



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y  
CONSERVACIÓN**

**PROYECTO TERMINAL**

**Contrastes morfológicos, ambientales y de  
vocalización de la rana *Rheohyla miotympanum* en dos  
poblaciones del centro de México, diferentes en  
prevalencia e intensidad de infección por  
*Batrachochytrium dendrobatidis***

Para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biodiversidad y  
Conservación

PRESENTA

Lic. Lizzeth Abigail Torres Hernández

Director

Dr. Aurelio Ramírez Bautista

Codirectora

Dra. Cinthya Mendoza Almeralla

Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, febrero de 2025

**Contrastes morfológicos, ambientales y de vocalización de la rana  
*Rheohyla miotympanum* en dos poblaciones del centro de México,  
diferentes en prevalencia e intensidad de infección por  
*Batrachochytrium dendrobatidis***

**COMITÉ TUTORAL**

Dr. Aurelio Ramírez Bautista (director)

Dra. Cinthya Mendoza Almeralla (codirectora)

M. en C. Héctor Rafael Eliosa León (asesor externo)

Dr. Pablo Octavio Aguilar (asesor interno)



# Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

School of Engineering and Basic Sciences

Área Académica de Biología

Department of Biology

Mineral de la Reforma, Hgo., a 07 de febrero de 2025

Número de control: ICBI-AAB/149/2025

Asunto: Autorización de impresión.

**MTRA. OJUKY DEL ROCIO ISLAS MALDONADO**  
**DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH**

El Comité Tutorial del nombre del producto que indique el documento curricular del programa educativo de posgrado titulado **"Contrastes morfológicos, ambientales y de vocalización de la rana Rheohyla miotympanum en dos poblaciones del centro de México, diferentes en prevalencia e intensidad de infección por Batrachochytrium dendrobatidis"**, realizado por la sustentante **Lizzeth Abigail Torres Hernández** con número de cuenta **276485** perteneciente al programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

## AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que el sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente  
"Amor, Orden y Progreso"

El Comité Tutorial

  
Dr. Aurelio Ramírez Bautista  
Vocal



  
Dr. Pablo Octavio Aguilar  
Presidente

  
M. en C. Héctor Rafael Eliosa León  
Secretario

  
Dra. Cinthya Mendoza Almeralla  
Suplente

LFRP/CIAF

Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184  
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 40063, 40064 y 40065  
aab\_icbi@uaeh.edu.mx, maritzal@uaeh.edu.mx



*Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas*

**Marie Curie**

*Nada en este mundo debe ser temido, solo entendido. Ahora es el momento de entender más, para poder temer menos*

**Marie Curie**

# **DEDICATORIA**

## **A MI MADRE**

La persona que más amo, que en cada tropiezo y logro de mi vida siempre ha estado a mi lado, compartiendo sus experiencias y motivándome cada día a ser mejor persona.

Que desde mi infancia ha respetado y comprendido mi amor por la naturaleza, mi forma de pensar y ser, siempre demostrándome su amor incondicional.

## **A MIS HERMANAS**

Dos mujeres fuertes, que me han apoyado a lo largo de mi vida en todos los ámbitos, incluyendo el personal y profesional.

## **A MIS SOBRINOS**

Tres pequeños con grandes mentes, formuladores de las preguntas más curiosas e interesantes. Las personitas que me demuestran su apoyo y amor de la forma más tierna y especial.

## **A LOS ANFIBIOS Y HONGOS**

Grupos biológicos fascinantes y mis favoritos, que en este trabajo fue posible estudiar y comprender un poco de ellos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Aurelio, por confiar en mí e impulsarme en la investigación científica desde hace varios años. Por mostrarme el camino correcto. Por siempre ser directo y exigirme todo lo que puedo dar. Por ser mi director y amigo en momentos difíciles. Gracias por permitirme ser tu alumna.

Agradezco a Pablo, Héctor y a Cinthya, por todas las sugerencias para el buen desarrollo del proyecto, por su ayuda en el análisis de los datos y en la discusión de los resultados. Gracias por compartirme un poco de su conocimiento.

Agradezco a Iriana, Ana Paola, Aurelio, Pablo y a Gerardo, por compartirme un poco de su conocimiento en las asignaturas que cursé durante el posgrado. Gracias por la forma de enseñanza y dedicación en la impartición de sus clases, que además de contribuir en mi aprendizaje, me permitió comprender la importancia de la investigación en la conservación de la biodiversidad.

Agradezco a todos mis compañeros del Laboratorio de Ecología del Paisaje y Ordenamiento Ambiental, por su apoyo en el campo y en la identificación del hongo. Gracias por las discusiones sobre diferentes temas de investigación, que permitieron enriquecer mis conocimientos.

Agradezco a los habitantes y autoridades de Molango de Escamilla y Tepehuacán de Guerrero, por darme acceso a los sitios de muestreo para la toma de datos.

Agradezco a la SECIHTI por la beca de manutención (No. CVU: 1270883) otorgada para el desarrollo de mi proyecto de investigación.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES.....	7
La quitridiomycosis y uno de sus agentes patógenos, <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	7
Respuestas de los anfibios a la infección por <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	8
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en México.....	10
JUSTIFICACIÓN.....	11
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVOS.....	14
GENERAL.....	14
PARTICULARES.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Especie y sitios de estudio.....	15
Trabajo de campo .....	17
Trabajo de laboratorio.....	19
Atributos de los cantos y análisis estadísticos .....	20
RESULTADOS.....	21
Descripción del canto reproductivo de <i>Rheohyla miotympanum</i> .....	21
Infección por <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	21
Efecto de la infección por <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> y el ambiente sobre el canto y morfología.....	24
DISCUSIÓN .....	27
RECOMENDACIONES .....	33
CONCLUSIONES.....	34
LITERATURA CITADA.....	36
ANEXO I.....	45
ANEXO II.....	46
ANEXO III .....	48

## RESUMEN

Los anfibios, son el grupo de vertebrados más amenazados a nivel mundial, con el 41 % de sus especies en peligro de extinción, siendo una de las causas principales, la quitridiomycosis, enfermedad infecciosa emergente (EIE) causada por dos hongos patógenos, *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) y *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*). Se sabe que las EIE pueden generar costos en las actividades de sus huéspedes, como el crecimiento y la reproducción, debido a que los individuos infectados suelen desviar esa energía para combatir la enfermedad. Por lo tanto, los objetivos del presente estudio fueron comparar la prevalencia e intensidad de infección por *Bd* en los machos de la rana *Rheohyla miotympanum* de dos sitios del estado de Hidalgo (Laguna de Atezca y Chilijapa), así como determinar el posible efecto del ambiente y el patógeno sobre los cantos reproductivos y la morfología. Para cumplir con estos objetivos, en cada sitio de estudio se registraron los atributos morfológicos y los cantos reproductivos de los machos, así como los atributos microambientales de los sitios, y se tomaron muestras de frotis de piel para determinar el estado (sano o infectado) e intensidad de infección de los individuos. Por medio de pruebas de Mann-Whitney y PERMANOVA, se compararon los atributos morfológicos, acústicos y microambientales entre sitios de estudio y entre estados de infección, y se realizaron correlaciones no paramétricas de Spearman para establecer relaciones causales entre las variables. Los resultados mostraron diferencias significativas en los atributos morfológicos, acústicos y microambientales, y en la medida linealizada de la infección por *Bd* entre sitios de estudio, pero no entre estados de infección. La Laguna de Atezca presentó significativamente los valores más altos en temperatura ( $T_s$  y  $T_c$ ), así como en prevalencia e intensidad de infección por *Bd*; mientras que en Chilijapa, los machos presentaron significativamente los valores más altos en los atributos morfológicos (LEA, LTM, LF, LTP, LHC, P, y AM) y acústicos (D y FD). No se encontró un efecto del ambiente y el patógeno sobre la vocalización y estructura morfológica de los machos de la especie. A pesar de la alta susceptibilidad y los diferentes grados de infección por *Bd* encontrados en los machos analizados, los



hallazgos sugieren que las poblaciones analizadas podrían ser resistentes al quitridio y actuar como reservorios y vectores (como se ha sugerido en otras poblaciones de la misma especie) en los ecosistemas, contribuyendo a su permanencia. Sin embargo, se requieren estudios futuros a lo largo de la distribución geográfica de la especie y en diferentes temporadas y tipos de ecosistemas, que evalúen el estado y las posibles respuestas fisiológicas y/o conductuales que está ejerciendo la rana frente a la infección por *Bd*, con la finalidad de comprender la relación entre el patógeno y este huésped.

**Palabras clave:** Patógeno, infección, canto reproductivo, atributos morfológicos, atributos acústicos, atributos microambientales, anuro.

# INTRODUCCIÓN

La Era del Antropoceno ha estado generando una fuerte presión sobre la biodiversidad (Johnson et al., 2017; Sullivan et al., 2017); por lo que, según algunos autores, estamos viviendo el sexto evento de extinción masiva de especies (Wake & Vredenburg, 2008; Ceballos et al., 2020). Esto es a consecuencia del deterioro ambiental (cambio de uso de suelo y contaminación) y el cambio climático global provocado por el hombre que ha generado el declive o amenaza de extinción de poblaciones de plantas y animales (Brooks et al., 2002; Urban, 2015); estos últimos no solo por la disminución de buenos sitios para vivir y reproducirse, sino también por un alto número de enfermedades infecciosas emergentes (EIE; Dobson & Foufopoulos, 2001; Medina-Vogel, 2010). En este sentido, de acuerdo con los datos más recientes publicados por la IUCN (2023a), el 41 % de las especies de anfibios se encuentran en peligro de extinción, por encima de los mamíferos y las aves, con 27 y 13 % de especies en peligro, respectivamente, lo que posiciona a los anfibios como el grupo de vertebrados más amenazados a nivel mundial. Estos datos resultan preocupantes debido al importante rol ecológico de los anfibios en los ecosistemas, incluyendo su participación en la dinámica trófica como presas de otros vertebrados e importantes controladores de insectos (especies plaga o invasoras; Semlitsch, 2003), así como dispersores de algunas especies de plantas (da Silva et al., 1989; Blaustein et al., 1994; da Silva & de Britto-Pereira, 2006; Blaustein & Bancroft, 2007).

Algunas de las principales causas de este preocupante declive y crisis de extinción de los anfibios, son la pérdida, degradación y fragmentación del hábitat (Pillsbury & Miller, 2008), y los efectos de las enfermedades infecciosas emergentes (Stuart et al., 2004; Halliday, 2008), como la quitridiomycosis, causada por dos hongos patógenos, *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*; Berger et al., 1998; Longcore et al., 1999) y *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*; Martel et al., 2014), considerada “la peor enfermedad infecciosa jamás registrada en vertebrados en términos del número de especies afectadas y su propensión a llevarlas a la extinción” (Gascon et al., 2007). En este sentido, se sabe que las infecciones

por patógenos pueden generar alteraciones en la inversión de la energía destinada para diferentes actividades vitales de los organismos, como crecimiento y reproducción (Sheldon & Verhulst, 1996; Cressler et al., 2014), lo que puede influir directamente en la aptitud de los huéspedes (Roznik et al., 2015), debido a que los individuos infectados suelen reducir su inversión actual en la reproducción y/o crecimiento para desviar esa energía y poder manejar los costos de la enfermedad (e.g. producir o aumentar las respuestas inmunes; Cade, 1984; Stearns, 1992; Sheldon & Verhulst, 1996; Roff, 2002; Bonneaud et al., 2003; Martin et al., 2003; Bonetti-Madelaire et al., 2013), o aumentar su inversión energética en la reproducción para compensar su vida potencialmente más corta con una vida más útil (i.e. mayor éxito reproductivo; Forbes, 1993; Polak & Starmer, 1998; Jokela et al., 1999; Agnew et al., 2000), lo que se conoce como la teoría de las historias de vida (Clutton-Brock, 1984; Stearns, 1992; Roff, 2002).

Particularmente, para comprender los efectos de las enfermedades en los anuros, se ha optado por el análisis de sus cantos (Roznik et al., 2015; An & Waldman, 2016; Greenspan et al., 2016; Liu et al., 2022a, 2022b), principalmente los de tipo reproductivo. Estos cantos, nombrados “male calls” (cantos de los machos) o “male advertisement calls” (cantos de aviso de los machos), son generalmente emitidos por los machos durante la temporada de reproducción, cuyas funciones principales son demarcar territorio ante posibles competidores y atraer a hembras conespecíficas para la reproducción (amplexo; Boger, 1960; Wells, 1977; Toledo et al., 2015), las cuales mediante la evaluación de las propiedades espectrales (e.g. frecuencia dominante, frecuencia mínima, frecuencia máxima, ancho de banda) y temporales de estos cantos (e.g. duración del canto, frecuencia de canto e intervalo entre cantos), elegirán al macho más apropiado para el amplexo y fertilización de los huevos (Wells, 1977; Sullivan et al., 1995; Welch et al., 1998; Giacoma & Castellano, 2001). Es por ello que, cualquier cambio en el comportamiento de las llamadas (cantos), resultaría en un éxito reproductivo diferencial y, por lo tanto, esto tendría implicaciones en el mantenimiento (supervivencia) espacial y temporal de las especies (An & Waldman, 2016).

Generalmente, las hembras eligen a los machos que emiten, 1) cantos energéticamente más costosos de producir (e.g. más fuertes, de mayor duración y/o más repetitivos; Gerhardt & Huber, 2002;

Parris et al., 2009), debido a que suelen ser los más saludables y vigorosos, además de tener acceso a territorios con recursos de alta calidad (Sullivan, 1992; Mitchell, 2001), lo que tendría beneficios directos en las tasas de fertilización (Pfennig, 2000) y en el desarrollo de la progenie (Welch et al., 1998), y 2) cantos de menor frecuencia (Zweifel, 1968; Ryan, 1986; Pombal et al., 1994; Wollerman, 1998; Felton et al., 2006), lo que puede indicar algunas características de la calidad de los machos, como estadio adulto (madurez sexual), mayor tamaño y mayor experiencia en la reproducción (Gerhardt & Doherty, 1988; Felton et al., 2006; Parris et al., 2009). Por lo tanto, el éxito reproductivo de los machos no solo depende de la cantidad o frecuencia del comportamiento reproductivo (cantos), sino también de su calidad (Welch et al., 1998).

Los cantos emitidos para fines reproductivos, son los más comunes y utilizados en estudios de ecología del comportamiento (Köhler et al., 2017; Zhao et al., 2021), siendo posible su registro en campo y la comparación de sus atributos entre especies y sitios (Köhler et al., 2017). Algunos de los atributos que suelen medirse son, duración del canto, número de notas, frecuencia dominante, frecuencia mínima, frecuencia máxima, ancho de banda, frecuencia de canto, e intervalo entre cantos (Blair, 1964; Cocroft & Ryan, 1995; Hoskin et al., 2005; An & Waldman, 2016), debido a que estas variables se encuentran bajo control conductual y fisiológico, por lo que, su ajuste o modificación pueden reflejar adaptaciones a diferentes entornos (Brumm, 2004; Miller, 2006; Fuller et al., 2007; Mockford & Marshall, 2009; Nemeth & Brumm, 2009), como regiones antropizadas (Liu et al., 2022a, 2022b) o con presencia de *Bd* y otros parásitos (Roznik et al., 2015; An & Waldman, 2016; Greenspan et al., 2016).

