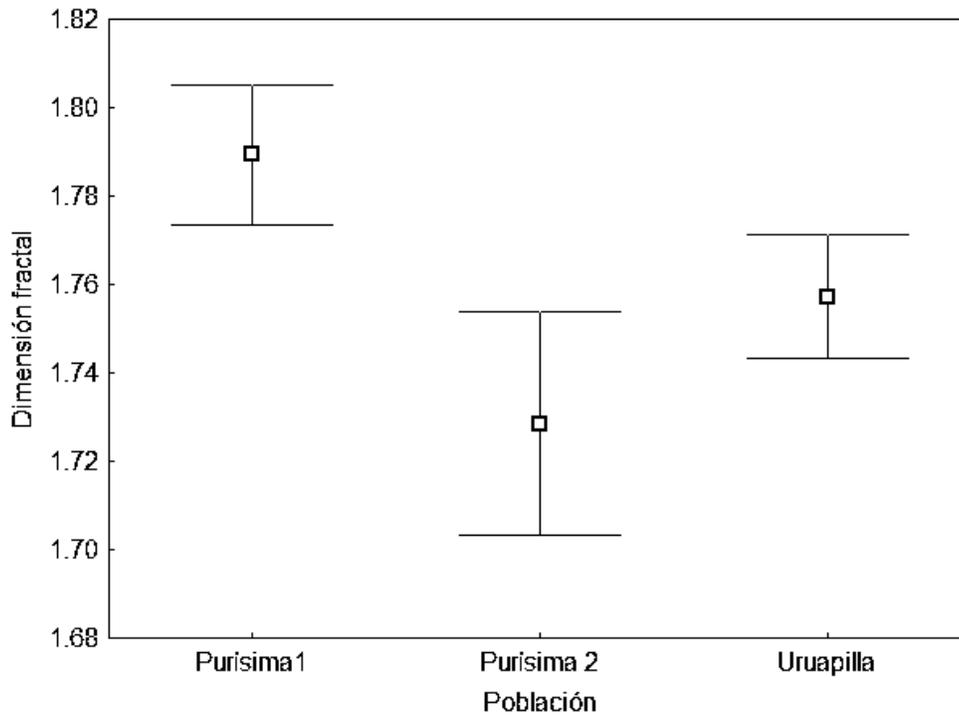


Fig. 6. Promedio de la Dimensión fractal por poblaciones. Las barras representan el intervalo de confianza.

En el área pigmentada se obtuvieron diferencias significativas tanto entre poblaciones ($F = 16.871$, $df = 2$, $P < 0.001$) como entre sexos ($F = 7.903$, $df = 1$, $P < 0.01$) pero la interacción población*sexo no fue significativa ($F=0.907$, $df=2$, $P>0.05$). Entre poblaciones, la Purísima 1 presentó una mayor área pigmentada, seguida de Uruapilla y finalmente la Purísima 2 (Fig. 7).

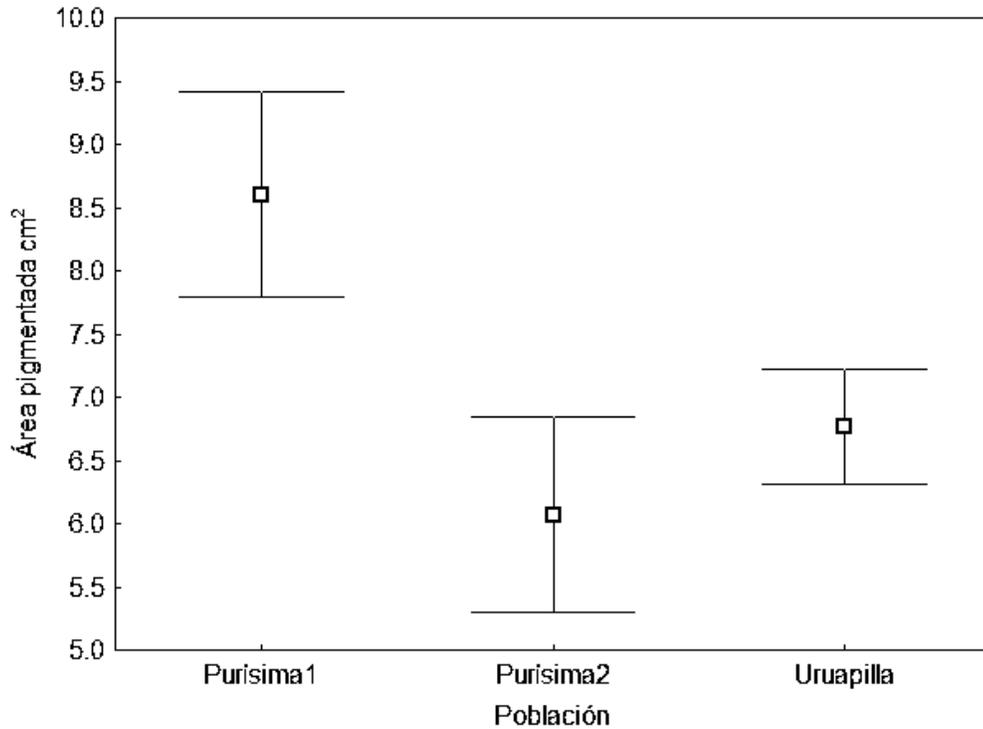


Fig. 7. Promedio del área pigmentada por poblaciones. Las barras representan el intervalo de confianza.

8.2. Pertenencia poblacional por patrón de pigmentación

La función 1 (Lambda de Wilks=0.601, $P < 0.05$) y 2 (Lambda de Wilks=0.878, $P < 0.05$) fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, de acuerdo a los autovalores, la función 1 explica el 76.9% de la varianza de los datos, por lo que esta función es la más importante para discriminar entre los grupos. Dentro de esta función, las variables que poseen un coeficiente de correlación más alto fueron la relación de aspecto, redondez, circularidad y solidez. De acuerdo al ADC se clasificaron correctamente 61.9% de los casos, los individuos de La Purísima1 fueron clasificados en ese grupo de pertenencia 57.5%, los de La Purísima2 a su grupo 30% y los de Uruapilla a su grupo 80% (Fig. 8).

