



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

INFLUENCIA DE LOS FACTORES
AMBIENTALES Y GEOGRÁFICOS EN
LA INCIDENCIA Y PREVALENCIA DE
LA QUITRIDIOSIS EN ANFIBIOS
DE LAS ZONAS MONTAÑOSAS DE
GUERRERO, MÉXICO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A

MARIEL FAMILIAR LÓPEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN NÚÑEZ FARFÁN

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

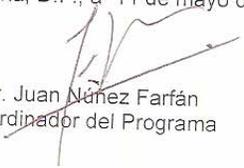
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de enero de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** de la alumna **FAMILIAR LÓPEZ MARIEL** con número de cuenta **401052561** con la tesis titulada **"INFLUENCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES Y GEOGRÁFICOS EN LA INCIDENCIA Y PREVALENCIA DE LA QUITRIDOMICOSIS EN ANFIBIOS DE LAS ZONAS MONTAÑOSAS DE GUERRERO, MÉXICO."**, realizada bajo la dirección del **DR. JUAN NÚÑEZ FARFÁN**

Presidente: DR. ENRIQUE MARTÍNEZ MEYER
Vocal: M. EN C. GEORGINA SANTOS BARRERA
Secretario: DR. JUAN NÚÑEZ FARFÁN
Suplente: DRA. HERMELINDA MARGARITA VILLEGAS RÍOS
Suplente: DR. ADRIÁN NIETO MONTES DE OCA

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 11 de mayo de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

A la Beca de CONACYT (CVU 250443)

A Idea Wild

A los Miembros del Comité Tutorial:

Dr. Juan Núñez Farfán

Dra. Hermelinda Margarita Villegas Ríos

Dr. Adrián Nieto Montes de Oca

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A M. en C. Georgina Santos Barrera por todo su apoyo.

Al Dr. Enrique Martínez Meyer por su apoyo en el modelado de nicho ecológico.

A M. en I.B.B. Rosalinda Tapia López por el apoyo técnico en la obtención de los fragmentos de ADN y por la ayuda en la logística y organización de las salidas al campo.

A mis compañeros del Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución, Instituto de Ecología, UNAM.

A Dr. Andrew Storfer y Ashley McCally por su ayuda en el procesamiento de las muestras de ADN.

A M. en C. Luis Canseco Márquez por su ayuda en la identificación de los renacuajos.

A todos los que me apoyaron en las salidas al campo (Luis, Olivia, Manuel, Cristian, Georgina, Nicolás y Gustavo).

A los pobladores del “Molote” por su hospitalidad y colaboración, en especial a la familia Barragán.

A Picach por todos esos gratos momentos a lo largo de todo este tiempo.

A Itziar por la ayuda en el análisis estadístico.

A Andrea por su ayuda con las imágenes de este trabajo.

A mis amigos de la maestría y Facultad de Ciencias (Pau-pau, Paulina, César, etc).

A mi familia por todo su apoyo.

A todas mis amigas cañeras y limoneras, y a los cañeros también, por compartir tantos buenos tiempos.

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1.0 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	5
1.1 QUITRIDOMICOSIS EN ANFIBIOS	6
1.2 MODELADO DE NICHOS ECOLÓGICOS	10
2.0 HIPÓTESIS	15
2.1 OBJETIVO GENERAL	15
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	15
3.0 MÉTODOS	16
3.1 SELECCIÓN DE LAS ÁREAS Y TEMPORADAS DE ESTUDIO	16
3.2 DESCRIPCIÓN DE LAS ÁREAS DE ESTUDIO	17
3.3 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS	19
3.4 PRIMER ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	20
3.5 SEGUNDO ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	20
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
3.7 DATOS BIOLÓGICOS Y COBERTURAS CLIMÁTICAS	23
3.8 MODELADO DE NICHOS ECOLÓGICOS	25
4.0 RESULTADOS	27
4.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO	27
4.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
4.3 MODELADO DE NICHOS ECOLÓGICOS	35

5.0 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	40
6.0 REFERENCIAS	47
7.0 ANEXO 1	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama del ciclo de vida de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .	8
Figura 2 Mapa de las localidades muestreadas para quitridiomycosis en México	9
Figura 3 Diagrama del proceso de modelado de nicho ecológico.	11
Figura 4 Mapas del área de estudio dentro del estado de Guerrero, México.	18
Figura 5 Extracción de ADN utilizando el protocolo estándar de la compañía Qiagen.	21
Figura 6 Orden de las muestras de ADN y controles en la placa de PCR de 96 pozos.	22
Figura 7 Distribución potencial actual de <i>B. dendrobatidis</i> en México.	37
Figura 8 Distribución potencial futura (escenario A1) de <i>B. dendrobatidis</i> en México.	38
Figura 9 Distribución potencial futura (escenario B2) de <i>B. dendrobatidis</i> en México.	39
Cuadro 1 Número total de muestras obtenidas por localidad en las diferentes temporadas y número total de anfibios infectados con <i>B. dendrobatidis</i> .	28
Cuadro 2 Lista de especies y localidades muestreadas para quitridiomycosis en las 4 temporadas de estudio.	29

Cuadro 3 Promedios de temperatura y humedad microambiental tomados *in situ*, en todas las temporadas de recolecta. 31

Cuadro 4 Modelo estadístico univariado lineal. Asociación entre el promedio de esporas de *B. dendrobatidis*, la temporada, la altitud, la temperatura y la humedad 34

Cuadro 5 Modelo estadístico univariado logístico. Asociación entre quitridiomycosis, temporada y altitud la temperatura y la humedad. 34

RESUMEN

El planeta está experimentando una gran crisis de biodiversidad que afecta a las poblaciones de anfibios. De hecho, en comparación con las aves y los mamíferos, los anfibios se encuentran más amenazados y presentan declinaciones más rápidas. Se calcula que el 43% de las especies de anfibios en el mundo está en un estado de declinación. Se consideran los siguientes factores como posibles responsables en las disminuciones de las poblaciones de anfibios: pérdida de hábitat (fragmentación), cambio climático, enfermedades infecciosas (quitridiomycosis), introducción de especies exóticas contaminación química, comercio y explotación. Es importante resaltar que la acción sinérgica de varios de estos factores también influye en la alta mortalidad de los anfibios.