Además del análisis acústico, se han realizado estudios enfocados en comprender la respuesta de las especies en otras actividades energéticas, como el crecimiento (Lochmiller & Deerenberg, 2000), debido a que los anuros pueden modificar adaptativamente su asignación de energía para enfrentar las adversidades del medio (Stearns, 1992; Roff, 2002). Por ejemplo, en poblaciones naturales, se ha demostrado que *Bd* tiene un alto potencial para inducir respuestas en el desarrollo de los individuos, como masa corporal reducida (Retallick & Miera, 2007; Ramsey et al., 2010) y tasas de crecimiento retardadas

(Davidson et al., 2007; Garner et al., 2009; Hanlon et al., 2015), aspectos igualmente importantes en el éxito reproductivo de las especies.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio es determinar el posible efecto de la infección por *Bd* en la morfología y en los cantos con fines reproductivos de los individuos macho de *Rheohyla miotympanum* de dos ambientes del centro de México.

## ANTECEDENTES

### **La quitridiomycosis y uno de sus agentes patógenos, *Batrachochytrium dendrobatidis***

La quitridiomycosis, causada por los hongos quitridios *Bd* y *Bsal*, y considerada una de las enfermedades infecciosas emergentes más devastadoras a nivel mundial (Gascon et al., 2007), se caracteriza por la colonización del patógeno fúngico en las capas queratinizadas de la epidermis de los anfibios adultos y en el aparato bucal de los renacuajos (Berger et al., 1998; Martel et al., 2014). Algunos signos clínicos de la enfermedad incluyen hiperqueratosis (engrosamiento de las capas de piel), hiperplasia (mayor crecimiento del tejido), decoloración, ulceración, letargo, inapetencia, eritema cutáneo (principalmente en la ingle, extremidades, membranas interdigitales y vientre), y postura anormal (Berger et al., 1999; Pessier et al., 1999; Voyles et al., 2009). Mientras que, a nivel fisiológico, la enfermedad puede desencadenar alteraciones en la función osmorreguladora de la piel, y con ello deshidratación, desequilibrio electrolítico, y muerte causada por paro cardíaco (Berger et al., 1999; Pessier et al., 1999; Voyles et al., 2007).

Los hongos quitridios (pertenecientes al filo Chytridiomycota) son considerados los más primitivos, caracterizados por presentar una espora flagelada (llamada zoospora), y la mayoría con hábitos saprófitos, degradadores de quitina y queratina (Longo, 2018). El género *Batrachochytrium* surgió hasta el descubrimiento y descripción del patógeno *Bd* (Berger et al., 1998; Longcore et al., 1999), realizada hasta finales del siglo pasado. La etimología del género proviene del griego *batracho* = rana y *chytr* = quitridio o cacerola, mientras que el epíteto específico *dendrobatidis* proviene de las ranas del género *Dendrobates*, de donde se aisló por primera vez (Longcore et al., 1999).

A la fecha, se han descrito cinco linajes de *Bd* (O'Hanlon et al., 2018; Byrne et al., 2019), incluyendo *BdCAPE*, *BdAsia1*, *BdAsia2/Brasil*, y *BdAsia3*, presentes en localidades restringidas en todo el mundo (Farrer et al., 2011; Schloegel et al., 2012; O'Hanlon et al., 2018), y *Bd-GPL* (linaje pazoótico global), distribuido en todo el mundo y posiblemente el responsable de la mayoría de las disminuciones dramáticas de poblaciones silvestres de anfibios (Farrer et al., 2011). De este último linaje, considerado el más reciente (O'Hanlon et al., 2018), se han descrito dos grupos genéticos, *Bd-GPL-1* y *Bd-GPL-2*, el

primero distribuido principalmente en América del Norte y Europa, y el segundo en todo el mundo (Schloegel et al., 2012).

El ciclo de vida de *Bd* se compone de una fase móvil infectiva (zoospora) y una sésil (zoosporangio; Berger et al., 2005). La fase móvil ocurre por medio del agua, donde las zoosporas uniflageladas se desplazan hasta llegar a un huésped, para poder enquistarse y penetrar su epidermis (Berger et al., 2005). El estadio 1 o etapa de desarrollo más temprana, ocurre después de que la zoospora se enquista y crecen finos rizoides a su alrededor, induciendo la formación de un zoosporangio joven (también conocido como Germling; Berger et al., 2005). Posteriormente, el estadio 2 o zoosporangio en desarrollo, ocurre cuando el citoplasma se vuelve multinucleado por divisiones mitóticas, dando como resultado la formación de zoosporas redondeadas y flageladas (Berger et al., 2005). Finalmente, el estadio 3 ocurre cuando las zoosporas son liberadas al ambiente a través de la papila (o tubo) de descarga generalmente direccionada hacia la superficie de la piel del huésped, quedando el zoosporangio vacío, pero conservando su forma esférica (Berger et al., 2005). Este zoosporangio puede ser colonizado posteriormente por colonias de bacterias, que pueden diferenciarse de las zoosporas al ser más numerosas y de menor tamaño (Berger et al., 1999; Pessier et al., 1999). Las zoosporas liberadas al ambiente pueden infectar al mismo huésped o transmitirse a uno nuevo (Van-Rooij et al., 2012), y una vez que la infección se establece, el aumento en la intensidad del patógeno dará paso a la patogénesis (Voyles et al., 2009).

### **Respuestas de los anfibios a la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis***

En años recientes, se han sugerido y/o determinado cuatro diferentes respuestas que han adoptado algunas especies de anfibios frente a la infección por *Bd*, descritas a continuación:

- A) **Sistema inmunológico:** incluye la primera y segunda fase de respuesta del sistema inmune. La primera fase, también llamada fase innata, ocurre cuando se activa el sistema nervioso al detectar la entrada de zoosporas al organismo, el cual estimula las glándulas granulares en la superficie de la piel para sintetizar y secretar péptidos antimicrobianos (Rollins-Smith & Conlon, 2005). Durante varios años de investigación, se ha determinado la eficacia en la inhibición del

crecimiento de *Bd* de aproximadamente 66 péptidos antimicrobianos, presentes en 28 especies de anuros de las familias Hylidae, Leptodactylidae, Pipidae, Ranidae, y Myobatrachidae (Rollins-Smith, 2023). Estas familias, a excepción de la última, están presentes en México, algunas con un alto número de especies (e.g. Hylidae y Ranidae; Ramírez-Bautista et al., 2023). Particularmente en los hílidos, los péptidos eficaces contra el patógeno incluyen a algunos representantes de las familias aureína, caerina, citropina, dahleína, demaseptina, filoseptina, frenatina, maculatina, y triptofilolina (Rollins-Smith et al., 2002; Woodhams et al., 2006; Conlon et al., 2007).

En la segunda fase, también llamada fase adaptativa, la respuesta ocurre a través del incremento de linfocitos T y B, y de los anticuerpos IgM, IgX e IgY para combatir la infección (Ramsey et al., 2010).

- B) **Termorregulación:** incluye una respuesta conductual de desplazamiento a microhábitats más cálidos (Richards-Zawacki, 2009), así como cambios en la postura y orientación, ocasionando una fiebre conductual para combatir la infección (Kluger, 1977). El aumento de temperatura corporal mejora las respuestas inmunológicas del organismo, al incrementar la actividad citotóxica de los neutrófilos y macrófagos, optimizar la expresión de las citocinas y estimular la proliferación de células T (Rollins-Smith & Woodhams, 2012).
- C) **Muda de piel:** se ha observado y/o demostrado experimentalmente, que el aumento en la tasa de muda de piel en algunas especies de anuros y caudados puede permitir la disminución y/o eliminación de la infección por *Bd* (Davidson et al., 2003; Ohmer et al., 2017).
- D) **Microbioma de la piel:** algunas bacterias presentes en la piel de los anfibios pertenecientes a varios géneros (e.g. *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Hafnia*, *Janibacter*, *Janthinobacterium*, *Kitasatospora*, *Lysobacter*, *Paenibacillus*, *Pedobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, y *Xanthomonas*) pueden producir los metabolitos 2,4-diacetilfloroglucinol, indol-3-carboxaldehído y violaceína, que han demostrado ser eficientes en la eliminación del patógeno (Harris et al., 2006; Brucker et al., 2008; Loyau et al., 2024).



## ***Batrachochytrium dendrobatidis* en México**

Desde el descubrimiento y descripción de *Bd* (Berger et al., 1998; Longcore et al., 1999), se ha detectado la presencia del patógeno en los cinco continentes habitados por anfibios (Fisher et al., 2009), infectando a poblaciones de los tres órdenes (Anura, Caudata, y Gymnophiona; Gower et al., 2013; Berger et al., 2016). En México, el hongo se identificó por primera vez en cuatro ejemplares de *Anaxyrus punctatus*, colectados en Baja California Sur en 1894, y particularmente en Hidalgo, los registros más tempranos fueron detectados en individuos de *Isthmura belli*, colectados en 1939 (Basanta et al., 2021), y de *Chiropterotriton multidentatus*, estos últimos colectados en el Parque Nacional El Chico, en 1974 (Cheng et al., 2011). De acuerdo con las muestras de anfibios analizadas por Basanta et al. (2021), el único linaje presente en México, es *Bd*-GPL, siendo el subclado *Bd*-GPL-1 el más representado (87 muestras), en comparación con *Bd*-GPL-2 (cuatro muestras).

A la fecha, de las 432 especies de anfibios presentes en México (Ramírez-Bautista et al., 2023), los estudios más recientes (Basanta et al., 2019; Bolom-Huet et al., 2019; Hernández-Martínez et al., 2019; Basanta et al., 2021) han reportado la presencia de *Bd* en más de 100 especies mexicanas, pertenecientes a los tres órdenes. De los anuros positivos a la infección, 33 pertenecen a la familia Hylidae (Bolom-Huet et al., 2019; Basanta et al., 2021), lo que corresponde a una tercera parte de las especies presentes en el país (99 especies; Ramírez-Bautista et al., 2023) y, a su vez, concuerda con Muñoz-Alonso (2010) y Mendoza-Almeralla et al. (2015), quienes han mencionado que esta familia es una de las más susceptibles a la infección por el patógeno. Particularmente, uno de los hílidos en los que se ha reportado a *Bd*, es *R. miotypanum*, con poblaciones infectadas en los estados de Veracruz e Hidalgo (Murrieta-Galindo et al., 2014; Hernández-Austria, 2017; García-Feria et al., 2019). El resto de los anuros infectados en el país, pertenecen a las familias Bufonidae, Craugastoridae, Eleutherodactylidae, Leptodactylidae, Microhylidae, Ranidae, y Scaphiopodidae (Bolom-Huet et al., 2019; Hernández-Martínez et al., 2019; Basanta et al., 2021).

# JUSTIFICACIÓN

Las señales acústicas son rasgos de comportamiento en la delimitación de especies, comunicación y aislamiento reproductivo de diversos grupos biológicos (e.g. anuros, aves, mamíferos, insectos; Gerhardt, 1994; Slabbekoorn, 2004), por lo que, resulta prioritario comprender los mecanismos que causan diferencias en sus atributos (e.g. duración del canto, frecuencia de canto, etc.), tema relevante en ecología evolutiva, ecología del comportamiento (Köhler et al., 2017; Zhao et al., 2021), y biología de la conservación (Tubaro, 1999; Dorcas et al., 2009). En este sentido, como consecuencia del dramático declive mundial de múltiples especies de anfibios, se ha intensificado la investigación en el campo de la bioacústica de anuros (Dorcas et al., 2009). Esto se debe a que el monitoreo auditivo supone una importante herramienta para evaluar el estado y las tendencias de las poblaciones y comunidades, así como sus respuestas frente a diversas presiones, como la modificación antropogénica del hábitat (Bee & Swanson, 2007; Laiolo, 2010; Francis & Barber, 2013; Liu et al., 2022a, 2022b), cambio ambiental (Dorcas et al., 2009) y, enfermedades infecciosas emergentes, como la quitridiomycosis (Roznik et al., 2015; An & Waldman, 2016; Greenspan et al., 2016).

Por otra parte, algunos estudios se han enfocado en comprender cómo las enfermedades pueden generar costos en sus huéspedes (trade-offs; Lochmiller & Deerenberg, 2000; Gamer et al., 2009; An & Waldman, 2016), no solo directamente en la reproducción (e.g. características de los cantos), sino en otras actividades fisiológicas, como el crecimiento (Lochmiller & Deerenberg, 2000; Davidson et al., 2007; Rollins-Smith & Woodhams, 2012) debido a que los anuros suelen desviar estos recursos para atacar o eliminar las infecciones (Rollins-Smith & Woodhams, 2012), lo cual puede comprometer la supervivencia y el éxito reproductivo del huésped (Cressler et al., 2014; Roznik et al., 2015).

Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo evaluar el posible efecto de la infección por *Bd* en la morfología y en los cantos reproductivos (asociados a la elección de pareja) emitidos por los individuos machos de dos ambientes del centro de México. La especie de estudio es la rana *R.*

*miotympanum* debido a que los machos se encuentran activos durante la mayor parte del año (Ramírez - Bautista et al., 2014), lo que facilitará su monitoreo. Además de que, hasta hoy en día, no se ha evaluado la respuesta acústica y morfológica de la especie frente a dicha presión biótica de su hábitat.

## HIPÓTESIS

Se sabe que la infección por *Bd* afecta el crecimiento y el canto en algunos anuros, además se ha mencionado que el ambiente puede influir en la infección, canto y crecimiento de los individuos. Por lo tanto, si los sitios comparados tienen diferencias en cuanto a las condiciones microambientales, se esperan diferencias significativas en la estructura morfológica, así como en el número de notas, propiedades espectrales (frecuencia dominante, frecuencia mínima, frecuencia máxima y ancho de banda) y temporales (duración del canto, frecuencia de canto e intervalo entre cantos) de los cantos dirigidos a la reproducción, emitidos por individuos macho de *R. miotympanum* infectados y no infectados por *Bd*.

# OBJETIVOS

## GENERAL

Analizar la estructura morfológica (medidas morfométricas) y los atributos acústicos de los cantos reproductivos emitidos por individuos macho de la rana *Rheohyla miotympanum* infectados y no infectados por *Batrachochytrium dendrobatidis* en dos ambientes del centro de México (Laguna de Atezca y Chilijapa), mediante pruebas estadísticas, para determinar los posibles efectos del hongo en la morfología y vocalización de la especie de estudio.