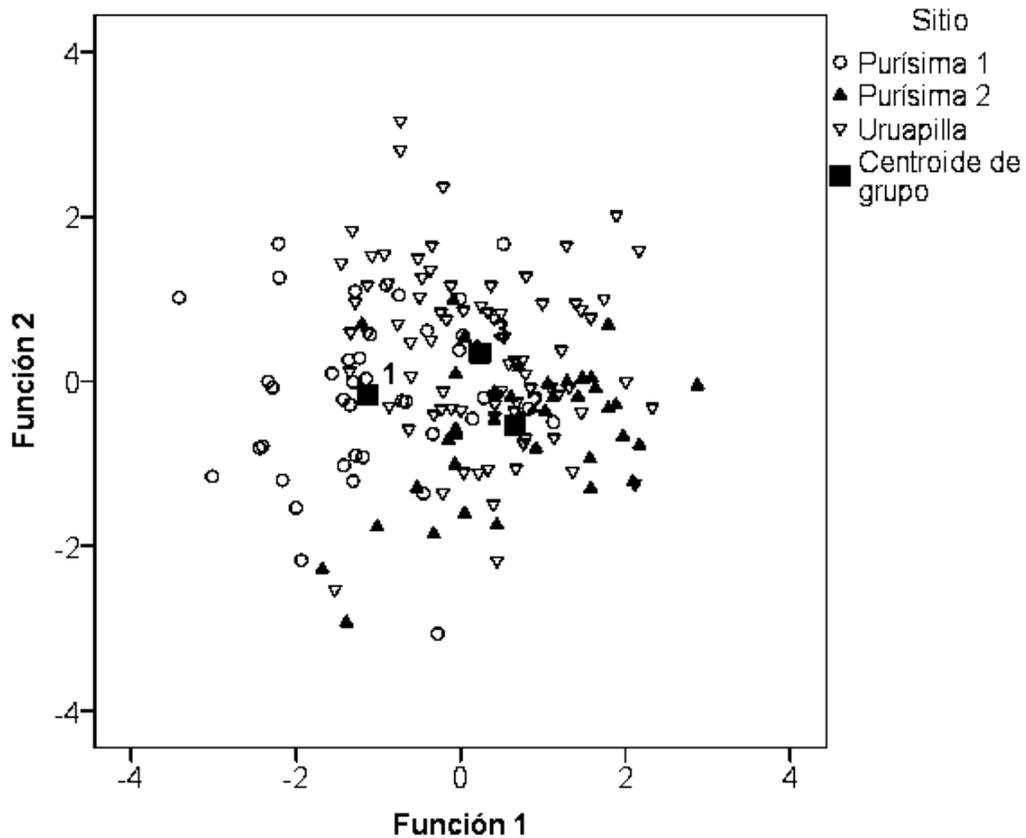


Fig. 8. Función 1 y función 2 del análisis discriminante canónico del patrón de manchas de tres poblaciones de rana toro (*Lithobates catesbeianus*).

En la población La Purísima1 se registró un promedio mayor de número manchas, mayor área, perímetro, relación de aspecto y diámetro de Feret, y menor circularidad, redondez y solidez que en las ranas de las poblaciones de Uruapilla y La Purísima2 (Cuadro 3), por lo que para la población de La Purísima 1 las manchas se distinguen por ser más alargadas; mientras que las manchas de Uruapilla y La Purísima2 tienen área y perímetro menor y son más redondeadas.

Cuadro 3. Medias del número de manchas y los descriptores de forma de las manchas de la rana toro (*Lithobates catebesbeianus*) de las poblaciones Purísima1, Purísima2 y Uruapilla. El error estándar se presenta entre paréntesis.

	Purísima1	Purísima2	Uruapilla
No. de manchas	40.95 (\pm 2.35)	33.92 (\pm 2.11)	39.35 (\pm 1.51)
Área	0.31 (\pm 0.07)	0.21 (\pm 0.02)	0.21 (\pm 0.02)
Perímetro	2.87 (\pm 0.34)	2.22 (\pm 0.19)	2.24 (\pm 0.17)
Circularidad	0.47 (\pm 0.01)	0.57 (\pm 0.01)	0.55 (\pm 0.01)
Redondez	0.55 (\pm 0.006)	0.60 (\pm 0.008)	0.60 (\pm 0.004)
Solidez	0.85 (\pm 0.007)	0.89 (\pm 0.007)	0.90 (\pm 0.007)
Relación de aspecto	2.06 (\pm 0.03)	1.82 (\pm 0.03)	1.85 (\pm 0.01)
Diámetro de Feret	0.79 (\pm 0.05)	0.67 (\pm 0.04)	0.65 (\pm 0.02)

8.3. Patrones de pigmentación por sexo

Como se indicó en los ANOVA's se encontraron diferencias significativas en la dimensión fractal y en el área pigmentada entre sexos; las hembras poseen mayor dimensión fractal (Fig. 9) y mayor área pigmentada (Fig. 10) que los machos.