La enfermedad conocida como quitridiomycosis es una infección de la piel causada por el hongo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis*. Este quitridio infecta las zonas queratinizadas de la piel de los anfibios adultos y las partes bucales de los renacuajos. A nivel mundial esta enfermedad infecciosa emergente afecta a por lo menos 200 especies de anfibios, siendo un factor importante en la crisis actual de la biodiversidad. Se ha registrado la presencia de este quitridio en todos los continentes donde habitan anfibios y tanto en poblaciones en cautiverio como en silvestres. Actualmente se reconoce que *B. dendrobatidis* se dispersa rápidamente a través de las poblaciones de anfibios, causa altas tasas de mortalidad y puede persistir hasta en densidades bajas del huésped. La distribución geográfica de las especies de anfibios que presentan declinaciones rápidas no es azarosa, las especies neotropicales están siendo fuertemente afectadas.

En México las poblaciones de anfibios también se encuentran declinando. En zonas donde décadas atrás se podía coleccionar u observar cientos de ejemplares ahora es difícil encontrar un solo individuo. Los registros que se tienen de la presencia y/o la sintomatología de ejemplares de anfibios probablemente infectados con *B. dendrobatidis* están en los estados de Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Sonora y Puebla.

Aunque factores ambientales parecen jugar un papel en el impacto de la quitridiomycosis en anfibios, solamente la temperatura se ha identificado como uno importante. En este proyecto se analizó la relación entre los factores temperatura, altitud y humedad, y la prevalencia de la quitridiomycosis en los anfibios de las montañas de Guerrero, México. Se seleccionaron 6 áreas de estudio en el sistema montañoso occidental de la Sierra Madre del Sur de Guerrero comprendido entre los poblados de Atoyac de Álvarez y El Jilguero. Una característica importante de las zonas elegidas como sitios de trabajo es que presentan diferentes altitudes en el intervalo comprendido entre 0 msnm y 3000 msnm. Se trabajó en 3 temporadas diferentes del año (la época fría, la época de lluvias y la época caliente). Para detectar la presencia de *B. dendrobatidis* se utilizó una técnica no invasiva y no letal que recolecta muestras de la superficie de la piel de los anfibios silvestres. Este método consiste en tomar al anfibio con guantes estériles, pasar firmemente un hisopo de algodón de hilo fino especial (estéril) por los sitios del cuerpo del organismo donde es común que se aloje el hongo. Cada hisopo se colocó en microtubos con etanol al 70%, manteniéndolos en un lugar fresco para preservar la muestra hasta poder ser almacenadas a -20°C. Los anfibios analizados en este

estudio fueron liberados después de que se les tomara la muestra. Después, se extrajo el ADN de cada muestra mediante métodos convencionales y se analizó mediante PCR TaqMan en tiempo real utilizando los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación de acuerdo al protocolo descrito por Boyle *et al.*, (2004). También se analizó la distribución potencial actual y futura de *B. dendrobatidis* en México, para poder identificar posibles áreas donde las poblaciones de anfibios podrían estar en riesgo de infección. La evaluación de la extensión potencial de la distribución de este patógeno depende, en parte, de las características de su nicho ecológico por lo que el análisis se realizó mediante el modelado de nicho ecológico utilizando los programas GARP y Maxent.

Se detectó la presencia del patógeno en 23.19% de las 539 muestras recolectadas durante las cuatro temporadas. Sin embargo, sólo se identificó en cuatro localidades de las seis muestreadas y en 125 muestras en las diferentes temporadas. Esto corresponde a una prevalencia global de quitridiomycosis del 23.19% para la zona de estudio en el estado de Guerrero. Además, se identificó el patógeno en 4 familias anfibios: Ranidae (2 especies), Eleutherodactylus (1 especie), Hylidae (4 especies) y Craugastoridae (1 especie). Es interesante notar que en todas las temporadas los sitios donde no se encontraron anfibios infectados con *B. dendrobatidis* fueron en las zonas más bajas (0 msnm) y las más altas (2500 msnm). Mientras que en las localidades con altitudes medias se detectó la presencia del patógeno en diferentes especies de anfibios. El efecto de la quitridiomycosis en una especie en particular puede depender del sitio debido a factores como la temperatura, densidad del hospedero y movimientos del agua, en sitios donde la enfermedad persiste hay tiempo para que ocurran introducciones múltiples del patógeno, además de que tiene la oportunidad de recombinar genes. Los resultados del modelado de nicho ecológico del patógeno identificó una región extensa, que comprende gran parte de la República Mexicana, con condiciones climáticas favorables para el establecimiento de dicho patógeno y, por tanto, para el desarrollo de esta enfermedad emergente de los anfibios. Las áreas más propicias para el establecimiento de este patógeno se localizan en regiones significativas de la Sierra Madre Occidental, Faja Volcánica Transmexicana, Tierras Altas de Chiapas e Istmo de Tehuantepec. En contraste, ambos modelos predicen que la mayor parte de las zonas costeras del país son regiones ecológicamente inapropiadas para el establecimiento del quitridio.