## PARTICULARES

1. Detectar la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en individuos macho de *Rheohyla miotympanum*, mediante la tinción de las muestras con azul de lactofenol y la identificación de los zoosporangios del hongo en el microscopio óptico, para comparar la prevalencia e intensidad de la infección entre sitios.
2. Establecer diferencias en atributos microambientales de los sitios, mediante análisis correlacionales, para estimar su efecto sobre la variación morfológica y acústica de machos sanos e infectados por *Batrachochytrium dendrobatidis*.
3. Comparar los atributos acústicos de los cantos reproductivos de individuos machos, sanos e infectados por *Batrachochytrium dendrobatidis*, mediante el uso de pruebas estadísticas, para determinar el posible efecto de la infección en la vocalización de la especie en los dos sitios de estudio.
4. Comparar los atributos morfológicos de los machos, sanos e infectados por *Batrachochytrium dendrobatidis* de ambas poblaciones mediante el uso de pruebas estadísticas, para determinar el posible efecto de la infección en la estructura de estas medidas morfométricas.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Especie y sitios de estudio

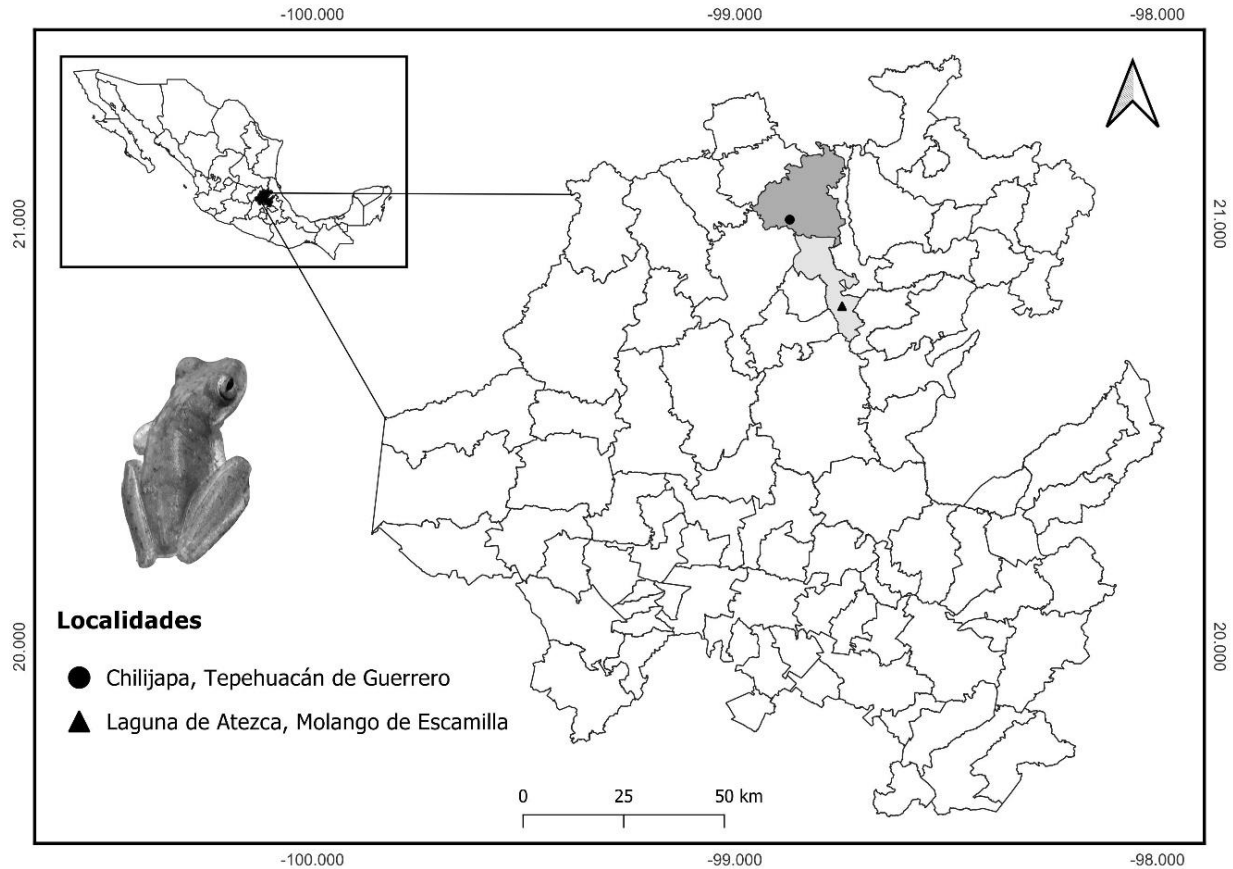
*Rheohyla miotympanum* (Figura 1), es una especie de rana endémica de México, actualmente categorizada con preocupación menor (LC) por la IUCN (2023b), y no considerada en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010). Se distribuye en los estados de Nuevo León, Chiapas, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz, e Hidalgo (Duellman, 2001; Berriozabal-Islas, 2012; Hernández-Salinas et al., 2012). La especie ocurre en diversos tipos de vegetación, como bosques de pino encino, bosque mesófilo de montaña, y bosques tropicales y matorrales (Duellman, 2001). Presenta hábitos nocturnos, es semi-terrestre y arborícola (Stebbins & Cohen, 1997; Duellman, 2001). Es una especie ovípara, los machos se encuentran activos durante la mayor parte del año, a excepción de octubre (Ramírez-Bautista et al., 2014).



**Figura 1.** Macho de *Rheohyla miotympanum* perteneciente a la población de la Laguna de Atezca.

Se seleccionaron dos sitios de muestreo con base en el trabajo de Hernández-Austria (2017), donde se identificó la presencia de *Bd* en cuatro especies de anuros distribuidos en el estado de Hidalgo, incluida *R. miotympanum*. El primer sitio corresponde a la Laguna de Atezca (20°48'19.71"N, 98°44'47.11"O) situada en Molango de Escamilla (Figura 2), a una altitud de 1,300 msnm, con una vegetación predominante de bosque mesófilo de montaña (BMM), una temperatura de 12 a 22 °C y una precipitación de 900-1,600 mm (INEGI, 2009a). Específicamente, los sitios de muestreo se ubicaron a lo largo de un arroyo situado a orilla de un camino y limitado por la laguna, y dos pozas naturales (ANEXO I). El arroyo presentó poca vegetación riparia, ganado y alta contaminación (e.g. papel, botellas de plástico y vidrio). Las pozas presentaron ligeramente más vegetación riparia, y una de ellas (la más cercana al pueblo), presencia frecuente de turistas y, con ello, alta contaminación (e.g. papel, botellas y utensilios de plástico).

El segundo sitio se sitúa en la localidad de Chilijapa (21°00'35.93'N, 98°52'13.16"O), ubicada en Tepehuacán de Guerrero (Figura 2), a una altura de 1,396 msnm, con una vegetación predominante de bosque mesófilo de montaña (BMM), una temperatura de 16 a 24 °C y una precipitación de 1,100 a 2,100 mm (INEGI, 2009b). Específicamente, el muestreo se realizó a lo largo de un arroyo permanente de gran longitud, bordeado de una densa vegetación riparia (ANEXO I). Algunas secciones del arroyo sirven como desagüe de las casas aledañas (aguas negras), por lo que presentó contaminación antropogénica (e.g. botellas de plástico y vidrio, llantas, aceite).



**Figura 2.** Sitios de colecta de frotis de piel y registro de cantos reproductivos de machos de *Rheohyla miotympanum*.

## Trabajo de campo

Se realizaron dos muestreos en cada sitio durante los meses de marzo y abril de 2023, con una duración de tres noches. En los muestreos, se observó que la especie se refugia y detiene su actividad reproductiva durante las lluvias, lo que hace imposible observar a los machos y escuchar su canto. Por lo tanto, para cumplir con los objetivos del estudio, se decidió que el trabajo de campo se realizara únicamente en la temporada seca.

El trabajo de campo se dividió en dos partes, la primera consistió en la grabación de los cantos reproductivos de individuos macho (male advertisement calls) y la segunda, en la toma de muestras para la detección de *Bd*. Las grabaciones acústicas se registraron de las 20:00 a las 24:00 horas, de acuerdo a la actividad de los individuos de la especie, ya que es de hábitos nocturnos (Wells, 2007); mediante la



identificación de los cantos reproductivos de los machos y su registro durante 8 minutos, por medio del uso de una grabadora digital equipada con un par de micrófonos unidireccionales (Tascam DR-40X), colocada a una distancia de aproximadamente 50 cm de la rana. El uso de micrófonos direccionales es recomendable en estudios donde se requieren grabaciones de individuos focales en un ambiente ruidoso (como un coro) debido a que registran el sonido frontal y disminuyen los sonidos laterales (Angulo et al., 2006). Para disminuir la perturbación de los cantos a causa de la presencia humana, se utilizaron lámparas de luz roja y se esperó el inicio de la vocalización durante 10 minutos.

Los factores ambientales (e.g. temperatura y humedad) pueden influir en el tamaño (Ziegler et al., 2011) y comportamiento de los cantos de algunas especies de anuros (Zweifel, 1959; Blair, 1961), por lo que, terminada la grabación de los cantos de la especie de estudio, se registró la temperatura ambiental y humedad relativa del sitio, mediante el uso de un termómetro-higrómetro (precisión de  $\pm 1$  °C,  $\pm 5$  % de HR), así como la temperatura corporal y la temperatura del sustrato donde vocalizó el individuo por medio de un termómetro infrarrojo digital (precisión de  $\pm 2$  °C) a una distancia aproximada de 50 cm de la rana.

Posteriormente, siguiendo el Chytrid Swabbing Protocol (Vredenburg & Briggs, 2009), se realizó la toma de frotis de piel de los machos de las poblaciones de estudio mediante el uso de hisopos de rayón estériles. Las muestras se obtuvieron de las zonas que presentan mayor cantidad de células de *Bd*, incluyendo extremidades, dígitos, regiones inguinales y ventrales (Vredenburg & Briggs, 2009). Considerando que la talla de los machos de la especie es pequeña (LHC máxima de 38.4 mm; Duellman, 2001), a cada rana se le realizó un total de 30 frotis a lo largo del cuerpo, pasando por la zona ventral, patas anteriores y posteriores. Una vez terminado el frotis, la punta de cada hisopo se depositó en un tubo eppendorf de 1.5 mL con una solución de ácido acético y alcohol metílico (a una relación 3 a 1), rotulado con un código único (Mojica, 2010) y al regreso de campo, se almacenaron en el refrigerador. Al concluir los frotis, se registraron ocho medidas morfométricas (peso, longitud hocico-cloaca, ancho de la cabeza, ancho de la mandíbula, largo extremidad anterior, largo del fémur, largo tibia-peroné, y largo tarso-metatarso) de cada individuo, mediante el uso de un vernier digital (precisión de  $\pm 0.02$  mm) y una

báscula digital (precisión de  $\pm 0.1$  gr), respectivamente, y después fueron liberados en el mismo lugar donde se encontraron (Phillott et al., 2010). El tamaño de la muestra se limitó al número de individuos encontrados durante los muestreos. Se utilizaron guantes estériles de látex en la manipulación de cada individuo para evitar la contaminación cruzada (Phillott et al., 2010); y al término de la toma de muestras en cada sitio, se desinfectó el equipo de campo (botas, ropa, ganchos herpetológicos) con cloro al 1 %.

## **Trabajo de laboratorio**

Las muestras se llevaron al Laboratorio de Ecología del Paisaje y Ordenamiento Ambiental del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH). Quince minutos antes de comenzar con el procesamiento de las muestras, se prendió la campana de extracción y el purificador de aire (con ozono), con la finalidad de exterminar los patógenos del área de trabajo. Dentro de la campana de extracción, se retiraron los hisopos de cada tubo eppendorf y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, de cada muestra se realizaron tres preparaciones de 20  $\mu$ L, las cuales fueron teñidas con azul de lactofenol (al 8 %) y analizadas bajo el microscopio óptico, para identificar la presencia de zoosporangios de *Bd* (Lozano-Camelo et al., 2022) y realizar su conteo.

Con este procedimiento, se determinó la prevalencia e intensidad de infección del hongo en los individuos macho de *R. miotympanum*; el primer término representa la proporción de individuos de una población que portan una enfermedad (Noordzij et al., 2010), y se estima de la siguiente forma (Guayasamin et al., 2014):

$$Prevalencia = \frac{\text{individuos positivos a la infección}}{\text{número total de individuos analizados}}$$

mientras que la intensidad de la infección (carga fúngica), se obtuvo mediante el conteo de los zoosporangios en cada individuo.

## Atributos de los cantos y análisis estadísticos

En el software Raven Pro 1.6.4 (Bioacoustics Research Program, 2022), se generaron oscilogramas y espectrogramas para analizar las grabaciones y obtener las siguientes ocho variables acústicas de los cantos completos de cada muestra: 1) duración del canto (desde el comienzo del primer pulso hasta el final del último pulso de un canto, en segundos), 2) número de notas, 3) frecuencia dominante (frecuencia máxima del canto, contine la energía de sonido más alta, en Hertz), 4) frecuencia mínima (frecuencia inferior en el canto, en Hertz), 5) frecuencia máxima (frecuencia superior en el canto, en Hertz), 6) ancho de banda (diferencia entre la frecuencia mínima y máxima en el canto, en Hertz), 7) frecuencia de canto (número total de cantos emitidos en un minuto, cantos/minuto), y 8) intervalo entre cantos (intervalo de tiempo entre dos cantos consecutivos, medido desde el final del último pulso de un canto hasta el comienzo del primer pulso del canto subsiguiente, en segundos; Ziegler et al., 2016; Köhler et al., 2017; Zhao et al., 2018). Estos atributos suelen utilizarse en el estudio de comunicación y elección de pareja en anuros (Blair, 1964; Cocroft & Ryan, 1995; Hoskin et al., 2005; An & Waldman, 2016).

Todos los datos fueron ortogonalizados mediante la fórmula  $z = \frac{X_1 - \mu}{\sigma}$  (Zar, 2005). De acuerdo con la prueba de Mardia (Mardia, 1970), los atributos acústicos, morfológicos, ambientales y de infección no cumplen con la multinormalidad ( $p = 0.000$ ). Se realizaron PERMANOVAS a través de un modelo mínimo basado en distancias euclidianas con medidas depuradas (Anderson, 2001). Las variables elegidas para este contraste multivariado no paramétrico fueron seleccionadas por pruebas pareadas de Mann-Whitney (Mann & Whitney, 1947). Se realizaron dos contrastes, entre sitios de estudio y entre estado de infección (sano e infectado), separando los atributos acústicos, ambientales y morfológicos. Además, la infección se valoró de forma métrica como un atributo explicativo (variable dependiente) para el contraste entre sitios. Finalmente, se realizaron correlaciones no paramétricas múltiples de Spearman (Spearman, 1904) para establecer relaciones causales entre las matrices. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el software Past 4.17 (Hammer, 2024).

## RESULTADOS

Se registraron 126 individuos macho de *R. miotympanum* en ambos sitios de estudio, de los cuales 31 no vocalizaron durante los muestreos, dando como resultado un total de 95 grabaciones de los cantos reproductivos de la especie. Particularmente, en la Laguna de Atezca se registraron 65 individuos, de ellos 20 no emitieron cantos durante el muestreo, mientras que en Chilijapa, se registraron 61 individuos, de éstos 11 no vocalizaron.

### Descripción del canto reproductivo de *Rheohyla miotympanum*

En los muestreos, se observó que el canto reproductivo de los machos de *R. miotympanum* se realiza en coro a lo largo del cuerpo de agua, siendo las hojas de la vegetación riparia el principal sitio de percha. Los machos son territoriales (Torres-Hernández et al., 2023), por lo que, durante el comportamiento reproductivo solo se encuentra un individuo por hoja o por planta. El canto está compuesto por cuatro notas y tiene una duración promedio de 1.4 s. En el espacio espectral, la llamada presenta una frecuencia dominante (FD) de 3,091 Hz, una frecuencia mínima (Fmín) de 2,404.4 Hz, y una frecuencia máxima (Fmáx) de 3,709.7 Hz; mientras que en el espacio temporal, la frecuencia de canto (FC) es de tres cantos por minuto, y el intervalo entre cantos (IC) de 21.3 s (ANEXO II; MZFC-HEC4475 - MZFC-HEC4482, Fonoteca de Anfibios, Universidad Nacional Autónoma de México).