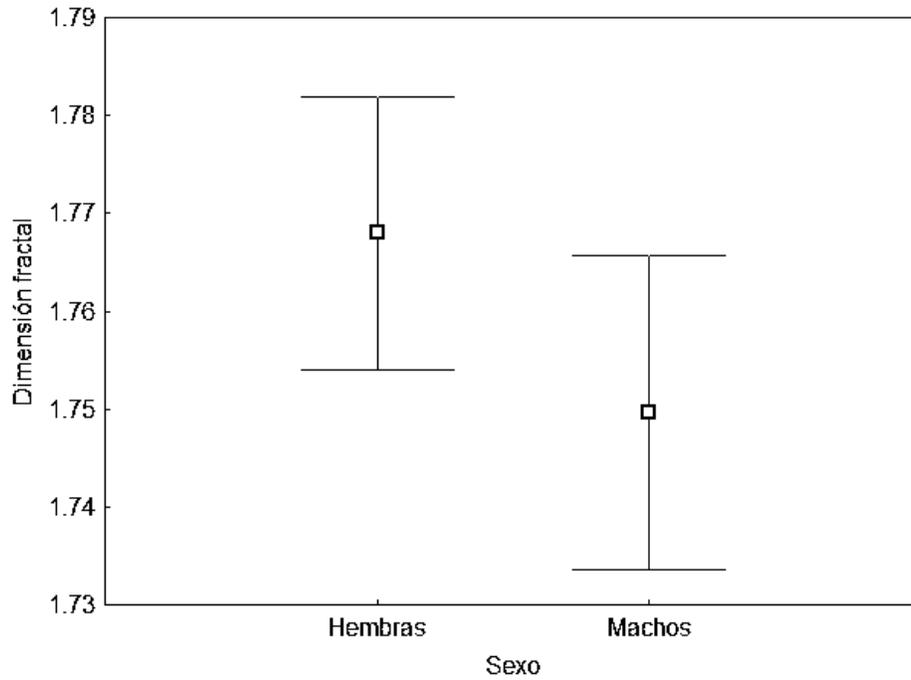


Fig. 9. Promedio de la dimensión fractal entre sexos. Las barras representan el intervalo de confianza.

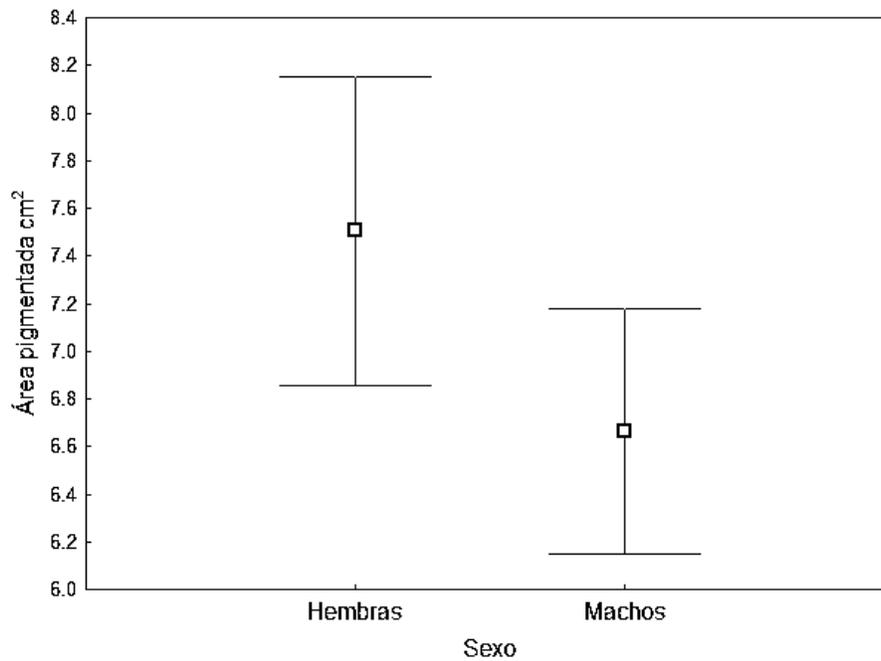


Fig. 10. Promedio del área pigmentada entre sexos. Las barras representan el intervalo de confianza.

Para el análisis discriminante se obtuvo una función (Lambda de Wilks=0.867, $P < 0.05$) la cual fue estadísticamente significativa y explica el 100% de la varianza de los datos. Dentro de esta función, las variables que poseen un coeficiente de correlación más alto fueron área, relación de aspecto y diámetro de Feret. De acuerdo al ADC se clasificaron correctamente 67.4% de los casos, las hembras fueron clasificadas en ese grupo de pertenencia 58.7% y los machos en su propio grupo el 74.7%.

Las hembras presentaron menor número de manchas que los machos, pero con un área y perímetro mayor, y aunque ambos sexos presentaron valores similares en cuanto a la circularidad, redondez y solidez (Cuadro 4), las hembras poseen manchas ligeramente menos alargadas que los machos.

Cuadro 4. Medias de los descriptores de forma de las manchas de la rana toro (*Lithobates catesbeianus*) por sexo. El error estándar se presenta entre paréntesis.

	♀	♂
No. de manchas	37.34 (± 1.70)	38.24 (± 1.50)
Área	0.27 (± 0.04)	0.19 (± 0.01)
Perímetro	2.50 (± 0.23)	2.19 (± 0.12)
Circularidad	0.54 (± 0.01)	0.54 (± 0.01)
Redondez	0.59 (± 0.005)	0.58 (± 0.006)
Solidez	0.89 (± 0.004)	0.88 (± 0.005)
Relación de aspecto	1.86 (± 0.02)	1.91 (± 0.02)
Diámetro de Feret	0.72 (± 0.03)	0.66 (± 0.02)