Este estudio es importante ya que nos permite entender las limitaciones ambientales de *B. dendrobatidis* fuera del laboratorio, lo que en un futuro puede ser información valiosa para la conservación de los anfibios.

El conocimiento de la distribución de *B. dendrobatidis* en México puede aportar información valiosa sobre qué especies y poblaciones de anfibios están en riesgo potencial de ser infectados por este patógeno. La identificación de áreas de riesgo podría permitir desarrollar estrategias efectivas de conservación y optimizar los recursos humanos y económicos disponibles para lograr esta meta. Para fines de conservación, las especies catalogadas en peligro de extinción o amenazadas, que son endémicas y además están restringidas a una o a unas cuantas localidades, deben tener prioridad sobre aquéllas que no están en peligro, o bien que no son endémicas o de distribución restringida.

ABSTRACT

The planet is experiencing a major biodiversity crisis that is affecting amphibian populations. In fact, compared with birds and mammals, amphibians are more threatened and have faster declines. It is estimated that 43% of amphibian species in the world are declining. The following factors are considered as possible responsible for amphibian population declines: loss of habitat (fragmentation), climate change, infectious disease (chytridiomycosis), introduction of exotic species, chemical pollution, trade and exploitation. Importantly, the synergistic action of several factors also influences the high mortality of amphibians.

The disease known as chytridiomycosis is an infection of the skin caused by the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. This chytrid infects keratinized areas of the skin of adult amphibians and mouthparts of tadpoles. This is a global emerging infectious disease that affects at least 200 species of amphibians worldwide, and remains as an important factor in the current biodiversity crisis. The presence of the chytrid has been registered in all amphibian inhabited continents in both captivity and in the wild amphibian populations. It is now recognized that *B. dendrobatidis* spreads rapidly through amphibian populations, causes high mortality rates and may persist at low host densities. The geographic distribution of amphibian species that have rapidly declined is not random; the Neotropical species are strongly affected.

In México, amphibian populations are also declining. In areas where decades ago you could collect or observe hundreds of specimens it is now difficult to find a single individual. The known records of the presence and / or the symptoms of specimens of amphibians probably infected with *B. dendrobatidis* are in the states of Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Sonora and Puebla.

Although environmental factors appear to play a role in the impact of chytridiomycosis in amphibians, only temperature has been identified as an important one. This project examined the relationship between temperature, altitude and humidity, and the prevalence of chytridiomycosis in amphibians from the mountains of Guerrero, México. We selected six study areas in the western mountain system of Sierra Madre del Sur of Guerrero between the towns of Atoyac de Alvarez and El Jilguero. An important feature of the selected areas is that they presented different altitudes in the range between 0 m and 3000 m altitude. We worked in three different seasons of the year (the cold season, the rainy season and warm season). To detect the presence of *B. dendrobatidis* we used a noninvasive and non-lethal technique that collects samples from the surface of the skin of wild amphibians. This method involves taking the amphibian with sterile gloves and passing firmly a special (sterile) cotton swab in sites in the body where it is common to host the fungus. Each swab was placed in microtubes with 70% ethanol, keeping them in a cool place to preserve the sample until it could be stored at -20 ° C. Amphibians analyzed in this study were released after we took the sample. Then DNA was extracted from each sample by conventional methods and analyzed by TaqMan real-time PCR using the primers and amplification conditions according to the protocol described by Boyle et al., (2004). We also analyzed the current and future potential distribution of *B. dendrobatidis* in Mexico

in order to identify possible areas where amphibian populations may be at risk of infection. The evaluation of the potential distribution of this pathogen depends in part on the characteristics of their ecological niche so the analysis was performed using two ecological niche modeling programs GARP and Maxent.

We detected the pathogen in 23.19% of the 539 samples collected during the four seasons. However, we only identified the pathogen in four of the six sampled locations and in 125 samples in different seasons. This corresponds to an overall prevalence of chytridiomycosis of 23.19% for the study area in the state of Guerrero. In addition, the pathogen was identified in four amphibian families: Ranidae (2 species), Eleutherodactylus (1 species), Hylidae (4 species) and Craugastoridae (1 species). Interestingly, in all seasons, the sites where no amphibians were found infected with *B. dendrobatidis* were in the lower (0 m) and highest (2500 m) areas; while the mid-altitude locations showed the presence of the pathogen in different species of amphibians. The effect of chytridiomycosis in a particular species may depend on the site due to factors such as temperature, host density and movement of water, in places where the disease persists there is time to occur multiple introductions of the pathogen, plus it has the opportunity to recombine genes.

The results of the ecological niche modeling of the pathogen identified an extensive region, which includes much of the country, with favorable climatic conditions for the establishment of the pathogen and, therefore, for the development of this emerging amphibian disease. The areas most likely for the establishment of this pathogen are found in substantial regions of the Sierra Madre Occidental, Volcanic Belt, Highlands of Chiapas and the Isthmus of Tehuantepec. In contrast, both models predicted that most of the country's coastal areas are ecologically unsuitable for the establishment of the chytrid.

This study is important because it allows us to understand the environmental constraints of *B. dendrobatidis* outside the laboratory and provides valuable information for the future conservation of amphibians. Knowledge of the distribution of *B. dendrobatidis* in Mexico can provide valuable information about which species and populations of amphibians are potentially at risk of being infected by this pathogen. Identifying areas of risk may allow the development of effective conservation strategies and optimize human and financial resources available to achieve this goal. For conservation, the species listed as endangered or threatened that are endemic and are also restricted to one or a few localities, should take precedence over those that are not in danger, or not endemic or restricted.