### Infeción por *Batrachochytrium dendrobatidis*

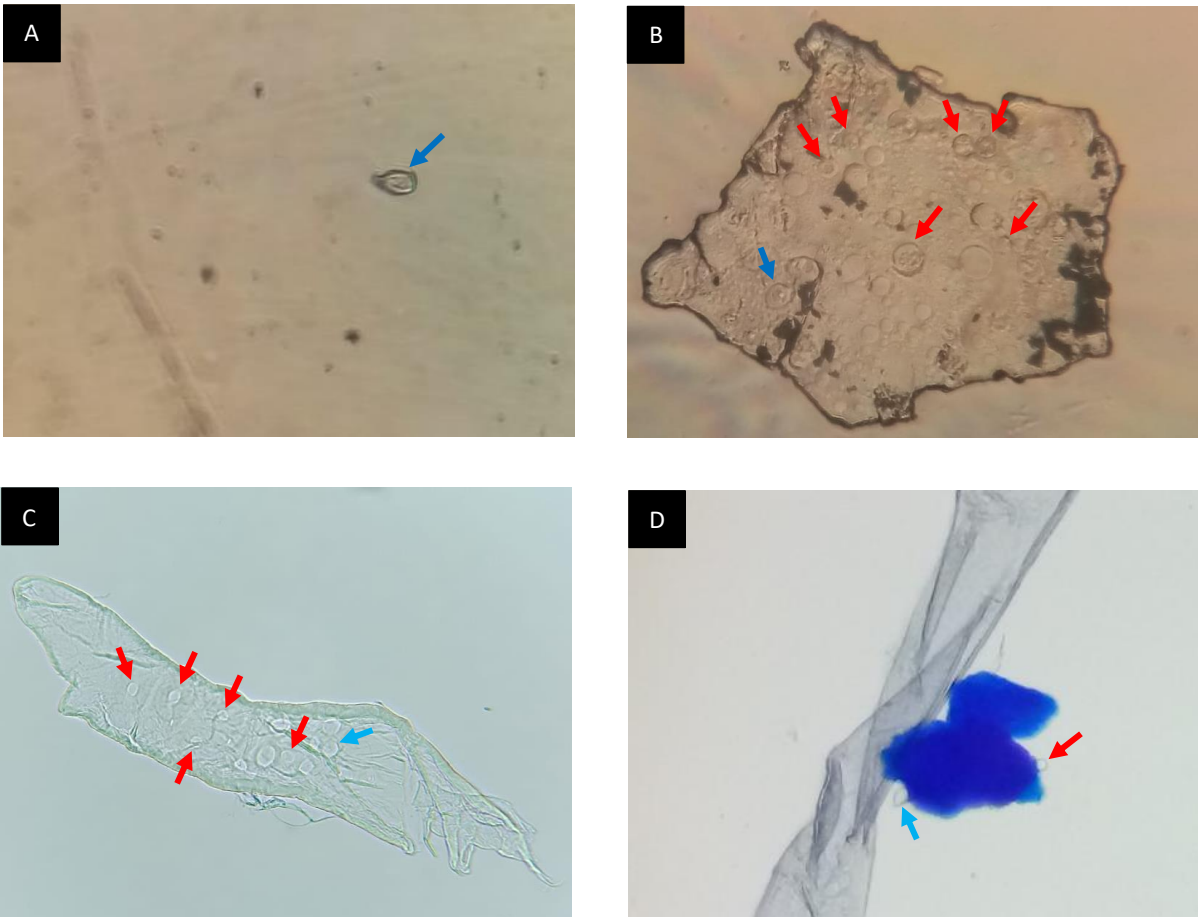
Considerando ambos sitios de estudio, se encontró una prevalencia total de infección por *Bd* del 68.3 % (86 individuos infectados) y una intensidad media (número de zoosporangios) de 7.9 ( $\pm$  11.8; Tabla 1). El sitio con la prevalencia e intensidad de infección más alta fue la Laguna de Atezca, con valores de 73.8 %

(48 individuos infectados) y  $9.8 (\pm 14.3)$ , respectivamente, mientras que Chilijapa, presentó una prevalencia de 62.3 % (38 machos infectados) y una intensidad de  $5.5 (\pm 7.2)$ ; Tabla 1).

**Tabla 1.** Prevalencia e intensidad de infección total y por sitio de *Batrachochytrium dendrobatidis* en individuos macho del anuro *Rheohyla miotympanum*. La intensidad está representada con la media ( $\pm$  DE).

	<b>Prevalencia (%)</b>	<b>Intensidad</b>
Laguna de Atezca	73.8	$9.8 (\pm 14.3)$
Chilijapa	62.3	$5.5 (\pm 7.2)$
Total	68.3	$7.9 (\pm 11.8)$

En los individuos infectados de ambos sitios, se identificaron los estadios de crecimiento 2 y 3 de los zoosporangios de *Bd* (Figura 3), siendo el estadio 2 el más frecuente dentro de las muestras (ANEXO III). En la Laguna de Atezca, el individuo LT27 presentó el mayor número de zoosporangios, con un total de 62, mientras que en Chilijapa, el individuo con el mayor número de zoosporangios fue LT73, con un total de 41 (ANEXO III).



**Figura 3.** Zoosporangios de *Batrachochytrium dendrobatidis* en estadio de crecimiento 2 (flechas rojas) y 3 (flechas azules) encontrados en muestras de individuos macho de la Laguna de Atezca (A y B) y Chilijapa (C y D).

La prueba de Mann-Whitney mostró diferencias significativas entre sitios de estudio en los atributos acústicos, morfológicos y microambientales, así como en la medida linealizada de la infección por *Bd* (Tabla 2). Los individuos machos de Chilijapa presentan valores significativamente más altos en los atributos morfológicos y acústicos, mientras que la Laguna de Atezca, presenta los valores más altos en los atributos microambientales y en la infección por *Bd* (Tabla 2). Asimismo, el análisis de PERMANOVA indicó que, en su conjunto, los atributos microambientales ( $F = 6.7$ ,  $p = 0.004$ ), morfológicos ( $F = 5.4$ ,  $p = 0.01$ ), y acústicos ( $F = 4.3$ ,  $p = 0.03$ ) difieren significativamente entre sitios (Tabla 2).

**Tabla 2.** Resultados de la prueba de Mann-Whitney y PERMANOVA al comparar los atributos microambientales, morfológicos, acústicos y de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) entre sitios de estudio. Ts = temperatura del sustrato, Tc = temperatura corporal, LEA = largo extremidad anterior, LTM = largo tarso-metatarso, LF = largo del fémur, LTP = largo tibia-peroné, LHC = longitud hocico-cloaca, P = peso, AM = ancho de la mandíbula, D = duración del canto, FD = frecuencia dominante, LA = Laguna de Atezca, y C = Chilijapa. Atributos ambientales en °C, morfológicos en gr (peso) y mm, y acústicos en s (duración del canto) y Hz (frecuencia dominante).

	Variable explicativa	Media		Mann-Whitney		PERMANOVA	
		LA	C	U	p	F	p
Ambiental	Ts	17.8	15.4	923	< 0.001		
	Tc	17.8	15.6	974.5	< 0.001	6.7	< 0.01
	<i>Bd</i>	9.8	5.5	1,607.5	0.05		
Morfología	LEA	13.5	14.6	961	< 0.001		
	LTM	19.2	20.9	994.5	< 0.001		
	LF	14.8	15.7	1,124.5	< 0.001		
	LTP	15.0	15.7	1,172.5	< 0.001		
	LHC	27.4	28.2	1,306.5	< 0.001	5.4	< 0.05
	P	1.3	1.4	1,422.5	< 0.01		
	AM	7.3	7.7	1,528	< 0.05		
Acústica	<i>Bd</i>	9.8	5.5	1,607.5	0.05		
	D	1.2	1.6	1,568	< 0.05		
	FD	3,030.4	3,156.9	1,615	0.05	4.3	< 0.05
	<i>Bd</i>	9.8	5.5	1,607.5	0.05		

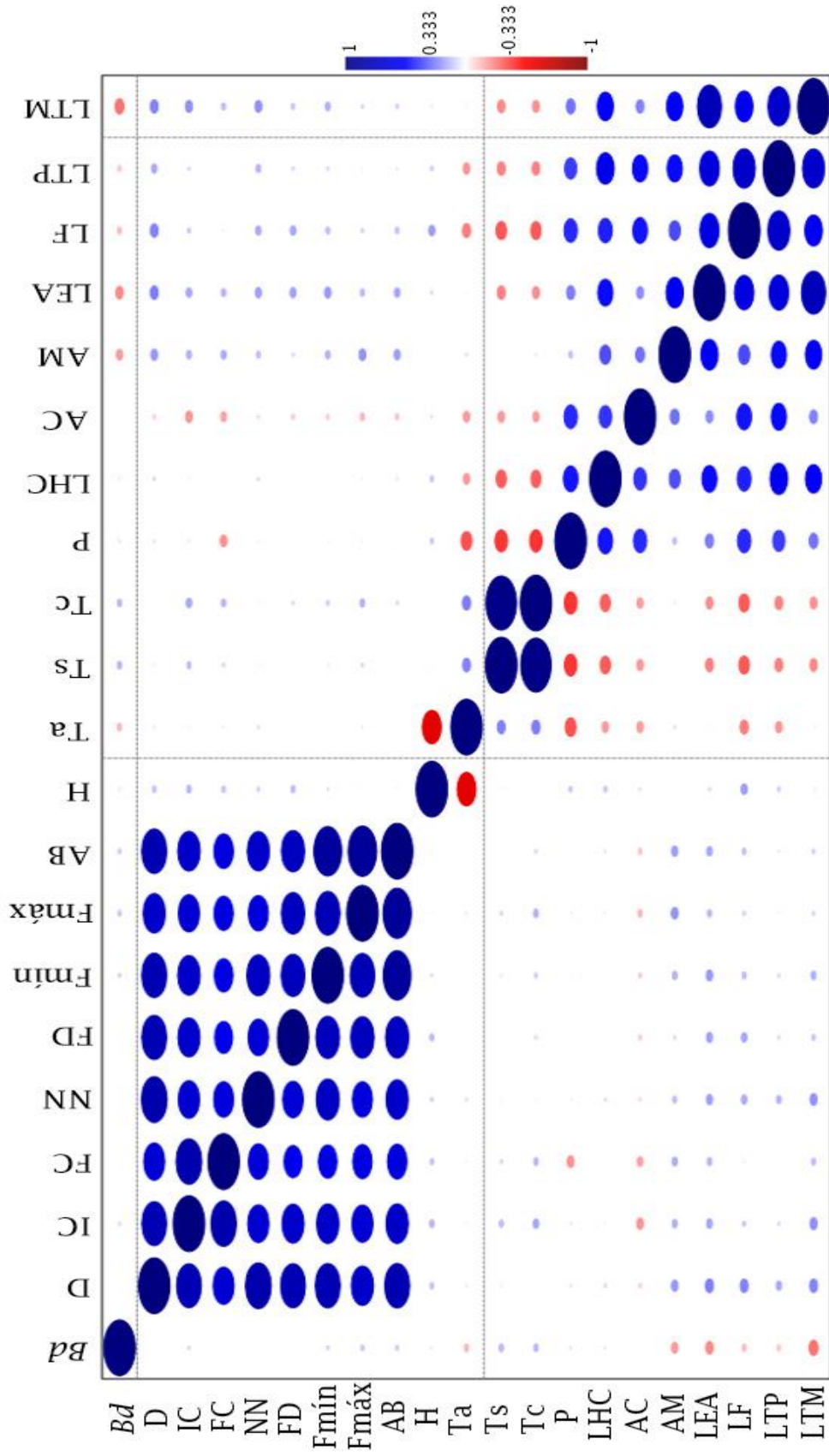
No se encontraron diferencias en los atributos acústicos ( $F = 1.7$ ,  $p = 0.18$ ), morfológicos ( $F = 1.5$ ,  $p = 0.18$ ) y microambientales ( $F = 0.4$ ,  $p = 0.56$ ) entre individuos sanos e infectados por *Bd*.

### Efecto de la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* y el ambiente sobre el canto y morfología

No se encontró correlación significativa de la infección por *Bd* o el ambiente en los atributos acústicos y morfológicos de la especie (Figura 4). Sin embargo, se encontró una correlación significativa entre

atributos al interior de las matrices. Por ejemplo, a mayor duración del canto, mayores son el resto de los atributos acústicos de la especie; a mayor temperatura del sustrato, mayor temperatura corporal; a mayor largo tarso-metatarso, mayor largo extremidad anterior (Figura 4).





**Figura 4.** Correlación de Spearman, la escala de tamaño e intensidad de color indica el tipo de correlación (débil o significativa). El color azul señala una correlación positiva, mientras que el rojo, una correlación negativa. *Bd* = *Batrachochytrium dendrobatidis*, D = duración, IC = intervalo entre cantos, FC = frecuencia de canto, NN = número de notas, FD = frecuencia dominante, Fmín = frecuencia mínima, Fmáx = frecuencia máxima, AB = ancho de banda, H = humedad, Ta = temperatura ambiental, Ts = temperatura del sustrato, Tc = temperatura corporal, P = peso, LHC = longitud hocico-cloaca, AC = ancho de la cabeza, AM = ancho de la mandíbula, LEA = largo extremidad anterior, LF = largo del fémur, LTP = largo tibia-peroné, LTM = largo tarso-metatarso.

## DISCUSIÓN

Las pruebas de Mann-Whitney y PERMANOVA mostraron que los individuos machos de Chilijapa presentan significativamente los valores más altos en siete de las ocho medidas morfométricas analizadas (LEA, LTM, LF, LTP, LHC, P, y AM), y la mayor duración y frecuencia dominante en los cantos de los machos de *R. miotympanum*. En este sentido, a causa de la condición térmica de los anuros, se sabe que la temperatura puede influir en el tamaño de los individuos (tasa de crecimiento; Meenderink et al., 2010; Ziegler et al., 2011), al afectar sus procesos fisiológicos de desarrollo (e.g. letargo) y condicionar su actividad de forrajeo (Browne et al., 2003), lo que a su vez definirá la condición corporal del individuo, aspecto de gran relevancia durante el comportamiento reproductivo, debido a que los machos requieren de una buena condición física para hacer frente al fuerte costo energético que conlleva la emisión de señales acústicas para reproducirse (Smith, 1976).

Por ejemplo, Meenderink et al. (2010) encontraron que, a lo largo de un gradiente altitudinal (30 - 1,000 msnm), algunas características espectrales del canto de la rana *Eleutherodactylus coqui* difieren a consecuencia del tamaño del cuerpo de los individuos, el que está condicionado por la temperatura del sitio de canto. En otro estudio, que contempló el análisis de los cantos reproductivos de *Dryophytes versicolor* registrados en campo y en laboratorio, se observó una fuerte correlación entre la temperatura ambiental y los atributos acústicos de la especie, al encontrar que conforme aumenta la temperatura, hay una disminución en la duración del canto, intervalo entre cantos, duración de pulso y número de pulsos, así como un ligero aumento en la frecuencia dominante de las llamadas (Gayou, 1984).