9. DISCUSIÓN

9.1. Patrones de pigmentación

De acuerdo a nuestros resultados, el patrón de pigmentación en *L. catesbeianus* es variable entre individuos y poblaciones. Las poblaciones de la Purísima2 y Uruapilla presentan características similares y difieren con la población La Purísima1, en esta última se presentó un mayor promedio de número de manchas, área por mancha, perímetro, relación de aspecto, diámetro de Feret, y menor circularidad, redondez y solidez, sin embargo, las tres poblaciones difieren en la dimensión fractal y el área total pigmentada. La amplia variabilidad encontrada en el patrón de pigmentación de la rana toro puede estar respondiendo a las condiciones ambientales (Hoekstra, 2006), ya que la población producida en La Purísima, es decir, Purísima1 que ha estado bajo el efecto de las condiciones ambientales del sitio por mayor tiempo, se diferencia de la población proveniente de Mazatlán (Purísima2) y de la de Uruapilla. Este efecto de las condiciones ambientales sobre la pigmentación de los individuos se ha reportado en especies como la rana *Rana temporaria*, en la que se registró que poblaciones en distintos ambientes puede llevar a un mayor o menor grado de melanismo en respuesta al ambiente y a la plasticidad ontogénica (Alho *et al.*, 2010). Asimismo, en el sapo *Melanophryniscus rubriventris* también se han observado diferencias en los patrones de pigmentación y coloración entre sus poblaciones a escala geográfica debido a factores ambientales y ecológicos tales como presiones de selección múltiple como la negociación entre la señalización, ocultamiento ante potenciales depredadores y las funciones de termorregulación (Sanabria *et al.*, 2014).

La importancia del grado de melanismo en los patrones de pigmentación en anfibios está en la influencia que tiene en su capacidad para regular la temperatura, ya que éstos organismos se basan en la energía radiante externa para la regulación de la temperatura corporal (Vences *et al.*, 2002). La temperatura corporal puede influir en el presupuesto de energía que los individuos invierten en la locomoción, y la locomoción puede influir en la capacidad de escapar ante depredadores, conseguir alimento o competir con sus congéneres para acceder a compañeros con fines reproductivos (Peterson *et al.*, 1993). Por lo tanto, la pigmentación puede funcionar como modulador de las funciones fisiológicas y de comportamiento en los anfibios, que influye en la actividad diaria y estacional, el rendimiento del aparato locomotor, la tasa de digestión, y la tasa de crecimiento (Lillywhite *et al.*, 1973; Marvin, 2003; Haramura, 2007). Debido a esto

es innegable la importancia que tiene la coloración en la temperatura del cuerpo y en última instancia, tienen implicaciones importantes para la aptitud evolutiva del animal (Clusella *et al.*, 2007).

Asimismo, Forsman y Hagman (2009) indican que ranas con patrones de pigmentación variables presentan mayores rangos de distribución, usan una mayor gama de hábitats, son menos propensas a una tendencia poblacional negativa, y son menos vulnerables a la extinción en comparación con especies no variables. Todo esto podría permitir una capacidad superior para responder a los nuevos regímenes de selección (Ferriere *et al.*, 2004; Forsman *et al.*, 2008), incrementando con ello su adecuación y por lo tanto su supervivencia como especie. Nuestros resultados de amplia variabilidad en la pigmentación de la rana toro y el éxito con que esta especie ha colonizado diversos hábitats (Ficetola *et al.*, 2007a; Ficetola *et al.*, 2007b), apoyan los hallazgos de Forsman y Hagman (2009).

9.2. Dimorfismo sexual

Los resultados de los ANOVA's de los componentes principales, dimensión fractal y área total pigmentada, así como el análisis canónico discriminante entre machos y hembras, muestran que los patrones de pigmentación dorsal en *L. catesbeianus* son sexualmente dimórficos. En nuestro estudio encontramos diferencias entre machos y hembras en cuanto al área pigmentada, características de las manchas y complejidad del patrón, siendo en las hembras donde se encuentran los valores más altos de área pigmentada y complejidad, por lo que probablemente esta característica no sea empleada por las hembras en la elección de pareja. Sin embargo, se sabe que en esta rana durante la temporada de reproducción los machos presentan coloración amarilla en la zona gular (Adriaens *et al.*, 2013), y que probablemente las hembras la utilizan como una señal del tamaño y éxito del organismo (Schulte y Schank, 2009).

Si bien, tampoco se tiene evidencia sobre la elección de las hembras por machos usando el área pigmentada o su complejidad como señal de su condición, existen estudios que muestran que mayor área pigmentada (por melanina) podría estar jugando un papel en la termorregulación que es crucial en estos organismos ectotérmicos (Clusella *et al.*, 2007; Güizado *et al.*, 2010; Pokhrel *et al.*, 2013; Balogová y Uhrin, 2015). La termorregulación proporciona a animales ectotérmicos la posibilidad de utilizar diversos hábitats en términos de sus condiciones térmicas y controlar activamente los procesos fisiológicos sensitivos a la temperatura (Güizado *et al.*,

2010). Para las hembras de la especie *L. catesbeianus* mayor proporción de color negro en el dorso podría permitir una mejor absorción de la radiación solar, contrarrestando los efectos negativos del tamaño, ya que el mayor tamaño de las hembras en comparación con los machos ($\bar{X} \text{ ♂}=105.3$; $\bar{X} \text{ ♀}=113.2$; Shirose *et al.*, 1993) puede influir negativamente en la adquisición de temperatura como se ha observado en *Salamandra salamandra* (Balogová y Uhrin, 2015), afectando sus procesos fisiológicos. Balogová y Uhrin (2015) y Pokhrel *et al.* (2013) también registraron mayor pigmentación melanística en hembras de salamandra *Salamandra salamandra* y en hembras de ajolote *Ambystoma opacum*, y lo relacionaron con el aumento de la velocidad de calentamiento, lo cual desempeña un papel vital en el desarrollo de las crías en el interior de las hembras y de su nacimiento, durante el cual la hembra gasta mucha energía (Balogová y Uhrin, 2015).

El rol que juega la temperatura en la reproducción en organismos ectotérmicos como *L. catesbeianus* es esencial. Diversos trabajos han registrado que una mayor temperatura ayuda al incremento de la talla y mejora la condición corporal de los individuos (Reading y Clarke, 1995), lo cual puede dar como resultado el incremento en el tamaño de la puesta y el tamaño de los huevos (Angilleta *et al.*, 2001), beneficiando con ello su adecuación y, consecuentemente, la supervivencia de la especie.