1.0 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El planeta está experimentando una gran crisis de biodiversidad que afecta a las poblaciones de anfibios. De hecho, en comparación con las aves y los mamíferos, los anfibios se encuentran más amenazados y presentan declinaciones más rápidas. Se calcula que el 43% de las especies de anfibios en el mundo está en un estado de declinación (Stuart *et al.*, 2004). Algunas de las evidencias de declinaciones han ocurrido en la parte occidental de Estados Unidos (Drost y Fellers, 1996), en Costa Rica (Lips *et al.*, 2003), en Australia (Berger *et al.*, 1998), en México (Lips *et al.*, 2004), en Sudamérica (Ron y Merino-Viteri, 2000), en España (Bosch *et al.*, 2000) y en Nueva Zelanda (Bishop, 2000). En algunos estudios fue relativamente sencillo asociar la disminución de las poblaciones de anfibios o su desaparición con factores antropogénicos como la deforestación, el cambio en el uso del suelo, la contaminación y la urbanización, entre otras (Santos-Barrera, 2004; Lips *et al.*, 2004). Sin embargo, las poblaciones de anfibios también declinaron en áreas prístinas o relativamente bien conservadas, como áreas naturales protegidas, lo que sugiere que las disminuciones poblacionales no están directamente relacionadas con las actividades humanas (agricultura, deforestación o contaminación) (Santos-Barrera, 2004; Lips *et al.*, 2004). En la actualidad, la mayoría de los herpetólogos coinciden en asociar a la disminución poblacional de anfibios con la pérdida de hábitat (fragmentación y cambio en el uso del suelo), cambio climático (patrones de temperatura, precipitación y radiación UV), enfermedades infecciosas (ranavirus, iridovirus y quitridiomycosis), introducción de especies exóticas (depredadores, competidores y patógenos), contaminación química (toxinas), comercio y sobreexplotación. Sin embargo, es importante resaltar que la acción sinérgica de varios de estos factores también influye en la alta mortalidad de los anfibios (Young *et al.*, 2001; Lips *et al.*, 2004; Santos-Barrera, 2004).

1.1 QUITRIDOMICOSIS EN ANFIBIOS

Los anfibios de todas las regiones biogeográficas del mundo están enfrentados a varios de los factores responsables de las disminuciones, pero el conocimiento que los científicos tienen sobre los mecanismos que subyacen las declinaciones en algunos casos son limitados. Este es el caso del cambio climático y las enfermedades infecciosas emergentes (Collins y Storer, 2003). Las enfermedades infecciosas emergentes son aquellas que han aparecido recientemente en una población o incrementado rápidamente su incidencia, virulencia o distribución geográfica (Daszak *et al.*, 2000, 2003). Una de estas enfermedades se conoce como quitridiomicosis, descubierta hace una década en diferentes poblaciones de anfibios alrededor del mundo, por lo que se considera una enfermedad emergente de rápida y reciente invasión, debido a los bajos niveles de variación genética entre muestras de hongos recolectadas a nivel mundial (Daszak *et al.*, 1999; 2003; Morehouse *et al.*, 2003). Berger y colaboradores (1998) hicieron la primera descripción morfológica de un hongo quitridio parásito de los vertebrados, posteriormente, Longcore y colaboradores (1999) lo describieron como una nueva especie; *Batrachochytrium dendrobatidis*. La quitridiomicosis es una infección de la piel causada por este hongo del orden Chytridiales. Infecta las zonas queratinizadas de la piel de los anfibios adultos y las partes orales de los renacuajos (Berger *et al.*, 1998; Longcore *et al.*, 1999). Se ha registrado la presencia de este quitridio en todos los continentes donde habitan anfibios (Weldon *et al.*, 2004) tanto en poblaciones en cautiverio como en silvestres (Boyle *et al.*, 2004). Actualmente se reconoce que *B. dendrobatidis* se dispersa rápidamente a través de las poblaciones de anfibios, causa altas tasas de mortalidad y puede persistir hasta en densidades bajas del huésped (Daszak *et al.*, 2003; Lips *et al.*, 2006). A nivel mundial esta enfermedad afecta a más de 200 especies de anfibios, siendo un factor importante en la crisis actual de su declinación (Kriger y Hero, 2007).

La quitridiomicosis desconcertó a los científicos ya que no se conocía el origen de la enfermedad, el mecanismo de muerte y el modo de dispersión (Morgan *et al.*,

2007). Sin embargo, Weldon y colaboradores (2004) propusieron al continente africano como lugar de origen del quitridio y al comercio internacional de *Xenopus laevis* como medio de disseminación. Respecto al mecanismo de acción del hongo, un estudio reciente realizado por Voyles y colaboradores (2009) sugiere que la quitridiomycosis ocasiona una interrupción en las funciones de osmoregulación de la piel de los anfibios, con el consecuente desequilibrio osmótico que lleva a un paro cardíaco.

Morfológicamente, *B. dendrobatidis* se caracteriza por presentar talos monocéntricos o coloniales, zoosporangios con una o más papilas inoperculadas de descarga y zoosporas con forma casi esférica y con 1 undulipodio posterior y liso (Longcore *et al.*, 1999). El ciclo de vida es una simple progresión de la zoospora, quiste, talo, el cual produce un solo zoosporangio (que puede dividirse para formar colonias) (Berger *et al.*, 2005). El contenido del zoosporangio (también conocido como esporangio) se diferencia en nuevas zoosporas que salen del esporangio por una o más papilas de descarga (Berger *et al.*, 2005) (Fig. 1). La mayoría de los hongos, incluyendo otros quitridios, presentan una fase sexual que precede la producción del esporangio. Sin embargo, no se ha encontrado una fase sexual o una etapa de resistencia en *B. dendrobatidis* (Morgan *et al.*, 2007). Esta enfermedad es altamente contagiosa, posiblemente debido a la naturaleza de las zoosporas las cuales se dispersan con facilidad (Longcore *et al.*, 1999; Nichols *et al.*, 2001).