No obstante, a pesar de la importancia de la temperatura como factor condicionante del tamaño y/o características del canto en estos dos anuros (*E. coquí* y *D. versicolor*), en el presente estudio, la prueba de Spearman indicó que en los machos analizados de *R. miotympanum* no hay una relación causal entre dichas variables. Por lo tanto, la variación en algunas medidas morfométricas y características de los

cantos entre sitios, podría ser explicada a través de otros factores no analizados en este estudio (e.g. características físicas del hábitat, aspectos de la historia de vida de la especie).

Por otra parte, las pruebas estadísticas (Mann-Whitney y PERMANOVA) mostraron diferencias significativas a una escala más fina entre las temperaturas de los sitios de estudio, indicando que la Laguna de Atezca presenta la mayor temperatura de sustrato y temperatura corporal de los machos de *R. miotympanum*. Esta correlación entre ambos tipos de temperatura se debe a que los anuros, al ser organismos ectotermos, obtienen su calor corporal a partir del ambiente donde se encuentran (Narins, 2001).

Además, estos mismos estadísticos mostraron que la Laguna de Atezca presenta significativamente la mayor infección por *Bd*, lo que también se refleja en los valores de prevalencia e intensidad de infección. En este sentido, se sabe que la temperatura es un factor abiótico de gran importancia para el crecimiento de especies de hongos (Harvell et al., 2002). Por ejemplo, en cultivos de crecimiento se ha determinado que el rango de temperatura óptima para *Bd* va de 17 a 25 °C (Longcore et al., 1999; Piotrowski et al., 2004), mientras que en estudios experimentales con ranas huéspedes, se ha determinado un óptimo térmico de 21 °C (Sheets et al., 2021). Sin embargo, a pesar de esta fuerte relación entre temperatura e infección por *Bd*, la prueba de Spearman indicó que no existe una relación causal entre la mayor temperatura (sustrato y corporal) e infección encontrada en la Laguna de Atezca, es decir, en este estudio no se puede sugerir que una mayor temperatura, que además entra en el rango térmico óptimo del hongo, propiciará una mayor prevalencia e intensidad de infección. Además, si se considera la temperatura ambiental como el factor de mayor relevancia en la infección por este patógeno, se esperaría que los sitios no difirieran significativamente, debido a que presentaron temperaturas ambientales similares (Laguna de Atezca = 23.64 °C, Chilijapa = 24.63 °C), que entran en el rango óptimo de crecimiento del hongo.

Por otra parte, algunos autores han mencionado que la alta probabilidad e intensidad de infección por *Bd* puede explicarse a través de otros factores abióticos, como el pH del agua (Piotrowski et al., 2004) y efectos estacionales (Sonn et al., 2019). De esto último, se ha sugerido que durante la temporada de

secas, las ranas suelen agruparse en los sitios más húmedos de los hábitats, lo que aumenta la probabilidad e intensidad de infección por *Bd*, debido a que en estas zonas el hongo es más abundante (Longo et al., 2010). Esta tendencia se observó claramente en Chilijapa, donde los machos se encontraban aglomerados en pequeños manchones de vegetación riparia, por lo que se esperaba que este sitio presentaría la mayor prevalencia e intensidad de infección, pero no fue así. Por lo tanto, estas observaciones *in situ* junto con los resultados de este estudio, indican que la mayor infección por *Bd* encontrada en la Laguna de Atezca no es explicada por los dos factores, temperatura y cercanía entre individuos a causa de la estacionalidad.

Los resultados de este trabajo difieren a los encontrados por Hernández-Austria (2017) en los mismos sitios de estudio. Ella encontró una prevalencia e intensidad de infección por *Bd* más baja en la Laguna de Atezca (8.89 % y 395.87 ZE, respectivamente), en comparación con Chilijapa (15.22 % y 9,842.24 ZE, respectivamente); sin embargo, estos resultados pueden ser cuestionados con base en que, de las tres especies evaluadas en el primer sitio (*R. miotympanum*, *Charadrahyla taeniopus*, y *Lithobates berlandieri*), solo se terminó la presencia del hongo en cuatro individuos de *Lithobates berlandieri*, de 17 evaluados, con un grado de infección relativamente bajo (395.87 ZE). La autora sugiere la posibilidad de que los hílidos libres del patógeno (*R. miotympanum* y *C. taeniopus*), se infecten en el futuro a través de *L. berlandieri*, debido a que coexisten con esta especie de rana, que, por sus hábitos acuáticos, es más susceptible al patógeno. En este sentido, aunque han pasado ocho años de diferencia en la colecta de las muestras de frotis de piel, es más probable, al menos con respecto a *R. miotympanum*, que los resultados contrastantes entre los dos estudios, se deban al tamaño de muestra y a la metodología utilizada (24 individuos evaluados con Q-PCR por Hernández-Austria vs 65 en el presente estudio por identificación directa).

Por otra parte, es probable que las diferencias en la prevalencia e intensidad de infección por *Bd* se deban a las características de los sitios de estudio. Por ejemplo, en la Laguna de Atezca se observó la presencia de ganado y turistas en dos de los sitios de muestreo, que como ha sido sugerido por algunos investigadores (e.g. Johnson & Speare, 2005; Luja et al., 2012), pueden ser medios de diseminación del

patógeno, al igual que las aves acuáticas (e.g. patos y garzas; Burrowes & De la Riva, 2017; Hanlon et al., 2017), anfibios (e.g. *Rhinella horribilis*, *L. berlandieri*; Johnson & Speare, 2005; Hernández-Austria, 2017), y peces exóticos vectores (e.g. *Micropterus salmoides* y *Oreochromis* sp; Luja et al., 2012; Liew et al., 2017), observados en lugares cercanos a los sitios de muestreo de este trabajo, así como en el de Hernández-Austria (2017). Por lo tanto, todos estos factores podrían explicar la mayor prevalencia e intensidad de infección encontrada en la Laguna de Atezca, en comparación con Chilijapa, donde están ausentes.

Por otra parte, a pesar de que en varias partes del mundo se han reportado especies susceptibles a *Bd*, que han sido afectadas en su crecimiento (Hanlon et al., 2015; Patillo, 2019), cantos reproductivos (Kelleher et al., 2021), o que incluso han disminuido sus poblaciones o se han extinto (e.g. *Incillius periglenes*, *Rheobatrachus silus*; Daszak et al., 1999), otras especies han mostrado resistencia al patógeno (e.g. *L. catesbeianus*, *R. horribilis*, *Xenopus laevis*, *Plectrohyla matudai*, *Pseudacris regilla*) al no presentar signos de enfermedad (e.g. hiperplasia, hiperqueratosis, ulceraciones) y poder sobrevivir con diferentes grados de infección, por lo que han sido sugeridas como reservorios y vectores del hongo (Daszak et al., 2004; Weldon et al., 2004; Blaustein et al., 2005; Johnson & Speare, 2005; Cheng et al., 2011). En este sentido, los resultados de nuestro estudio, muestran diferentes grados de infección en los machos analizados de *R. miotypanum*. Por ejemplo, de acuerdo con Berger et al. (2005), un zoosporangio de *Bd* libera aproximadamente 300 zoosporas, por lo que, si se extrapola la intensidad menor (un zoosporangio) y mayor (42 en Chilijapa, y 62 en la Laguna de Atezca) de cada sitio, así como la total (7.9), se obtendría un grado de infección de 300, 12,600, 18,600, y 2,370 zoosporas, respectivamente.

Estudios realizados en poblaciones del estado de Veracruz e Hidalgo también han encontrado diferentes intensidades de infección de *Bd* en *R. miotypanum*. Por ejemplo, Murrieta-Galindo et al. (2014) encontraron grados de infección desde 0.1 hasta 175 ZE en cuatro ecosistemas del estado de Veracruz (dos de bosque mesófilo de montaña y dos agroecosistemas de café), mientras que Hernández-

Austria (2017), desde 26.18 hasta 2,184.41 ZE en tres poblaciones diferentes del estado de Hidalgo. Además, a pesar de que el trabajo de García-Feria et al. (2019) no reporta grado de infección en este hílido, sus resultados de prevalencia en temporada de seca, al igual que en este estudio, indican que la especie es altamente susceptible a la infección. Por ejemplo, de 47 adultos evaluados, 22 fueron positivos a *Bd*, mientras que, de 32 renacuajos, 26 presentaron el hongo, dando como resultado una prevalencia de 46.81 y 81.25 %, respectivamente. Por lo tanto, los hallazgos de estos autores, juntos con los resultados de este estudio, muestran la alta susceptibilidad de la especie al patógeno que puede ser explicada por su modo reproductivo acuático (Murrieta-Galindo et al., 2014), desarrollo larvario de vida libre, y alta asociación a cuerpos de agua en la fase de renacuajo y adulto (García-Feria et al., 2019), donde ocurre la fase infectiva (Berger et al., 2005).

Sin embargo, a pesar de esta susceptibilidad y los diferentes grados de infección de *Bd* que pueden presentar los individuos de *R. miotympanum* (encontrados en este trabajo y en los estudios citados), la prueba de Spearman determinó que no existe un efecto del hongo sobre la estructura morfológica y los cantos reproductivos de los machos de la especie bajo estudio, además de que durante los muestreos, no se observaron signos de enfermedad o individuos muertos a consecuencia del patógeno, lo que coincide con las observaciones de García-Feria et al. (2019). Por lo tanto, estos hallazgos apoyan la idea de que *R. miotympanum* podría ser una especie resistente a la infección por *Bd* y actuar como reservorio y vector (al menos en los sitios evaluados), como ha sido sugerido por García-Feria et al. (2019) en poblaciones de Veracruz, lo que permite que el patógeno se mantenga en la población de la especie y en los ecosistemas (Briggs et al., 2010). Esta posibilidad tendría que tomarse con precaución considerando que este hílido se distribuye en diferentes tipos de ecosistemas, incluido el bosque mesófilo de montaña (como las poblaciones de Hidalgo aquí evaluadas, y las de Veracruz), el cual se caracteriza por albergar una alta diversidad de especies y un alto grado de endemismos (Aldrich et al., 1997) y, particularmente en México, es el ecosistema con mayor diversidad de especies por unidad de área (Rzedowski, 1993), por lo que podría poner en riesgo a los anfibios mexicanos vulnerables con los que coexiste.

Existe la posibilidad de que el extenso tiempo entre la interacción de *Bd* y anfibios de Hidalgo, al menos 85 años de acuerdo con Basanta et al. (2021), haya sido suficiente para que algunas especies, como podría ser el caso de *R. miotympanum*, desarrollen estrategias fisiológicas y/o conductuales que permitan la resistencia al patógeno, incluyendo la respuesta inmunológica (e.g. péptidos antimicrobianos; Rollins-Smith, 2023), desplazamiento a sitios más cálidos (termorregulación; Richards-Zawacki, 2009), presencia de bacterias en la piel con capacidad de secretar metabolitos anti-*Bd* (Harris et al., 2006; Brucker et al., 2008; Loyau et al., 2024) y/o aumento en la tasa de muda de piel (Davidson et al., 2003; Ohmer et al., 2017). En este sentido, a pesar de que ninguna de estas respuestas fue evaluada en los machos de *R. miotympanum*, durante la realización de los frotis se observó una frecuente muda de piel, por lo que es posible que esta sea una de las estrategias que utiliza la especie para hacer frente a la infección, sin embargo, es una hipótesis que debe probarse.

## RECOMENDACIONES

Con la finalidad de conocer con mayor seguridad la relación de *Bd* con *R. miotympanum*, se mencionan a continuación una serie de recomendaciones:

1. Realizar monitoreos de la especie a lo largo de su distribución geográfica en diferentes temporadas del año y tipos de ecosistemas, con la finalidad de comprender cómo se comporta el patógeno y el huésped.
2. Determinar el linaje y grupo genético de *Bd* presente en las poblaciones de la especie, para determinar si su capacidad de resistencia está vinculada con la virulencia del hongo.
3. Contemplar en estudios futuros la evaluación de otras variables bióticas (e.g. estrategias fisiológicas y conductuales de la especie) y abióticas (e.g. características físico-químicas de los hábitats) de importancia para el éxito del huésped y el patógeno.
4. Evaluar la adecuación de las hembras (e.g. tamaño de la puesta, viabilidad y supervivencia de los renacuajos) y machos (e.g. capacidad reproductiva, viabilidad del esperma) para determinar con mayor seguridad la ausencia de efecto del patógeno sobre la especie.



## CONCLUSIONES

Se encontró una prevalencia total de infección por *Bd* del 68.3 % (86 individuos infectados) y una intensidad media (número de zoosporangios) de 7.9 ( $\pm$  11.8). La Laguna de Atezca presentó la prevalencia e intensidad de infección más alta, con valores de 73.8 % (48 individuos infectados) y 9.8 ( $\pm$  14.3), respectivamente; mientras que Chilijapa, presentó una prevalencia de 62.3 % (38 individuos infectados) y una intensidad de 5.5 ( $\pm$  7.2). Estas diferencias podrían ser explicadas por las actividades antropogénicas (e.g. turismo, ganadería) de los sitios de estudio y las especies que albergan (e.g. vectores).

Se encontraron diferencias entre los atributos microambientales de los sitios de estudio ( $F = 6.7$ ;  $p = 0.004$ ), sin embargo, no se encontró un efecto del ambiente sobre las medidas morfométricas y características acústicas de los cantos reproductivos de la especie, así como en la infección por *Bd*.

No se encontraron diferencias significativas en los atributos acústicos entre individuos sanos e infectados por *Bd* ( $F = 1.7$ ,  $p = 0.18$ ), y no se encontró un efecto del patógeno sobre la vocalización de la especie.

No se encontraron diferencias significativas en los atributos morfológicos entre individuos sanos e infectados por *Bd* ( $F = 1.5$ ,  $p = 0.18$ ), y no se encontró un efecto del patógeno sobre las medidas morfométricas de la especie.

La ausencia de efecto de *Bd* sobre las medidas morfométricas y los cantos reproductivos de los machos de *R. miotympanum*, así como la ausencia de síntomas de la enfermedad y observaciones de muda de piel frecuente en los individuos, sugieren que la especie, al menos en estos sitios, podría ser resistente al patógeno (como se ha sugerido en este anuro y en otros anfibios) y actuar como posible reservorio y vector, permitiendo su permanencia en la población y en el ecosistema. Sin embargo, se requieren estudios futuros de monitoreo y evaluación de la respuesta del hílido a la infección (muda de piel, sistema inmune, termorregulación, y bacterias de la piel) en diferentes temporadas del año y poblaciones a lo largo de su

distribución geográfica, que permitan comprender con mayor seguridad la relación existente entre *Bd* y la especie de estudio.