Por otro lado, el dicromatismo también puede tener su origen en la repartición del nicho, en el que los machos y hembras usan diferentes recursos o experimentan diferentes presiones de depredación (Feluccia y Slaughter, 1973; Partridge y Green, 1985; Shine, 1989). Por ejemplo, en la rana *Rana septentrionalis* se reportó que las hembras desarrollan un patrón de pigmentación reticulado que está ausente en machos, confiriéndoles mayor crípsis que es esencial para la supervivencia, estas diferencias en el patrón podrían estar influyendo en la preferencia del hábitat entre machos y hembras (Kramek y Stewart, 1980). El mayor tamaño de las hembras *L. catesbeianus* con respecto a los machos, el cual podría ser resultado de las diferencias en la pigmentación, puede conducir a un consumo de presas diferenciado entre hembras y machos como se ha observado en algunas especies de lagartijas (Schoener y Gorman, 1968) y en sapos como el *Bufo bufo* (Crnobrnja-Isailovic *et al.*, 2012). Esta posible diferenciación en la dieta de la rana toro permitiría disminuir la competencia intraespecífica

como también se ha reportado en la rana *Phyllodytes luteolus* (Ferreira *et al.*, 2012), beneficiando así las condiciones individuales, poblacionales y a nivel de especie.

Así, las diferencias en la pigmentación entre hembras y machos de rana toro, podría estar jugando un papel de suma importancia en la biología de sus individuos, en la ecología de sus poblaciones y en el éxito de la especie. La carencia de información sobre la rana *L. catesbeianus*, así como la poca información que existe sobre los patrones de pigmentación en anuros, hace del presente trabajo una aportación relevante y sugiere que se requiere mayor investigación que permita abundar en el tema con fines de manejo y conservación.

10. CONCLUSIONES

- Los descriptores de forma: relación de aspecto, redondez, circularidad, solidez, dimensión fractal y área total pigmentada, son buenos estimadores para el estudio de los patrones de pigmentación en anfibios.
- La rana toro presenta patrones de pigmentación dorsal complejos y heterogéneos, los cuales son variables entre individuos, además de diferir entre poblaciones, sugiriendo alto grado de plasticidad fenotípica.
- Los patrones de pigmentación en rana toro son sexualmente dimórficos: las hembras presentan una mayor área pigmentada, así como mayor grado de complejidad en comparación con los machos.
- La variabilidad de los patrones de pigmentación en rana toro, que reflejan plasticidad fenotípica, puede aportarles ventajas adaptativas con efectos positivos en su supervivencia, reproducción, adecuación y en la colonización de nuevos ambientes.
- Son necesarios estudios que exploren los factores intrínsecos y ecológicos responsables de la formación de los patrones de pigmentación, así como evaluar el rol de la pigmentación en la biología de la especie tales como la termorregulación, metabolismo, reproducción, etc.

11. LITERATURA CITADA

- Adriaens, T., Devisscher, S. y Louette, G. 2013. Risk analysis of American bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Shaw). Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
- Albertini, G. y Lanza, B. 1987. *Rana catesbeiana* Shaw 1802 in Italy. *Alytes* 6 (3-4): 117 – 129.
- Alho, J., Herczeg, G., Soderman, F., Laurila, A., Jonsson, K. y Merila, J. 2010. Increasing melanism along a latitudinal gradient in a widespread amphibian: local adaptation, ontogenic or environmental plasticity? *BMC Evolutionary Biology* 10:371.
- Álvarez-Romero, J., Medellín, R., Oliveras de Ita, A., Gómez de Silva, H. y Sánchez, O. 2008. *Rana catesbeiana*. Animales exóticos en México: una amenaza para la biodiversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad; Instituto de Ecología, UNAM; y Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México, D.F., 518 pp.
- AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. [web application]. 2016. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Available: <http://amphibiaweb.org/>. (Accessed: March 16, 2016).
- Anon. 2011. BG non-native species risk assessment - North American bullfrog *Rana catesbeiana*. www.nonnativespecies.org.
- Arantes, I., Vasconcellos, M., Boas, T., Veludo, L. y Colli, G. 2015. Sexual dimorphism, growth, and longevity of two toad species (Anura, Bufonidae) in a neotropical savanna. *Copeia* 103(2):329-342.
- Bagnara, J.T. 1983. Developmental aspects of vertebrate chromatophores. *Am. Zool.* 23:465-478.
- Bagnara, J.T., Taylor, J. y Hadley, M. 1968. The dermal chromatophore unit. *J. Cell Biol.* 38:67-79.
- Bagnara, J.T., Fernandez, P.J. 1993. Hormonal influences on the development of amphibian pigmentation patterns. *Zool. Sci.* 10:733–748.
- Bagnara, J.T., Matsumoto, J., Ferris, W., Frost, S.K., Turner, W.A., Tchen, T.T., Taylor, J.D., 1979. Common origins of pigment cells. *Science* 203, 410–415.