Aunque algunos factores ambientales parecen jugar un papel determinante en el impacto de la quitridiomycosis en anfibios, solamente la temperatura se ha identificado como un factor importante (Berger, 2001). *B. dendrobatidis* se desarrolla en un amplio intervalo de temperaturas, en condiciones de laboratorio presenta un crecimiento mayor entre 17°C y 25°C, con un óptimo en 23°C (Longcore *et al.*, 1999; Piotrowski *et al.*, 2004). A temperaturas de 28°C o mayores, y a temperaturas menores de 10°C, *B. dendrobatidis* no crece o crece muy lentamente; por lo tanto las infecciones en esas temperaturas pueden no ser fatales debido a que el crecimiento del hongo no se ve favorecido (Piotrowski *et*

al., 2004). Este amplio intervalo de temperaturas óptimas pueden permitir que este patógeno persista en diferentes ambientes (Piotrowski *et al.*, 2004).

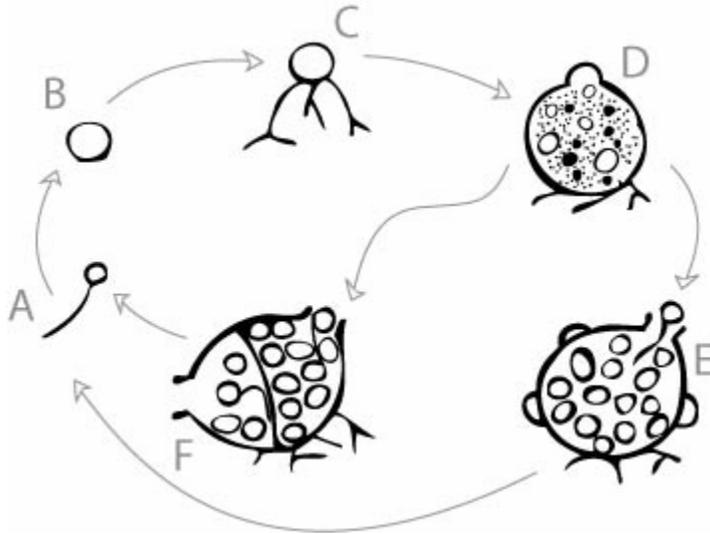


Fig. 1 Ciclo de vida de *Batrachochytrium dendrobatidis* en cultivo. **(A)** y **(B)** Después de un periodo de movilidad (generalmente de 24 h) las zoosporas se enquistan, reabsorben el flagelo y forman líneas germinales. **(C)** Los rizoides aparecen de una o más áreas. **(D)** El talo crece y se convierte en un esporangio maduro dentro de 4 a 5 días. **(E)** El contenido del talo por divisiones mitóticas se vuelve multinucleado y todo el contenido se divide en zoosporas mientras se forman los tubos de descarga. **(F)** Algunos talos se desarrollan de forma colonial con septos delgados que dividen el contenido en esporangios múltiples cada uno con su propio tubo de descarga. (Modificado de Berger *et al.*, 2005).

La distribución geográfica de las especies de anfibios que presentan declinaciones rápidas no es azarosa, las especies neotropicales están siendo fuertemente afectadas. Las zonas tropicales son áreas que albergan un gran número de especies de anfibios y están experimentando declinaciones y extinciones de sus poblaciones (Stuart *et al.*, 2004). En particular, los anfibios de Latinoamérica están bajo fuertes amenazas de extinción (Lips *et al.*, 2005).

México es un país con una alta biodiversidad debida en gran medida a su riqueza de ambientes, su topografía, su variedad de climas, su historia geológica y su diversidad biogeográfica. Además, México ocupa el quinto lugar de anfibiafauna en Latinoamérica (Young *et al.*, 2004; Ochoa-Ochoa y Flores-Villela, 2006).

Oficialmente se conocen 361 especies de anfibios en el país (Flores-Villela y Canseco-Márquez, 2004), aunque constantemente el número de especies está incrementando debido al continuo trabajo taxonómico realizado.

En México las poblaciones de anfibios también se encuentran declinando. En zonas donde décadas atrás se podía coleccionar u observar cientos de ejemplares ahora es difícil encontrar un solo individuo (Parra-Olea *et al.*, 1999). Además, es importante destacar que casi no existen registros documentados de declinación en México, la mayoría son indirectos o bien anécdotas (Lips *et al.*, 2004). Los registros que se tenían hasta el 2007 de la presencia y/o la sintomatología de ejemplares de anfibios probablemente infectados con *B. dendrobatidis* en México, se localizaban dentro de los estados de Guerrero (Lips *et al.*, 2004), Oaxaca (Lips *et al.*, 2004), Chiapas (Lips *et al.*, 2004), Sonora (Hale, 2001) y Puebla (Santos-Barrera, 2004). En un trabajo reciente Frías-Alvarez y colaboradores (2008) detectaron la presencia de *B. dendrobatidis* en siete estados de la República Mexicana: Distrito Federal, Estado de México, Guerrero, Michoacán, Morelos, Oaxaca y Puebla (Fig.2).