## LITERATURA CITADA

- Agnew, P., Koella, J. C., & Michalakis, Y. (2000). Host life history responses to parasitism. *Microbes and Infection*, 2(8), 891-896.
- Aldrich, M., Billington, C., Edwards, M., & Laidlaw, R. (1997). Tropical montane cloud forests: an urgent priority for conservation. *WCMC Biodiversity Bulletin*, 2, 1-14.
- An, D., & Waldman, B. (2016). Enhanced call effort in Japanese tree frogs infected by amphibian chytrid fungus. *Biology letters*, 12(3), 20160018.
- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral ecology*, 26(1), 32-46.
- Angulo, A., Rueda-Almonacid, J. V., Rodríguez-Mahecha, J. V., & La Marca, E. (2006). *Técnicas de inventario y monitoreo para los anfibios de la región tropical andina*. Conservación Internacional. Serie Manuales de Campo N° 2. Panamericana Formas e Impresos S.A. Bogotá D.C., Colombia. 298 p.
- Basanta, M. D., Byrne, A. Q., Rosenblum, E. B., Piovia-Scott, J., & Parra-Olea, G. (2021). Early presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Mexico with a contemporary dominance of the global panzootic lineage. *Molecular Ecology*, 30(2), 424-437.
- Basanta, M. D., Calzada-Arciniega, R. A., Jiménez-Velázquez, G., Arias-Balderas, S. F., Ibarra Reyes, A. A., Medina Rangel, G., ... & Parra-Olea, G. (2019). Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in threatened endemic mole salamanders (*Ambystoma*) in Mexico. *Herpetological Review*, 50(3), 493-495.
- Bee, M. A., & Swanson, E. M. (2007). Auditory masking of anuran advertisement calls by road traffic noise. *Animal behaviour*, 74(6), 1765-1776.
- Berger, L., Hyatt, A. D., Speare, R., & Longcore, J. E. (2005). Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of aquatic organisms*, 68(1), 51-63.
- Berger, L., Roberts, A. A., Voyles, J., Longcore, J. E., Murray, K. A., & Skerratt, L. F. (2016). History and recent progress on chytridiomycosis in amphibians. *Fungal ecology*, 19, 89-99.
- Berger, L., Speare, R., & Hyatt, A. (1999). Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. In A. Campbell (Ed.), *Declines and disappearances of Australian frogs* (pp. 23-33). Environment Australia. Australia.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A. A., Goggin, C. L., ... & Parkes, H. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(15), 9031-9036.
- Berriozabal-Islas, C. S. (2012). Riqueza y diversidad herpetofaunística del bosque tropical, cafetales y potreros del municipio de Huehuetla, Hidalgo, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 148 p.
- Bioacoustics Research Program. (2022). Raven: Interactive Sound Analysis Software [Computer software]. Ithaca, NY: The Cornell Lab of Ornithology. Available from <https://ravensoundsoftware.com/>.
- Blair, W. F. (1961). Calling and spawning seasons in a mixed population of anurans. *Ecology*, 42(1), 99-110.
- Blair, W. F. (1964). Isolating mechanisms and interspecies interactions in anuran amphibians. *The Quarterly Review of Biology*, 39(4), 334-344.
- Blaustein, A. R., & Bancroft, B. A. (2007). Amphibian population declines: evolutionary considerations. *BioScience*, 57(5), 437-444.
- Blaustein, A. R., Romansic, J. M., Scheessele, E. A., Han, B. A., Pessier, A. P., & Longcore, J. E. (2005). Interspecific variation in susceptibility of frog tadpoles to the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology*, 19(5), 1460-1468.

- Blaustein, A. R., Wake, D. B., & Sousa, W. P. (1994). Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation biology*, 8(1), 60-71.
- Bogert, C. M. (1960). The influence of sound on the behavior of amphibians and reptiles. In W. E. Lanyon & W. N. Tavolga (Eds.), *Animal sounds and communication* (pp. 137–320). American Institute of Biological Sciences. Washington D.C., USA.
- Bolom-Huet, R., Pineda, E., Díaz-Fleischer, F., Muñoz-Alonso, A. L., & Galindo-González, J. (2019). Known and estimated distribution in Mexico of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a pathogenic fungus of amphibians. *Biotropica*, 51(5), 731-746.
- Bonetti-Madelaire, C., da Silva, R. J., & Ribeiro-Gomes, F. (2013). Calling behavior and parasite intensity in treefrogs, *Hypsiboas prasinus*. *Journal of Herpetology*, 47(3), 450-455.
- Bonneaud, C., Mazuc, J., Gonzalez, G., Haussy, C., Chastel, O., Faivre, B., Sorci, G., & Sheldon, B. C. (2003). Assessing the cost of mounting an immune response. *The American Naturalist*, 161(3), 367-379.
- Briggs, C. J., Knapp, R. A., & Vredenburg, V. T. (2010). Enzootic and epizootic dynamics of the chytrid fungal pathogen of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(21), 9695-9700.
- Brooks, T. M., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A. B., Rylands, A. B., Konstant, W. R., ... & Hilton-Taylor, C. (2002). Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conservation Biology*, 16(4), 909-923.
- Browne, R. K., Pomeroy, M., & Hamer, A. J. (2003). High density effects on the growth, development and survival of *Litoria aurea* tadpoles. *Aquaculture*, 215(1-4), 109-121.
- Brucker, R. M., Harris, R. N., Schwantes, C. R., Gallaher, T. N., Flaherty, D. C., Lam, B. A., & Minbiole, K. P. C. (2008). Amphibian chemical defense: antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus*. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 1422-1429.
- Brumm, H. (2004). The impact of environmental noise on song amplitude in a territorial bird. *Journal of Animal Ecology*, 73(3), 434-440.
- Burrowes, P. A., & De la Riva, I. (2017). Detection of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in museum specimens of Andean aquatic birds: implications for pathogen dispersal. *Journal of wildlife diseases*, 53(2), 349-355.
- Byrne, A. Q., Vredenburg, V. T., Martel, A. N., Pasmans, F., Bell, R. C., Blackburn, D. C., ... & Rosenblum, E. B. (2019). Cryptic diversity of a widespread global pathogen reveals expanded threats to amphibian conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(41), 20382-20387.
- Cade, W. H. (1984). Effects of fly parasitoids on nightly calling duration in field crickets. *Canadian Journal of Zoology*, 62(2), 226-228.
- Ceballos, G., Ehrlich, P. R., & Raven, P. H. (2020). Vertebrates on the brink as indicators of biological annihilation and the sixth mass extinction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(24), 13596-13602.
- Cheng, T. L., Rovito, S. M., Wake, D. B., & Vredenburg, V. T. (2011). Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(23), 9502-9507.
- Clutton-Brock, T. H. (1984). Reproductive effort and terminal investment in iteroparous animals. *The American Naturalist*, 123(2), 212-229.
- Cocroft, R. B., & Ryan, M. J. (1995). Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. *Animal Behaviour*, 49(2), 283-303.
- Conlon, J. M., Woodhams, D. C., Raza, H., Coquet, L., Leprince, J., Jouenne, T., ... & Rollins-Smith, L. A. (2007). Peptides with differential cytolytic activity from skin secretions of the lemur leaf frog *Hylomantis lemur* (Hylidae: Phyllomedusinae). *Toxicon*, 50(4), 498-506.
- Cressler, C. E., Nelson, W. A., Day, T., & McCauley, E. (2014). Disentangling the interaction among host resources, the immune system and pathogens. *Ecology letters*, 17(3), 284-293.

- da Silva, H. R., & de Britto-Pereira, M. C. (2006). How much fruit do fruit-eating frogs eat? An investigation on the diet of *Xenohyla truncata* (Lissamphibia: Anura: Hylidae). *Journal of Zoology*, 270(4), 692-698.
- da Silva, H. R., de Britto-Pereira, M. C., & Caramaschi, U. (1989). Frugivory and seed dispersal by *Hyla truncata*, a neotropical treefrog. *Copeia*, 1989(3), 781-783.
- Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A. A., Hyatt, A. D., Green, D. E., & Speare, R. (1999). Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging infectious diseases*, 5(6), 735.
- Daszak, P., Strieby, A., Cunningham, A. A., Longcore, J. E., Brown, C. C., & Porter, D. (2004). Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetological Journal*, 14, 201-207.
- Davidson, C., Benard, M. F., Shaffer, H. B., Parker, J. M., O'Leary, C., Conlon, J. M., & Rollins-Smith, L. A. (2007). Effects of chytrid and carbaryl exposure on survival, growth and skin peptide defenses in foothill yellow-legged frogs. *Environmental Science & Technology*, 41(5), 1771-1776.
- Davidson, E. W., Parris, M., Collins, J. P., Longcore, J. E., Pessier, A. P., & Brunner, J. (2003). Pathogenicity and transmission of chytridiomycosis in tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Copeia*, 3, 601-607.
- Dobson, A., & Foufopoulos, J. (2001). Emerging infectious pathogens of wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 356(1411), 1001-1012.
- Dorcas, M. E., Price, S. J., Walls, S. C., & Barichivich, W. J. (2009). Auditory monitoring of anuran populations. In C. K. Dodd (Ed.), *Amphibian ecology and conservation: a handbook of techniques* (pp. 281-298). Oxford University Press. Oxford, United Kingdom.
- Duellman, W. E. (2001). *Hylid frogs of Middle America*. Museum of Natural History (Vol. 1). The Society for the Study of Amphibians and Reptiles. Kansas, USA. 1158 p.
- Farrer, R. A., Weinert, L. A., Bielby, J., Garner, T. W., Balloux, F., Clare, F., ... & Fisher, M. C. (2011). Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(46), 18732-18736.
- Felton, A., Alford, R. A., Felton, A. M., & Schwarzkopf, L. (2006). Multiple mate choice criteria and the importance of age for male mating success in the microhylid frog, *Cophixalus ornatus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 59, 786-795.
- Fisher, M. C., Garner, T. W. J., & Walker, S. F. (2009). Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 291-310.
- Forbes, M. R. L. (1993). Parasitism and host reproductive effort. *Oikos*, 67, 444-450.
- Francis, C. D., & Barber, J. R. (2013). A framework for understanding noise impacts on wildlife: an urgent conservation priority. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 11(6), 305-313.
- Fuller, R. A., Warren, P. H., & Gaston, K. J. (2007). Daytime noise predicts nocturnal singing in urban robins. *Biology letters*, 3(4), 368-370.
- García-Feria, L. M., Brousset, D. M., & Cervantes-Olivares, R. A. (2019). Factores abióticos y bióticos determinantes para la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios mexicanos. *Acta Zoológica Mexicana*, 35, 1-18.
- Garner, T. W. J., Walker, S., Bosch, J., Leech, S., Rowcliffe, J. M., Cunningham, A. A., & Fisher, M. C. (2009). Life history tradeoffs influence mortality associated with the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Oikos*, 118(5), 783-791.
- Gascon, C., Collins, J. P., Moore, R. D., Church, D. R., McKay, J. E., & Mendelson III, J. R. (Eds.). (2007). *Amphibian conservation action plan*. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge. United Kingdom. 64 p.
- Gayou, D. C. (1984). Effects of temperature on the mating call of *Hyla versicolor*. *Copeia*, 1984(3), 733-738.
- Gerhardt, H. C. (1994). The evolution of vocalization in frogs and toads. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 25, 293-324.

- Gerhardt, H. C., & Doherty, J. A. (1988). Acoustic communication in the gray treefrog, *Hyla versicolor*: evolutionary and neurobiological implications. *Journal of Comparative Physiology A*, 162, 261-278.
- Gerhardt, H. C., & Huber, F. (Eds). (2002). *Acoustic communication in insects and anurans: common problems and diverse solutions*. University of Chicago Press. Illinois, USA. 542 p.
- Giacoma, C., & Castellano, S. (2001). Advertisement call variation and speciation in the *Bufo viridis* complex. In M. J. Ryan (Ed.), *Anuran communication* (pp. 205–219). Smithsonian Institution Press. Washington D.C., USA.
- Gower, D. J., Doherty-Bone, T., Loader, S. P., Wilkinson, M., Kouete, M. T., Tapley, B., ... & Garner, T. W. J. (2013). *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and lethal chytridiomycosis in caecilian amphibians (Gymnophiona). *EcoHealth*, 10, 173-183.
- Greenspan, S. E., Roznik, E. A., Schwarzkopf, L., Alford, R. A., & Pike, D. A. (2016). Robust calling performance in frogs infected by a deadly fungal pathogen. *Ecology and Evolution*, 6(16), 5964-5972.
- Guayasamin, J. M., Mendoza, A. M., Longo, A. V., Zamudio, K. R., & Bonaccorso, E. (2014). High prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in an Andean frog community (Reserva Las Gralarias, Ecuador). *Amphibian & Reptile Conservation*, 8(1), 33-44.
- Halliday, T. R. (2008). Why amphibians are important. *International Zoo Yearbook*, 42(1), 7-14.
- Hammer, Ø. (2024). PAST: Paleontological Statistics Software. Package for Education and Data Analysis. Natural History Museum, University of Oslo.
- Hanlon, S. M., Lynch, K. J., Kerby, J., & Parris, M. J. (2015). *Batrachochytrium dendrobatidis* exposure effects on foraging efficiencies and body size in anuran tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms*, 112(3), 237-242.
- Hanlon, S. M., Henson, J. R., & Kerby, J. L. (2017). Detection of amphibian chytrid fungus on waterfowl integument in natural settings. *Diseases of Aquatic Organisms*, 126(1), 71-74.
- Harris, R. N., James, T. Y., Lauer, A., Simon, M. A., & Patel, A. (2006). Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. *EcoHealth*, 3, 53-56.
- Harvell, C. D., Mitchell, C. E., Ward, J. R., Altizer, S., Dobson, A. P., Ostfeld, R. S., & Samuel, M. D. (2002). Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* 296, 2158–2162.
- Hernández-Austria, R. (2017). Estudio sobre la infección por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* en cinco especies de anuros del estado de Hidalgo, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 63 p.
- Hernández-Martínez, L. Á., Romero-Méndez, U., González-Barrios, J. L., García-De la Peña, M. C., & Amézquita-Torres, A. (2019). Nuevos registros y prevalencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anuros de la cuenca Nazas-Aguanaval en la región norte-centro de México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 90, e902934.
- Hernández-Salinas, U., Ramírez-Bautista, A., Badillo-Saldaña, L. M., & Lara-Tufiño, D. (2012). *Ecnomihyla miotympanum* (Small Eared Treefrog). Predation. *Herpetological Review*, 43, 462.
- Hoskin, C. J., Higgie, M., McDonald, K. R., & Moritz, C. (2005). Reinforcement drives rapid allopatric speciation. *Nature*, 437(7063), 1353-1356.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2009a). Prontuario de Información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Molango de Escamilla, Hidalgo. <https://www.inegi.org.mx/> [Consultado en febrero 2023].
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2009b). Prontuario de Información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Tepehuacán de Guerrero, Hidalgo. <https://www.inegi.org.mx/> [Consultado en febrero 2023].
- International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN). (2023b). Amphibian specialist group. *Rheohyla miotympanum*, in: IUCN Red List of threatened species. <https://www.iucnredlist.org/species/55566/3030964> [Consulted in November 2023].