- Balogová, M. y Uhrin, M. 2015. Sex-biased dorsal spotted patterns in the fire salamander. *Salamandra* 51(1) 12–18.
- Beebe, W. 1907. Geographic variation in birds, with especial reference to the effects of humidity. *Zoological* 3-41.
- Bell, R. y Zamudio, K. 2012. Sexual dichromatism in frogs: natural selection, sexual selection and unexpected diversity. *Proc. R. Soc. B* 279, 4687–4693.
- Beringer, J. y Johnson, T. 1995. Bullfrog diet: *Herpetological Review* 26 (2): 98.
- Biancardi, C. y Di Cerbo, A. 2010. Quantitative pattern analysis methodology in amphibians. In: VIII Congresso Nazionale Societas Herpetologica Italica, 383-390.
- Boelter, R., Cechin, S. 2007. Reproductive biology of the invasive bullfrog *Lithobates catesbeianus* in southern Brazil. *Ann Zool Fennici* 44, 435-444.
- Bury, B. y Whelan, J. 1984. Ecology and management of the bullfrog. *Resour. Publ.* 155, U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, DC. 23 pp.
- Caballero, L., Benítez, M., Álvarez, E., Hernández, S., Arzola, A. y Cocho, G. 2012. An epigenetic model for pigment patterning based on mechanical and celular interactions. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 318:209–223.
- Chang, C. 1957. Hypothalectomy in *Rana pipiens* neurulae. *Anat Rec* 128:531-532.
- Candolin, U. 1999. The relationship between signal quality and physical condition: is sexual signalling honest in the three-spined stickleback? *Animal Behaviour* Volume 58, Issue 6, 1261–1267.
- Carothers, J. 1984. Sexual selection and sexual dimorphism in some herbivorous lizards. *The American Naturalist* 124 (2) 244-254.
- Cecil, S. y Just, J. 1979. Survival rate, population density and development of a naturally occurring anuran larvae (*Rana catesbeiana*). *Copeia* (3): 447-453.
- Ceballos, G., Ehrlich, P., Barnosky, A., García, A., Pringle, R. y Palmer, T. 2015. Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Science Advances* 1(5) e1400253.
- Clusella, S., Van Wyk, J. y Spotila, J. 2007. Thermal melanism in ectotherms. *J Therm Biol*, 32:235-245.

- Corse, W. y Metter, E. 1980. Economics, adult feeding and larval growth of *Rana catesbeiana* on a fish hatchery. *Journal of Herpetology* 14(3): 231-238.
- Duellman, W. E. y Trueb, L. 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill, New York, U.S.-A. 670 pp.
- Crnobrnja-Isailović, J., Ćurčić, S., Stojadinović, D., Tomašević-Kolarov, N., Aleksić, I., & Tomanović, Ž. (2012). Diet composition and food preferences in adult common Toads (*Bufo bufo*) (Amphibia: Anura: Bufonidae). *Journal of Herpetology*, 46(4), 562–567.
- Duellman, W. E. y Trueb, L. 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill, New York, U.S.-A. 670 pp.
- Endler, J. 2012. A framework for analysing colour pattern geometry: adjacent colours. *Biological Journal of the Linnean Society* 107, 233–253.
- Epperlein, H. y Lofberg, J. 1990. The development of the larval pigment patterns in *Triturus alpestris* and *Ambystoma mexicanum*. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 118:1-101.
- Feduccia, A. y Slaughter, B. 1973. Sexual dimorphism in skates (Rajidae) and its possible role in differential niche utilization. *Evolution* 28, 164–168.
- Fernandez, P., Bagnara, J. 1991. Effect of background color and temperature on skin color and circulating MSH in two species of leopard frog. *Gen Comp Endocrinol* 83: 132-141.
- Ferreira, R. B., Schineider, J. a. P. y Teixeira, R. L. 2012. Diet, fecundity, and use of bromeliads by *Phyllodytes luteolus* (Anura: Hylidae) in Southeastern Brazil. *Journal of Herpetology*, 46(1), 19–24.
- Ferriere, R., Dieckmann, U. y Couvet, D. editors. 2004. *Evolutionary conservation biology*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Ficetola G., Coic, C., Detaint, M., Berroneau, M., Lorvelec, O. y Miaud, C. 2007a. Pattern of distribution of the American bullfrog *Rana catesbeiana* in Europe. *Biological Invasions* 9(7): 767-772.
- Ficetola, G., Thuiller, W. y Miaud, C. 2007b. Prediction and validation of the potential global distribution of a problematic alien invasive species - the American bullfrog. *Diversity and Distributions* 13(4): 476-485.
- Ficetola, G., Bonin, A. y Miaud, C. 2008. Population genetics reveals origin and number of founders in a biological invasion. *Molecular Ecology* 17: 773–782.

- Forsman, A. y Aberg, V. 2008. Associations of variable coloration with niche breadth and conservation status among Australian reptiles. *Ecology* 89:1201–1207.
- Forsman, A. y Hagman, M. 2009. Association of coloration mode with population declines and endangerment in Australian frogs. *Conservation Biology* 23 (6) 1535–1543.
- Frost, D. R. 2013. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.6. Electronic Database accessible at American Museum of Natural History, New York, USA.
- Fukuzawa, T. y Bagnara, J.T. 1989. Control of melanoblast differentiation in amphibia by alpha-melanocyte stimulating hormone, a serum melanization factor, and a melanization inhibiting factor. *Pigment Cell Res* 2 (3) 171-81.
- Fukusawa, T. y Ide, H. 1986. Further studies on the melanophores of periodic albino mutant of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol* 91 65-78.
- Fukuzawa, T., Samaraweera, P., Mangano, F.T., Law, J.H. y Bagnara, J.T. 1995. Evidence that MIF plays a role in the development of pigmentation patterns in the frog. *Dev Biol* 167:148–158.
- Gierer, A. y Meinhardt, H. 1972. A theory of biological pattern formation. *Kybernetik* 12 (1) 30-39.
- Glaw, F. y Vences, M. 1994 A field guide to the amphibians and reptiles of Madagascar. Leverkusen & Koln, Germany: Moos Druck/FARBO.
- Govindarajulu, P., Price, W. y Anholt, B. 2006. Introduced bullfrogs (*Rana catesbeiana*) in Western Canada: has their ecology diverged? *Journal of Herpetology* 40, 249- 260.
- Griffith, S., Parker, T. y Olson, A. 2006. Melanin- versus carotenoid-based sexual signals: is the difference really so black and red? *Animal Behaviour* 71 (4) 749–763.
- Güizado, M., García, U. y Aguilar, J. 2010. Thermoregulation of *Craugastor berkenbuschii* (Peters, 1870). *Herpetological Bulletin*, 112:4–6.
- Hairston, N. 1979. The adaptive significance of color polymorphism in two species of *Diaptomus* Copepoda. *Limnology and Oceanography* 24:15–37.
- Halliday, T. y Verrell, P. 1986. Sexual selection and body size in amphibians. *Herpetological Journal* 1:86–92.