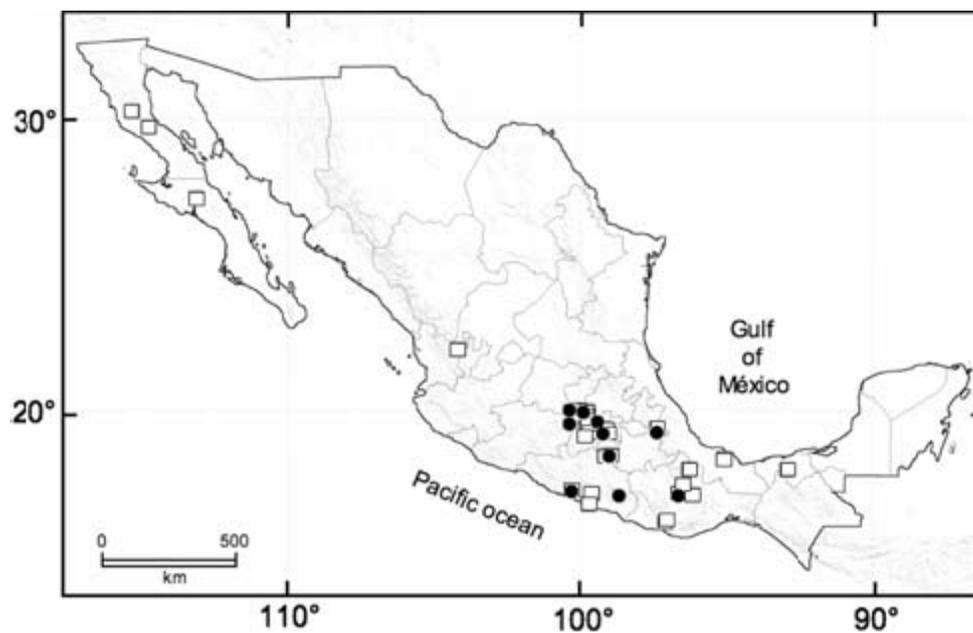


Fig. 2 Localidades muestreadas para quitridiomycosis; círculos negros representan localidades con presencia de *B. dendrobatidis* y cuadros blancos localidades muestreadas en donde no se detectó la presencia de *B. dendrobatidis* (tomado de Frías-Alvarez *et al.*, 2008).

La distribución de *B. dendrobatidis* ha sido modelada en diferentes estudios. En uno de ellos se encontró que la prevalencia de la quitridiomycosis estaba significativamente asociada con la estacionalidad y la altitud (McDonald *et al.*, 2005). Otros estudios sugieren que las zonas de elevaciones medias y altas proveen las temperaturas ideales para el desarrollo de *B. dendrobatidis*, por lo que las comunidades de anfibios que habiten en esas localidades son más susceptibles a la infección (Daszak *et al.*, 2003; Drew *et al.*, 2006). Estas investigaciones están muy relacionadas con un trabajo previo en el que se propuso un modelo teórico acorde a los datos de la literatura (Longcore *et al.*, 1999; Piotrowski *et al.*, 2004) sobre el comportamiento y preferencias de temperatura de *B. dendrobatidis* en dos regiones montañosas del sureste de México, una en Guerrero y otra en Oaxaca (Familiar López, 2007). Los resultados de este estudio también sugieren que las zonas elevadas son sitios con condiciones de temperatura ideales para el desarrollo de *B. dendrobatidis*.

1.2 MODELADO DE NICHOS ECOLÓGICOS

La hipótesis de modelado de nicho ecológico, bioclimático o de coberturas climáticas, dependen conceptualmente de la teoría de nicho ecológico (Soberón y Peterson 2005). Aunque este concepto tiene varias definiciones, Hutchinson (1957) definió el término de hipervolumen como el nicho fundamental del ámbito total de posibilidades (en espacio ecológico) donde puede persistir una población. Sin embargo, en la mayoría de los casos las interacciones bióticas negativas (competencia o depredación) impiden a las especies ocupar por completo su nicho fundamental, por lo que la porción del nicho fundamental que efectivamente ocupa una especie en espacio geográfico se conoce como el nicho realizado (Hutchinson, 1957). En un ejercicio de modelado, dependiendo de la naturaleza de los datos biológicos de entrada (sólo presencia vs. ausencia/presencia), el modelo resultante puede reflejar el nicho fundamental, el nicho realizado o la distribución actual de una especie. Sin embargo, varios autores argumentan que en el

modelado de nicho ecológico en general lo que se obtiene se acerca más al nicho fundamental de la especie (Martínez-Meyer, 2005).

El modelado de nicho ecológico utiliza principalmente datos georeferidos de presencia o presencia/ausencia de especies en combinación con mapas digitales que representan parámetros ambientales, para crear modelos de los requerimientos ecológicos de las especies (conjunto de condiciones adecuadas y necesarias para la supervivencia a largo plazo de las poblaciones de las especies sin tomar en cuenta la migración) (Martínez-Meyer, 2005). Es decir, estos métodos construyen modelos de nicho ecológico basados en los valores de las variables ambientales (dimensiones de nicho) de las localidades conocidas de presencia de la especie en cuestión (Peterson, 2003). Una vez obtenido el modelo de nicho, éste se proyecta a un espacio geográfico para identificar las regiones donde es probable la presencia de la especie (debido a que se encuentran las variables ambientales requeridas por ella) pero no se ha encontrado aún o dónde podría establecerse después de dispersarse (Ron, 2005) (Fig. 3).