- International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN). (2023a). The IUCN Red List of Threatened Species. <https://www.iucnredlist.org/> [Consulted in February 2023].
- Johnson, C. N., Balmford, A., Brook, B. W., Buettel, J. C., Galetti, M., Guangchun, L., & Wilmshurst, J. M. (2017). Biodiversity losses and conservation responses in the Anthropocene. *Science*, 356(6335), 270-275.
- Johnson, M. L., & Speare, R. (2005). Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Diseases of Aquatic Organisms*, 65(3), 181-186.
- Jokela, J., Dybdahl, M. F., & Lively, C. M. (1999). Habitat-specific variation in life-history traits, clonal population structure and parasitism in a freshwater snail (*Potamopyrgus antipodarum*). *Journal of Evolutionary Biology*, 12(2), 350-360.
- Kelleher, S. R., Scheele, B. C., Silla, A. J., Keogh, J. S., Hunter, D. A., Endler, J. A., & Byrne, P. G. (2021). Disease influences male advertisement and mating outcomes in a critically endangered amphibian. *Animal Behaviour*, 173, 145-157.
- Kluger, M. J. (1977). Fever in the frog *Hyla cinerea*. *Journal of Thermal Biology*, 2, 79-81.
- Köhler, J., Jansen, M., Rodriguez, A., Kok, P. J. R., Toledo, L. F., Emmrich, M., ... & Vences, M. (2017). The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa*, 4251(1), 1-124.
- Laiolo, P. (2010). The emerging significance of bioacoustics in animal species conservation. *Biological Conservation*, 143(7), 1635-1645.
- Liew, N., Mazon Moya, M. J., Wierzbicki, C. J., Hollinshead, M., Dillon, M. J., Thornton, C. R., ... & Mostowy, S. (2017). Chytrid fungus infection in zebrafish demonstrates that the pathogen can parasitize non-amphibian vertebrate hosts. *Nature Communications*, 8(1), 15048.
- Liu, G., Kingsford, R. T., Callaghan, C. T., & Rowley, J. J. L. (2022a). Anthropogenic habitat modification alters calling phenology of frogs. *Global Change Biology*, 28(21), 6194-6208.
- Liu, N., Zhong, S., Wang, T., Li, X., Wei, L., Zou, C., ... & Li, B. (2022b). Advertisement call variation of two frog species along an urban-rural gradient in Shanghai, China. *Diversity*, 14(7), 1-12.
- Lochmiller, R. L., & Deerenberg, C. (2000). Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos*, 88(1), 87-98.
- Longcore, J. E., Pessier, A. P., & Nichols, D. K. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91(2), 219-227.
- Longo, A. V. (2018). Introducción. En A. López-Velázquez, M. Delia-Basanta & L. M. Ochoa-Ochoa (Eds.), *Quitridiomycosis en México (pp. 1-14)*. Sociedad Herpetológica Mexicana. Ciudad de México, México.
- Longo, A. V., Burrowes, P. A., & Joglar, R. L. (2010). Seasonality of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in direct-developing frogs suggests a mechanism for persistence. *Diseases of Aquatic Organisms*, 92, 253-260.
- Loyau, A., Bouchali, R., Sentenac, H., & Schmeller, D. S. (2024). The commensal skin microbiome of amphibian mountain populations and its association with the pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Environmental Microbiology*, 26(10), e16699.
- Lozano-Camelo, O. C., Rojas-Arias, A. C., Ávila-Méndez, K. J., & López-Pazos, S. A. (2022). Preservación modificada y descripción de la fungalisina para *Batrachochytrium dendrobatidis*. *LA GRANJA: Revista de Ciencias de la Vida*, 36(2), 32-44.
- Luja, V. H., Rodríguez-Estrella, R., Ratzlaff, K., Parra-Olea, G., & Ramírez-Bautista, A. (2012). The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in isolated populations of the Baja California treefrog *Pseudacris hypochondriaca curta* in Baja California Sur, Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 57(3), 323-327.
- Mann, H. B., & Whitney, D. R. (1947). On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *The Annals of Mathematical Statistics*, 18, 50-60.
- Mardia, K. V. (1970). Measures of multivariate skewness and kurtosis with applications. *Biometrika*, 57(3), 519-530.

- Martel, A., Blooi, M., Adriaensen, C., Van-Rooij, P., Beukema, W., Fisher, M. C., ... & Pasmans, F. (2014). Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science*, 346(6209), 630-631.
- Martin, L. B., Scheuerlein, A., & Wikelski, M. (2003). Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1511), 153-158.
- Medina-Vogel, G. (2010). Ecología de enfermedades infecciosas emergentes y conservación de especies silvestres. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42, 11-24.
- Meenderink, S. W., Kits, M., & Narins, P. M. (2010). Frequency matching of vocalizations to inner-ear sensitivity along an altitudinal gradient in the coqui frog. *Biology Letters*, 6(2), 278-281.
- Mendoza-Almeralla, C. M., Burrowes, P., & Parra-Olea, P. (2015). La quitridiomycosis en los anfibios de México: una revisión. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86, 238-248.
- Miller, M. W. (2006). Apparent effects of light pollution on singing behavior of American robins. *The Condor*, 108(1), 130-139.
- Mitchell, N. J. (2001). Males call more from wetter nests: effects of substrate water potential on reproductive behaviours of terrestrial toadlets. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1462), 87-93.
- Mockford, E. J., & Marshall, R. C. (2009). Effects of urban noise on song and response behaviour in great tits. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1669), 2979-2985.
- Mojica, C. (2010). Detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* (CHYTRIDIALES: CHYTRIDIOMICETES) en nueve localidades de Valle del Cauca mediante el uso de PCR. Tesis de pregrado. Universidad del Valle. Cali-Colombia.
- Muñoz-Alonso, L. A. (2010). *Riqueza, diversidad y estatus de los anfibios amenazados en el sureste de México; una evaluación para determinar las posibles causas de la declinación de las poblaciones*. Colegio de la Frontera Sur-Critical Ecosystem Partnership Fund-Arizona State University. Chiapas, México. 55 p.
- Murrieta-Galindo, R., Parra-Olea, G., González-Romero, A., López-Barrera, F., & Vredenburg, V. T. (2014). Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians inhabiting cloud forests and coffee agroecosystems in central Veracruz, Mexico. *European Journal of Wildlife Research*, 60, 431-439.
- Narins, P. M. (2001). Ectothermy's last stand: hearing in the heat and cold. In M. J. Ryan (Ed.), *Anuran communication* (pp. 61-70). Smithsonian Institution Press. Washington D. C., USA.
- Nemeth, E., & Brumm, H. (2009). Blackbirds sing higher-pitched songs in cities: adaptation to habitat acoustics or side-effect of urbanization? *Animal behaviour*, 78(3), 637-641.
- Noordzij, M., Dekker, F. W., Zoccali, C., & Jager, K. J. (2010). Measures of disease frequency: prevalence and incidence. *Nephron Clinical Practice*, 115(1), c17-c20.
- O'Hanlon, S. J., Rieux, A., Farrer, R. A., Rosa, G. M., Waldman, B., Bataille, A., ... & Fisher, M. C. (2018). Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science*, 360(6389), 621-627.
- Ohmer, M. E., Cramp, R. L., Russo, C. J., White, C. R., & Franklin, C. E. (2017). Skin sloughing in susceptible and resistant amphibians regulates infection with a fungal pathogen. *Scientific reports*, 7(1), 3529.
- Parris, K. M., Velik-Lord, M., & North, J. M. A. (2009). Frogs call at a higher pitch in traffic noise. *Ecology and Society*, 14(1), 1-24.
- Patillo, B. (2019). Investigating the impacts of the fungal pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*, on growth, behavior, and reproductive investment in salamanders. Doctoral thesis. The University of Memphis. 88 p.
- Pessier, A. P., Nichols, D. K., Longcore, J. E., & Fuller, M. S. (1999). Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and white's tree frogs (*Litoria caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11(2), 194-199.



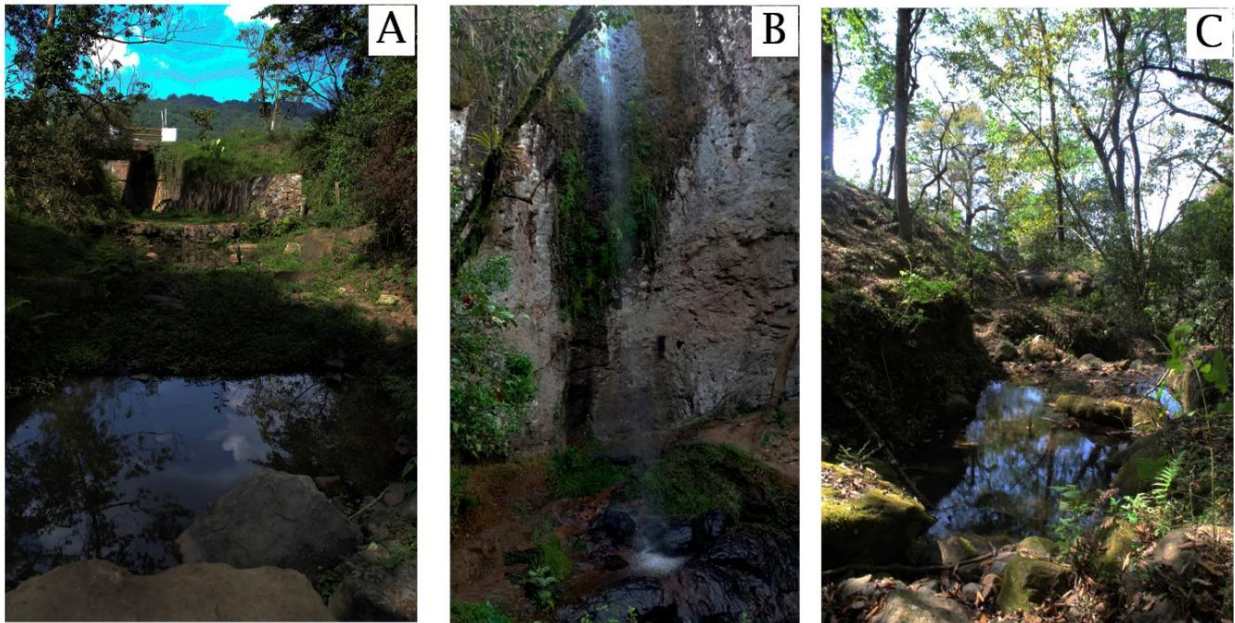
- Pfennig, K. S. (2000). Female spadefoot toads compromise on mate quality to ensure conspecific matings. *Behavioral Ecology*, *11*(2), 220-227.
- Phillott, A. D., Speare, R., Hines, H. B., Skerratt, L. F., Meyer, E., McDonald, K. R., ... & Berger, L. (2010). Minimising exposure of amphibians to pathogens during field studies. *Diseases of Aquatic Organisms*, *92*, 175-185.
- Pillsbury, F. C., & Miller, J. R. (2008). Habitat and landscape characteristics underlying anuran community structure along an urban–rural gradient. *Ecological Applications*, *18*(5), 1107-1118.
- Piotrowski, J. S., Annis, S. L., & Longcore, J. E. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, *96*(1), 9-15.
- Polak, M., & Starmer, W. T. (1998). Parasite-induced risk of mortality elevates reproductive effort in male *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *265*(1411), 2197-2201.
- Pombal, J. P., Sazima, I., & Haddad, C. F. B. (1994). Breeding behavior of the pumpkin toadlet, *Brachycephalus ephippium* (Brachycephalidae). *Journal of Herpetology*, *28*(4), 516-519.
- Ramírez-Bautista, A., Hernández-Salinas, U., Cruz-Elizalde, R., Berriozabal-Islas, C., Lara-Tufiño, D., Goyenechea Mayer-Goyenechea, I., & Castillo-Cerón, J. M. (2014). *Los anfibios y reptiles de Hidalgo, México: diversidad, biogeografía y conservación*. Sociedad Herpetológica Mexicana. Hidalgo, México. 387 p.
- Ramírez-Bautista, A., Torres-Hernández, L. A., Cruz-Elizalde, R., Berriozabal-Islas, C., Hernández-Salinas, U., Wilson, L. D., ... & Mata-Silva, V. (2023). An updated list of the Mexican herpetofauna: with a summary of historical and contemporary studies. *ZooKeys*, *1166*, 287-306.
- Ramsey, J. P., Reinert, L. K., Harper, L. K., Woodhams, D. C., & Rollins-Smith, L. A. (2010). Immune defenses against *Batrachochytrium dendrobatidis*, a fungus linked to global amphibian declines, in the South African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Infection and immunity*, *78*(9), 3981-3992.
- Retallick, R. W., & Miera, V. (2007). Strain differences in the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and non-permanent, sub-lethal effects of infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, *75*(3), 201-207.
- Richards-Zawacki, C. L. (2009). Thermoregulatory behaviour affects prevalence of chytrid fungal infection in a wild population of Panamanian golden frogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *277*(1681), 519-528.
- Roff, D. A. (2002). *Life history evolution*. Sinauer Associates, Oxford University Press. Massachusetts, USA. 527 p.
- Rollins-Smith, L. A. (2023). The importance of antimicrobial peptides (AMPs) in amphibian skin defense. *Developmental & Comparative Immunology*, *142*, 104657.
- Rollins-Smith, L. A., & Conlon, J. M. (2005). Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations. *Developmental & Comparative Immunology*, *29*(7), 589-598.
- Rollins-Smith, L. A., & Woodhams, D. C. (2012). Amphibian immunity: staying in tune with the environment. In G. E. Demas & R. J. Nelson (Eds.), *Ecoimmunology* (pp. 92–143). Oxford University Press. New York, USA.
- Rollins-Smith, L. A., Doersam, J. K., Longcore, J. E., Taylor, S. K., Shamblin, J. C., Carey, C., & Zasloff, M. A. (2002). Antimicrobial peptide defenses against pathogens associated with global amphibian declines. *Developmental & Comparative Immunology*, *26*(1), 63-72.
- Roznik, E. A., Sapsford, S. J., Pike, D. A., Schwarzkopf, L., & Alford, R. A. (2015). Condition-dependent reproductive effort in frogs infected by a widespread pathogen. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *282*(1810), 20150694.
- Ryan, M. J. (1986). Factors influencing the evolution of acoustic communication: biological constraints. *Brain, Behavior and Evolution*, *28*(1-3), 70-82.
- Rzedowski, J. (1993). Diversity and origins of the phanerogamic flora of Mexico, In T. P. Ramamoorthy, R. A. Bye, A. Lot & J. E. Fa (Eds.), *Biological diversity of Mexico: origins and distribution* (pp. 129–144). Oxford University Press. New York, USA.