- Hansson, L. 2000. Induced pigmentation in zooplankton: a trade-off between threats from predation and ultraviolet radiation. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 267:2327–2331.
- Haramura, T. 2007. Microhabitat selection by tadpoles of *Buergeria japonica* inhabiting the coastal area. *J. Ethol* 25, 3–7.
- Howard, R. 1988. Reproductive success in two species of anurans. In Clutton-Brock, T. H., editor. *Reproductive Success: Studies of Individual Variation in Contrasting Breeding Systems* 99–113. University of Chicago Press. Chicago.
- Howard, R., Whiteman, H. Schueller, T. 1994. Sexual selection in American toads: a test of a good-genes hypothesis. *Evolution* 48:1286–1300.
- Howard R. 1978. The evolution of mating strategies in bullfrogs, *Rana catesbeiana*. *Evolution* 32(4): 850-871.
- Hoekstra, H. 2006. Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. *Heredity* 97, 222–234.
- IUCN SSC. Amphibian Specialist Group. 2015. *Lithobates catesbeianus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T58565A53969770. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20154.RLTS.T58565A53969770>. en. Downloaded on 16 March 2016.
- Ingber, D. 2004. The mechanochemical basis of cell and tissue regulation. *Mech Chem Biosyst* 1:53–68.
- Jawor, J. y Breitwisch, R. 2003. Melanin ornaments, honesty, and sexual selection. *The Auk* 120(2):249-265.
- Joron, M., Wynne, I., Lamas, G. y Mallet, J. 1999. Variable selection and the coexistence of multiple mimetic forms of the butterfly *Heliconius numata*. *Evolutionary Ecology* 13 (7) 721-754.
- Kelsh, R., Harris, M., Colanesi, S. y Erickson, C. 2009. Stripes and belly-spots -A review of pigment cell morphogenesis in vertebrates. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20 (1) 90–104.
- Keyser, A. y Hill, G. 1999. Condition-dependent variation in the blue-ultraviolet coloration of a structurally based plumage ornament. *Proc. R. Soc. Lond. B* 1999 266 771-777.

- Kondo, S. 2002. The reaction-diffusion system: a mechanism for autonomous pattern formation in the animal skin. *Genes to Cells* 7, 535–541.
- Kondo, S. y Shirota, H. 2009. Theoretical analysis of mechanisms that generate the pigmentation pattern of animals. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20 (1) 82–89.
- Kumasaka, M., Sato, S., Yajima, I., Yamamoto, H. 2003. Isolation and developmental expression of Tyrosinase family genes in *Xenopus laevis*. *Pigment Cell Res* 16: 455–462.
- Kumasaka, M., Sato, H., Sato, S., Yajima, I., Yamamoto, H. 2004. Isolation and developmental expression of Mitf in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn.* 230 (1): 107-13.
- Kupfer, A. 2007. Sexual size dimorphism in amphibians: an overview, p. 50–59. In: Sex, Size and gender roles: evolutionary studies of sexual size dimorphism. D. J. Fairbairn, W. U. Blanckenhorn, and T. Szekely (eds.). Oxford University Press, Oxford.
- Kramek, W. y Stewart, M. 1980. Ontogenetic and sexual differences in the pattern of *Rana septentrionalis*. *Journal of Herpetology* 14 (4) 369-375.
- Lawson, R. y King, R. 1996. Gene flow and melanism in Lake Erie garter snake populations. *Biological Journal of the Linnean Society* 59 (1) 1–19.
- Le Douarin, N. 1999. The neural crest. Cambridge: Cambridge University Press.
- Le Douarin, N y Dupin, E. 2003. Multipotentiality of the neural crest. *Current Opinion in Genetics & Development* 13:529–536.
- Le Douarin, N., Creuzet, S., Couly, G. y Dupin, E. 2004. Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* 131, 4637-4650.
- Lillywhite, B., Licht, P. y Chelgren, P. 1973. The role of behavioral thermoregulation in the growth energetics of the toad, *Bufo boreas*. *Ecology* 54, 375–383.
- Luecke, C. y O'Brien, W. 1981. Phototoxicity and fish predation: selective factors in color morphs in *Heteroscope*. *Limnology and Oceanography* 26:454–460.
- Mangano, F., Fukuzawa T., Johnson, W. y Bagnara, J. 1992. Intrinsic pigment cell stimulating activity in the skin of the leopard frog, *Rana pipiens*. *J Exp Zool* 263:112-118.
- Martínez, L. y Padilla, P. 2011. La morfogénesis como resultado de la transmisión e integración de información biológica. *Revista Mexicana de Física* 57: 499–509.