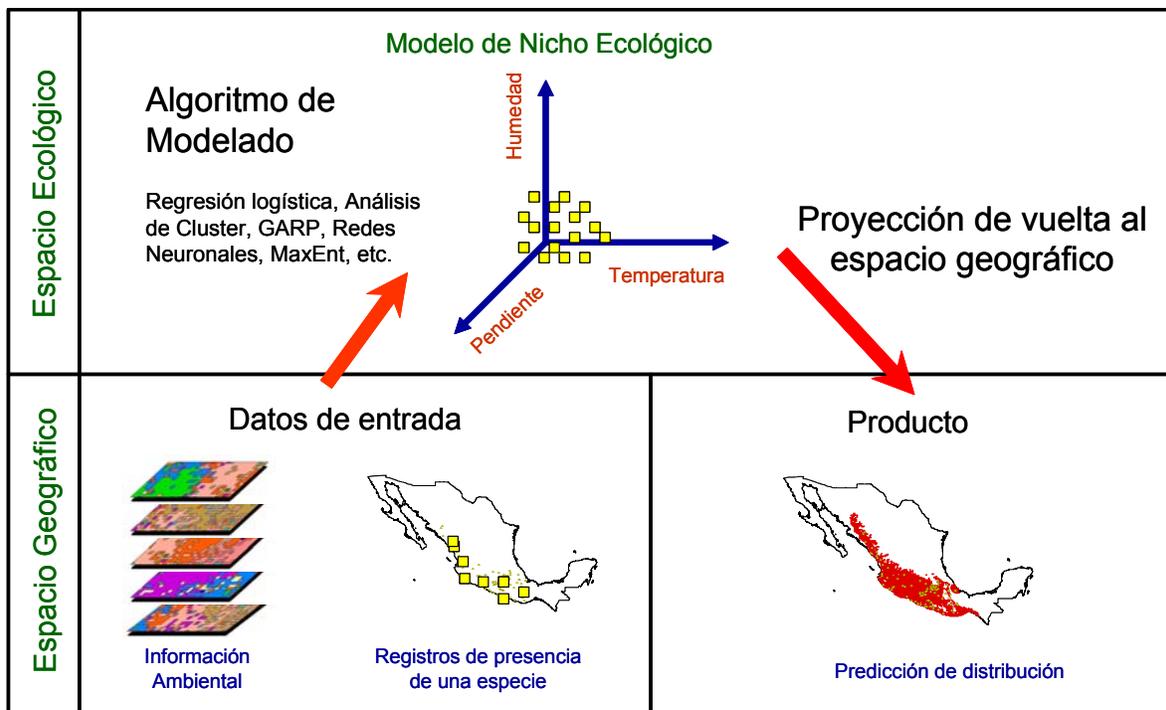


Fig. 3 Diagrama del proceso de modelado de nicho ecológico (Tomado de Martínez-Meyer, 2005)

Estas herramientas han probado ser altamente precisas en la predicción de las distribuciones en las cuales una especie exótica invasiva puede establecerse o para predecir el comportamiento de una invasión (Peterson *et al*, 2003). Esto se logra porque la evaluación de la extensión potencial de la distribución de un patógeno depende, en parte, de las características de su nicho ecológico (Ron, 2005). Este enfoque se basa en el concepto de nicho ecológico fundamental, mencionado anteriormente, el cual restringe la distribución potencial de una especie ya que ésta podrá establecer poblaciones sólo en las áreas donde coincidan el juego de condiciones ambientales a las cuales están limitadas en sus áreas de distribución nativa. Estas aproximaciones se han utilizado para una gran variedad de especies invasoras. Recientemente se han desarrollado varios modelos de nicho ecológico para predecir las áreas ecológicamente apropiadas para el establecimiento de especies invasoras (Peterson, 2003; Peterson y Robins, 2003; Peterson *et al*, 2003).

En los últimos años se han desarrollado varios algoritmos para realizar el modelado de nicho ecológico. Algunos algoritmos de modelado de nicho incluyen *Biomapper*, *Desktop GARP*, *FloraMap*, *BIOCLIM*, *DOMAIN*, *Maxent*, entre otros (Martínez-Meyer, 2005).

En *Desktop GARP (Genetic Algorithm for Rule-set Prediction)* los algoritmos genéticos desarrollan reglas para elaborar modelos de nicho por un proceso análogo a la selección natural. El programa GARP evalúa las asociaciones no azarosas entre las características ambientales de las localidades de presencia *versus* aquellas de la región de estudio total, para producir un conjunto de reglas heterogéneas que caracterizan los requisitos ecológicos de la especie en cuestión (Peterson y Cohoon, 1999). Posteriormente, busca sitios con estas condiciones ecológicas en un escenario geográfico produciendo así un mapa de presencia/ausencia potencial de la especie a través de todo el paisaje (Stockwell y Noble 1992; Stockwell y Peters 1999). GARP es un sistema que ha demostrado una excelente habilidad predictiva para delinear los nichos ecológicos de las especies y predecir sus distribuciones geográficas (Peterson, 2001). Además, este algoritmo es un método robusto para el modelado del nicho ecológico,

particularmente cuando los registros de la presencia de la especie son fragmentarios (Navarro *et al.*, 2003). El método Maxent (*Maximum entropy*) realiza predicciones o inferencias a partir de información incompleta y se basa en la mecánica estadística. En términos generales, este programa estima la probabilidad de distribución encontrando la probabilidad de distribución con máxima entropía (que esté más dispersa o cercana a estar uniforme), sujeta a una serie de limitaciones que representan nuestra información incompleta de la distribución que queremos conocer. Por lo que el algoritmo *Maxent* también permite predecir distribuciones potenciales con registros de presencia de la especie en cuestión, dando como resultado mapas en un espacio geográfico. Además también ha probado ser un algoritmo con buena predicción (Phillips *et al.*, 2006; Elith *et al.*, 2006).