- Schloegel, L. M., Toledo, L. F., Longcore, J. E., Greenspan, S. E., Vieira, C. A., Lee, M., ... & James, T. Y. (2012). Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Molecular ecology*, *21*(21), 5162-5177.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental- especies nativas de México de flora y fauna silvestre- categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- Lista de especies en riesgo, publicada el 30 de diciembre de 2010. Diario Oficial de la Federación.
- Semlitsch, R. D. (2003). *Amphibian conservation*. Smithsonian Institution Press. Washington D. C., USA. 324 p.
- Sheets, C. N., Schmidt, D. R., Hurtado, P. J., Byrne, A. Q., Rosenblum, E. B., Richards-Zawacki, C. L., & Voyles, J. (2021). Thermal performance curves of multiple isolates of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a lethal pathogen of amphibians. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*, 687084.
- Sheldon, B. C., & Verhulst, S. (1996). Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, *11*(8), 317-321.
- Slabbekoorn, H. (2004). Singing in the wild: the ecology of birdsong. In P. Marler & H. Slabbekoorn (Eds.), *Nature's music: the science of birdsong* (pp. 178-205). Elsevier Academic Press. San Diego California, USA.
- Smith, G. C. (1976). Ecological energetics of three species of ectothermic vertebrates. *Ecology*, *57*(2), 252-264.
- Sonn, J. M., Utz, R. M., & Richards-Zawacki, C. L. (2019). Effects of latitudinal, seasonal, and daily temperature variations on chytrid fungal infections in a North American frog. *Ecosphere*, *10*(11), e02892.
- Spearman, C. E. (1904). The proof and measurement of association between two things. *American Journal of Psychology*, *15*, 72-101.
- Stearns, S. C. (1992). *The evolution of life histories*. Oxford University Press. New York, USA. 264 p.
- Stebbins, R. C., & Cohen N. W. (1997). *A natural history of amphibians*. Princeton University Press. New Jersey, USA. 316 p.
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S. L., Fischman, D. L., & Waller, R. W. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, *306*(5702), 1783-1786.
- Sullivan, A. P., Bird, D. W., & Perry, G. H. (2017). Human behaviour as a long-term ecological driver of non-human evolution. *Nature Ecology & Evolution*, *1*, 0065.
- Sullivan, B. K. (1992). Sexual selection and calling behavior in the American toad (*Bufo americanus*). *Copeia*, *1992*, 1-7.
- Sullivan, B. K., Ryan, M. J., & Verrell, P. A. (1995). Female choice and mating system structure. In H. Heatwole & B. K. Sullivan (Eds.), *Amphibian biology, social behaviour (volumen 2)* (pp. 469-517). Surrey Beatty & Sons Pty Limited, Chipping Norton. New South Wales, Australia.
- Toledo, L. F., Martins, I. A., Bruschi, D. P., Passos, M. A., Alexandre, C., & Haddad, C. F. B. (2015). The anuran calling repertoire in the light of social context. *Acta ethologica*, *18*, 87-99.
- Torres-Hernández, L. A., Díaz-Marín, C. A., Eliosa-León, H. R., Mendoza-Almeralla, C., & Ramírez-Bautista, A. (2023). Aggressive behavior of *Rheohyla miotympanum* (Anura: Hylidae) in northern Hidalgo, Mexico. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, *6*(4), 169-173.
- Tubaro, P. L. (1999). Bioacústica aplicada a la sistemática, conservación y manejo de poblaciones naturales de aves. *Etología*, *7*(3), 19-32.
- Urban, M. C. (2015). Accelerating extinction risk from climate change. *Science*, *348*(6234), 571-573.
- Van-Rooij, P., Martel, A., D'Herde, K., Brutyn, M., Croubels, S., Ducatelle, R., ... & Pasmans, F. (2012). Germ tube mediated invasion of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibian skin is host dependent. *PLoS One*, *7*(7), e41481.
- Voyles, J., Berger, L., Young, S., Speare, R., Webb, R., Warner, J., ... & Skerratt, L. F. (2007). Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. *Diseases of Aquatic Organisms*, *77*(2), 113-118.

- Voyles, J., Young, S., Berger, L., Campbell, C., Voyles, W. F., Dinudom, A., ... & Speare, R. (2009). Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science*, 326(5952), 582-585.
- Vredenburg, V., & Briggs, C. (2009). Chytrid Swabbing Protocol. [https://amphibiaweb.org/chytrid/swab\\_protocol.html](https://amphibiaweb.org/chytrid/swab_protocol.html)
- Wake, D. B., & Vredenburg, V. T. (2008). Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 11466-11473.
- Welch, A. M., Semlitsch, R. D., & Gerhardt, H. C. (1998). Call duration as an indicator of genetic quality in male gray tree frogs. *Science*, 280(5371), 1928-1930.
- Weldon, C., Du Preez, L. H., Hyatt, A. D., Muller, R., & Speare, R. (2004). Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging infectious diseases*, 10(12), 2100-2105.
- Wells, K. D. (1977). The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour*, 25, 666-693.
- Wells, K. D. (2007). *The ecology and behavior of amphibians*. University of Chicago Press. London, USA. 1148 p.
- Wollerman, L. (1998). Stabilizing and directional preferences of female *Hyla ebraccata* for calls differing in static properties. *Animal Behaviour*, 55(6), 1619-1630.
- Woodhams, D. C., Rollins-Smith, L. A., Carey, C., Reinert, L., Tyler, M. J., & Alford, R. A. (2006). Population trends associated with skin peptide defenses against chytridiomycosis in Australian frogs. *Oecologia*, 146, 531-540.
- Zar, J. H. (2005). *Biostatistical Analysis*, 5th ed. Pearson. New Jersey, USA.
- Zhao, L., Santos, J. C., Wang, J., Ran, J., Tang, Y., & Cui, J. (2021). Noise constrains the evolution of call frequency contours in flowing water frogs: a comparative analysis in two clades. *Frontiers in Zoology*, 18, 1-10.
- Zhao, L., Sun, X., Chen, Q., Yang, Y., Wang, J., Ran, J., ... & Cui, J. (2018). Males increase call frequency, not intensity, in response to noise, revealing no Lombard effect in the little torrent frog. *Ecology and Evolution*, 8(23), 11733-11741.
- Ziegler, L., Arim, M., & Bozinovic, F. (2016). Intraspecific scaling in frog calls: the interplay of temperature, body size and metabolic condition. *Oecologia*, 181, 673-681.
- Ziegler, L., Arim, M., & Narins, P. M. (2011). Linking amphibian call structure to the environment: the interplay between phenotypic flexibility and individual attributes. *Behavioral Ecology*, 22(3), 520-526.
- Zweifel, R. G. (1959). Effect of temperature on call of the frog, *Bombina variegata*. *Copeia*, 1959(4), 322-327.
- Zweifel, R. G. (1968). Effects of temperature, body size, and hybridization on mating calls of toads, *Bufo a. americanus* and *Bufo woodhousii fowleri*. *Copeia*, 1968(2), 269-285.



## ANEXO I. Sitios de estudio.

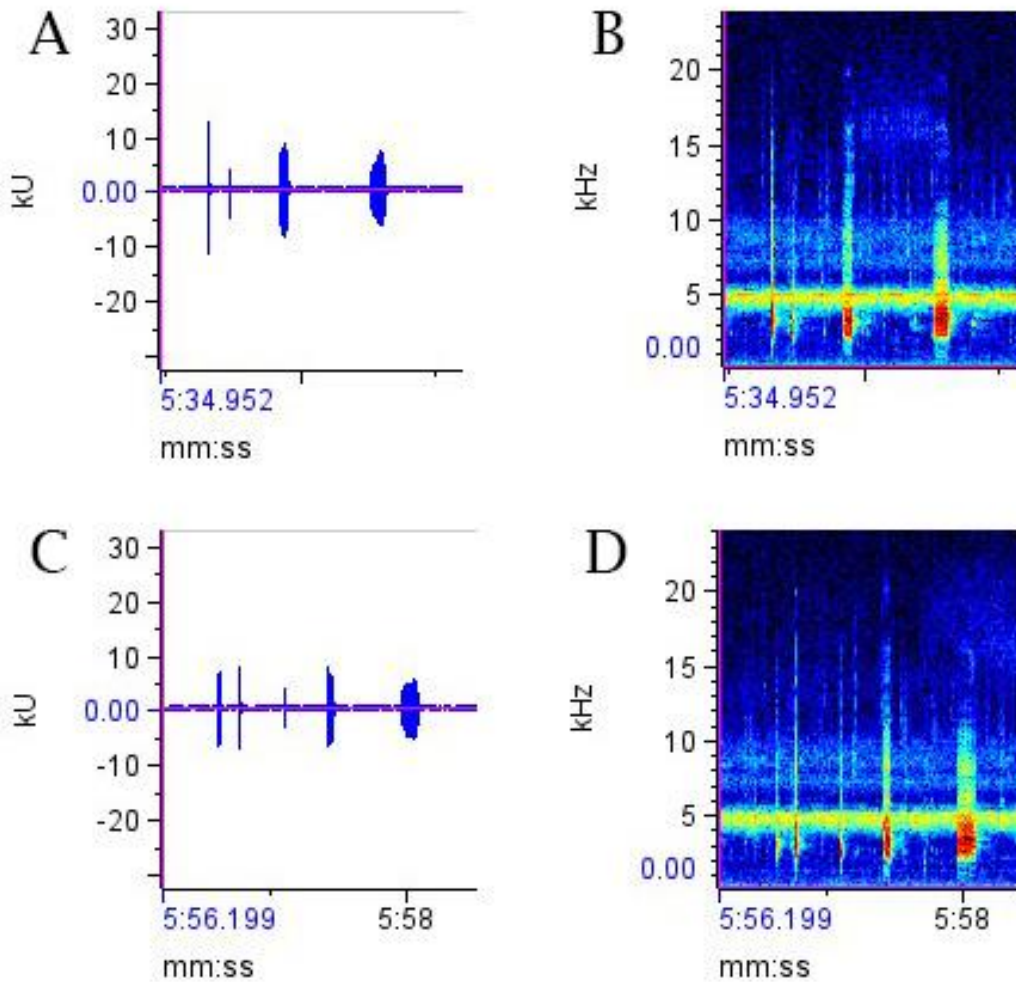


Sitios de muestreo de *Rheohyla miotympanum* en la Laguna de Atezca. A: Arroyo; B: Poza natural 1 ; C: Poza natural 2.



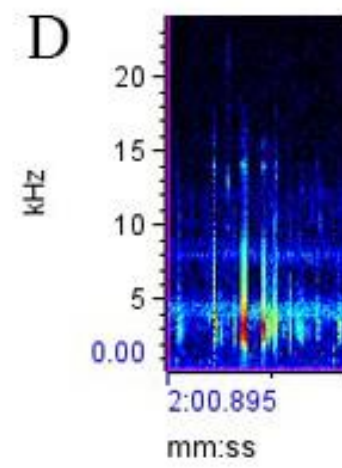
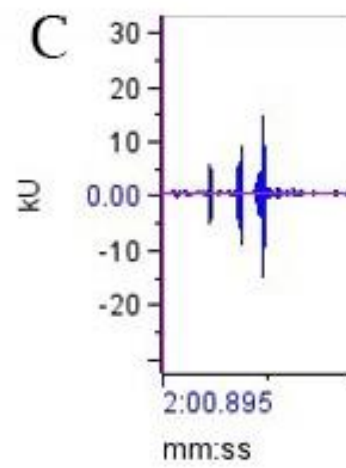
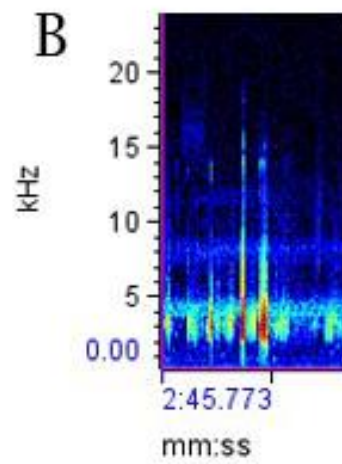
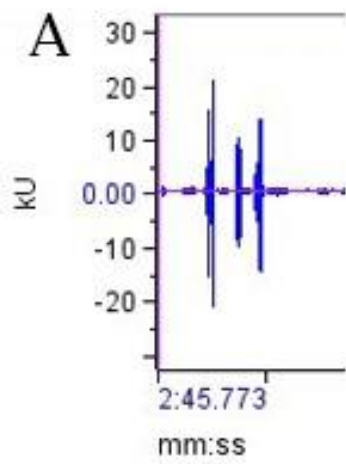
Sitio de muestreo de *Rheohyla miotympanum* en Chilijapa.

**ANEXO II.** Oscilogramas y espectrogramas del canto reproductivo de los machos de *Rheohyla miotympanum*.



Oscilogramas (A y C) y espectrogramas (B y D) del canto reproductivo de machos de *Rheohyla miotympanum* pertenecientes a la Laguna de Atezca.





Oscilogramas (A y C) y espectrogramas (B y D) del canto reproductivo de machos de *Rheohyla miotympanum* pertenecientes a Chilijapa.

**ANEXO III.** Identificación de zoosporangios de *Batrachochytrium dendrobatidis* en individuos macho de *Rheohyla miotympanum* de ambas poblaciones de estudio.

Laguna de Atezca				Chilijapa			
ID	Infección por <i>Bd</i>		No. total de zoosporangios	ID	Infección por <i>Bd</i>		No. total de zoosporangios
	Estadio 2	Estadio 3			Estadio 2	Estadio 3	
LT4	4	1	5	LT53	0	0	0
LT5	1	0	1	LT54	0	0	0
LT6	8	2	10	LT55	1	4	5
LT7	10	8	18	LT56	5	6	11
LT8	2	4	6	LT57	0	0	0
LT9	6	0	6	LT58	7	15	22
LT10	32	17	49	LT59	2	1	3
LT11	9	2	11	LT60	4	0	4
LT12	15	4	19	LT61	4	0	4
LT13	3	2	5	LT62	4	6	10
LT14	3	0	3	LT63	0	0	0
LT15	0	0	0	LT64	7	0	7
LT16	7	2	9	LT65	1	0	1
LT17	14	2	16	LT68	0	0	0
LT20	0	0	0	LT69	0	0	0
LT21	0	1	1	LT71	1	2	3
LT22	4	1	5	LT72	0	1	1
LT23	5	8	13	LT73	28	13	41
LT24	2	4	6	LT74	3	1	4
LT25	3	4	7	LT75	0	3	3
LT26	5	2	7	LT76	0	0	0
LT27	41	21	62	LT77	0	1	1
LT28	2	1	3	LT78	0	0	0
LT29	9	3	12	LT79	3	4	7
LT30	1	0	1	LT80	6	1	7
LT31	38	9	47	LT82	8	3	11
LT32	0	0	0	LT89	3	0	3
LT33	0	0	0	LT100	0	0	0
LT34	0	3	3	LT101	0	0	0
LT35	0	0	0	LT102	0	0	0

LT36	1	0	1	LT103	0	0	0
LT37	0	0	0	LT104	0	0	0
LT38	0	0	0	LT106	0	0	0
LT39	1	0	1	LT107	0	0	0
LT40	0	1	1	LT108	1	0	1
LT41	2	0	2	LT109	0	0	0
LT42	0	0	0	LT110	7	0	7
LT43	1	2	3	LT111	1	0	1
LT44	1	0	1	LT112	3	0	3
LT45	2	2	4	LT113	4	1	5
LT51	6	0	6	LT114	1	4	5
LT99	0	0	0	LT115	0	2	2
LT150	9	7	16	LT116	0	2	2
LT151	1	2	3	LT117	0	0	0
LT153	1	1	2	LT118	0	0	0
LT154	2	2	4	LT120	0	0	0
LT156	44	12	56	LT121	0	0	0
LT158	8	2	10	LT122	4	1	5
LT159	0	1	1	LT127	5	3	8
LT162	0	0	0	LT130	3	0	3
LT163	0	0	0	LT132	0	1	1
LT164	0	0	0	LT133	2	2	4
LT165	0	0	0	LT136	2	0	2
LT167	0	0	0	LT137	2	2	4
LT168	8	1	9	LT138	1	0	1
LT170	2	1	3	LT139	3	0	3
LT172	6	5	11	LT140	0	0	0
LT173	0	0	0	LT141	0	0	0
LT174	1	0	1	LT143	2	0	2
LT175	0	0	0	LT144	0	1	1
LT176	1	3	4	LT146	0	0	0
LT177	1	0	1				
LT178	1	0	1				
LT179	0	0	0				
LT180	2	1	3				

---