- Marvin, G. 2003. Aquatic and terrestrial locomotor performance in a semiaquatic plethodontid salamander (*Pseudotriton ruber*): influence of aquatic temperature, thermal acclimatation and body size. *Copeia* 704–713.
- Medina Barcenas, E. 2013. Environmental determinants and controls of skin color change in neotropical anurans (Order No. U617208). Available from ProQuest Dissertations & Theses Global.
- Mendizabal, I., Keller, E., Zeng, J. y Soojin, V. 2014. Epigenetics and evolution. *Integrative and Comparative Biology* 54 (1) 31–42.
- Merilaita, S. 2001. Habitat heterogeneity, predation and gene flow: colour polymorphism in the isopod, *Idotea baltica*. *Evolutionary Ecology* 15 (2) 103-116.
- Morgan, M., Pugh, M., Gangloff, M. y Siefferman, L. 2014. The spots of the spotted salamander are sexually dimorphic. *Copeia*: 2014 (2) 251-256.
- Nilsson, H., Aspögren, S., Wallin, M. 2012. Rapid color change in fish and amphibians - function, regulation, and emerging applications. *Pigment Cell Melanoma Res* 26; 29-38.
- Ohsugi, K. y Ide, H. 1983. Melanophore differentiation in *Xenopus laevis*, with special reference to dorsoventral pigment pattern formation. *Embryol. exp. Morph.* 75, 141-150.
- Painter, K., Maini, P., Othmer, H. 2000. Development and applications of a model for cellular response to multiple chemotactic cues. *J. Math. Biol.* 41, 285–314.
- Parra-Olea, G., Flores-Villela, O y Mendoza-Almeralla, C. 2014. Biodiversidad de anfibios en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* , Suplo. 85:S460-S466.
- Partridge, L. y Green, P. 1985. Intraspecific feeding specializations and population dynamics. In *Behavioral ecology: ecological consequences of adaptive behavior* (eds Sibly, R. y Smith, R.), pp. 207–226. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- Pérez, L., Jovani, R., Mougeot, F. 2013. Fractal geometry of a complex plumage trait reveals bird's quality. *Proc. R. Soc. B*, 280: 20122783.
- Peterson, C., Gibson, A. y Dorcas, M. 1993. Snake thermal ecology: the causes and consequences of body-temperature variation. In *Seigel, R., Collins, J. y Novak, S (eds.) Snakes –ecology and evolutionary biology: 241-314. Macmillan Publishing Co. New York.*

- Pla, L. 1986. Análisis multivariado: método de componentes principales. Instituto Interamericano de Estadística. Sec. General de la OEA Washington, D.C.89 p.
- Pokhrel, L., Karsai, I., Hamed, M. y Laughlin, T. 2013. Dorsal body pigmentation and sexual dimorphism in the marbled salamander (*Ambystoma opacum*). *Ethology, Ecology & Evolution*, 25: 214–226.
- Protas, M. y Patel, N. 2008. Evolution of coloration patterns. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24:425-46.
- Reading, C. y Clarke, R. 1995. The effects of density, rainfall and environmental temperatura on body condition and fecundity in the common toad, *Bufo bufo*. *Oecologia* 102, 453–459.
- Rudh, A. y Qvarnström, A. 2013. Adaptive colouration in amphibians. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24, 553– 561.
- Ryan, M. J. 1980. The reproductive behavior of the Bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Copeia* 1980:108–114.
- Sanabria, E., Vaira, M., Quiroga, L., Akmentins, M. y Pereyra, L. 2014. Variation of thermal parameters in two different color morphs of a diurnal poison toad, *Melanophryniscus rubriventris* (Anura: Bufonidae). *Journal of Thermal Biology* 41, 1–5.
- Schoener, T. W., y Gorman, G. C. 1968. Some niche differences in three lesser antillean lizards of the genus *Anolis*. *Ecological Society of America*, 49(5), 819–830.
- Schötz, E., Burdine, R., Jülicher, F., Steinberg, M., Heisenberg y C., Foty, R. 2008. Quantitative differences in tissue surface tensión influence zebrafish germ layer positioning. *HFSP J* 2:42–45.
- Schulte, A. y Schank, C. 2009. Secondary sexual traits and individual phenotype in male green frogs (*Rana clamitans*). *Journal of Herpetology* 43(1):89-95.
- Sheldon, B., Arponen, H., Laurila, A. Crochet, P. y Merilä, J. 2003. Sire coloration influences offspring survival under predation risk in the moorfrog. *Journal of Evolutionary Biology* 16:1288–1295.
- Shine, R. 1989. Ecological causes for the evolution of sexual dimorphism: a review of the evidence. *Q. Rev. Biol.* 64, 419–461.

- Shirose, L. y Brooks, R. 1995. Growth rate and age at maturity in syntopic populations on *Rana clamitans* and *Rana septentrionalis* in central Ontario. *Canadian Journal of Zoology* 73:1468–1473.
- Shirose, L., Brooks, R., Barta, J. y Desser, S. 1993. Intersexual differences in growth, mortality, and size at maturity in bullfrogs in central Ontario. *Canadian Journal of Zoology* 71, 2363-2369.
- Stewart, M. 1967 *Amphibians of Malawi*. Albany, NY: State University of New York Press.
- Suazo, I., Alvarado, J., Raya, E. y Martinez, M. 2007. Diet of the mexican marbled toad (*Bufo marmoratus*) in conserved and disturbed tropical dry forest. *The Southwestern Naturalist* 52(2):305-309.
- Taylor, C., Gilbert, F. y Reader, T. 2013. Distance transform: a tool for the study of animal color patterns. *Methods in Ecology and Evolution*.
- Tucker, R. y Erickson, C. 1986. Pigment cell pattern formation in *Taricha torosa*: the role of the extracellular matrix in controlling pigment cell migration and differentiation. *Dev Biol* 118:268–285.
- Turing, A. M. 1952. The chemical basis of morphogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* B237:37-72.
- Turner, W., Chen, S., Wahn, H., Lightbody, L., Bagnara, J., Chen, T. 1977. Trophic effects on MSH melanophores. *Front Hormone Res* 4:105-116.
- Vences, M., Galán, P., Vieites, D., Puente, M., Oetter, K. y Wanke, S. 2002. Reticulate melanism in western painted turtles (*Chrysemys picta bellii*): exploring linkages with habitat and heating rates. *Annales Zoologici Fennici*, 39: 209–220.
- West-Eberhard, M. 1989. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annu Rev. Ecol. Syst.* 20:249-78.
- Willis, Y., Moyle, D. y Baskett, T. 1956. Emergence, breeding, hibernation, movements and transformation of the Bullfrog, *Rana catesbeiana*, in Missouri. *Copeia* 156(1): 30-41.
- Zink, R. y Remsen, J. 1986. Evolutionary processes and patterns of geographic variation in birds. *Current Ornithology*, Vol. 4 (ed. R.F. Johnston), pp. 1–69. Plenum Press, New York.