El modelado predictivo del nicho ecológico o de la distribución geográfica de las especies basado en las condiciones ambientales de los sitios conocidos de ocurrencia es una herramienta importante en las biología analítica, con aplicaciones en conservación y planeación de reservas, ecología, evolución, epidemiología, manejo de especies invasoras, entre otros campos de estudio (Anderson y Martínez-Meyer, 2004; Chefaoui *et al.*, 2004; Peterson, 2003; Peterson y Robin, 2003; Peterson y Shaw, 2003; Peterson y Holt, 2003; Peterson *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2006; Sánchez-Cordero *et al.*, 2005;).

En este proyecto se analizó la relación entre los factores ambientales y geográficos, tales como la temperatura y altitud, y la prevalencia de la enfermedad causada por el *B. dendrobatidis* en los anfibios de las montañas de Guerrero, México. La contribución del presente estudio es que nos permite entender las limitaciones ambientales de *B. dendrobatidis* fuera del laboratorio, lo que en un futuro puede ser información valiosa para la conservación de los anfibios. También se analizó la distribución potencial (actual y futura) de *B. dendrobatidis* en México, así como las condiciones ambientales asociadas a ésta, para poder identificar posibles poblaciones que estén en riesgo de infección y generar las estrategias de conservación pertinentes. Como la evaluación de la extensión potencial de la

distribución de este patógeno depende, en parte, de las características de su nicho ecológico (Ron, 2005), el análisis se realizó mediante el modelado de su nicho ecológico.

2.0 HIPÓTESIS

La temperatura y altitud influyen en la distribución geográfica de *Batrachochytrium dendrobatidis*.

2.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la asociación de dos variables ambientales en el desarrollo de los brotes de quitridiomycosis en anfibios de seis sitios en Guerrero y modelar la distribución potencial de esta infección en México.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

2.2.1 Analizar la asociación entre la temperatura estacional y la prevalencia de la quitridiomycosis en seis sitios del estado de Guerrero.

2.2.2 Evaluar la asociación entre la altitud y la prevalencia de la quitridiomycosis en los seis sitios del estado de Guerrero.

2.2.3 Examinar una posible tendencia taxonómica por familia de las especies de anfibios infectadas con *Batrachochytrium dendrobatidis* en dichos sitios.

2.2.4 Modelar el escenario potencial actual y futuro de la distribución del patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* en la República Mexicana.

3.0 MÉTODOS

3.1 SELECCIÓN DE LAS ÁREAS Y TEMPORADAS DE ESTUDIO

Se seleccionaron seis áreas de estudio dentro del estado de Guerrero por presentar características apropiadas para lograr los objetivos de este proyecto. En primer lugar, el estado posee una gran riqueza herpetofaunística; se han registrado 70 especies de anfibios, de las cuales 48 (21%) son endémicas (Pérez-Ramos *et al.*, 2000). En la actualidad el número de especies de la herpetofauna del estado es de 270 (Pérez-Ramos *et al.*, 2000; Ochoa-Ochoa y Flores-Villela, 2006). En segundo lugar, en estudios recientes se ha detectado la sintomatología y/o presencia del patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* en poblaciones de anfibios que habitan este estado (Lips *et al.*, 2004; Frías-Alvarez *et al.*, 2008).

La selección de los seis sitios de trabajo se realizó mediante una salida preliminar (del 12 al 19 de abril del 2008) al sistema montañoso occidental de la Sierra Madre del Sur de Guerrero, comprendido entre los poblados de Atoyac de Álvarez y El Jilguero. Las zonas elegidas como sitios de trabajo están en un gradiente altitudinal comprendido entre 0 msnm y 3000 msnm.

Por otro lado, se determinó trabajar en tres temporadas diferentes del año, que incluyeron la época fría, determinada como la temporada en la cual los meses registran una temperatura máxima promedio más baja; la época de lluvias, determinada por los meses donde se registran las mayores precipitaciones al año y la época caliente del año, determinada por los meses en donde se registran temperaturas promedio máximas. Por lo tanto, de acuerdo con resultados de un estudio anterior (Familiar López, 2007) y con los datos del Servicio Meteorológico Nacional (SMN), las recolectas se llevaron a cabo en los meses enero (temporada de frío), agosto (temporada de lluvias) y marzo (temporada de secas). La selección de las temporadas está asociada con el hecho de que la temperatura es un factor importante en el impacto de la quitridiomicosis en los anfibios (Berger, 2001).

Aunque se trabajó en 3 temporadas del año, realizaron cuatro salidas, 2 en temporadas de lluvias, una en temporada de frío y una en temporada de secas.

La primera salida de este proyecto se llevó a cabo en las fechas del 9 al 15 de agosto del 2008, por lo que los datos obtenidos se analizaron como parte de la primera temporada de lluvias en esta zona. La segunda salida se llevó a cabo del 16 al 22 de enero de 2009, formando parte de la temporada de frío. La tercera salida se realizó del 19 al 23 de marzo del mismo año, por lo que los datos obtenidos se evaluaron como parte de la temporada de secas. La cuarta salida se llevó a cabo del 20 al 24 de agosto del 2009, por lo que los datos corresponden a la segunda temporada de lluvias.

3.2 DESCRIPCIÓN DE LAS ÁREAS DE ESTUDIO

Las seis áreas de estudio están localizadas a una altitud específica en el gradiente de 0 msnm a 2500 msnm, con intervalos de 500 msnm en el sistema montañoso occidental de la Sierra Madre del Sur de Guerrero. Las localidades seleccionadas son las siguientes (Fig. 4):

(a) Localidad 1: Estero “El Plan” costa del Pacífico municipio Tecpan de Galeana, altitud de 0 msnm (coordenadas: longitud: -100.730472, latitud: 17.1800556).

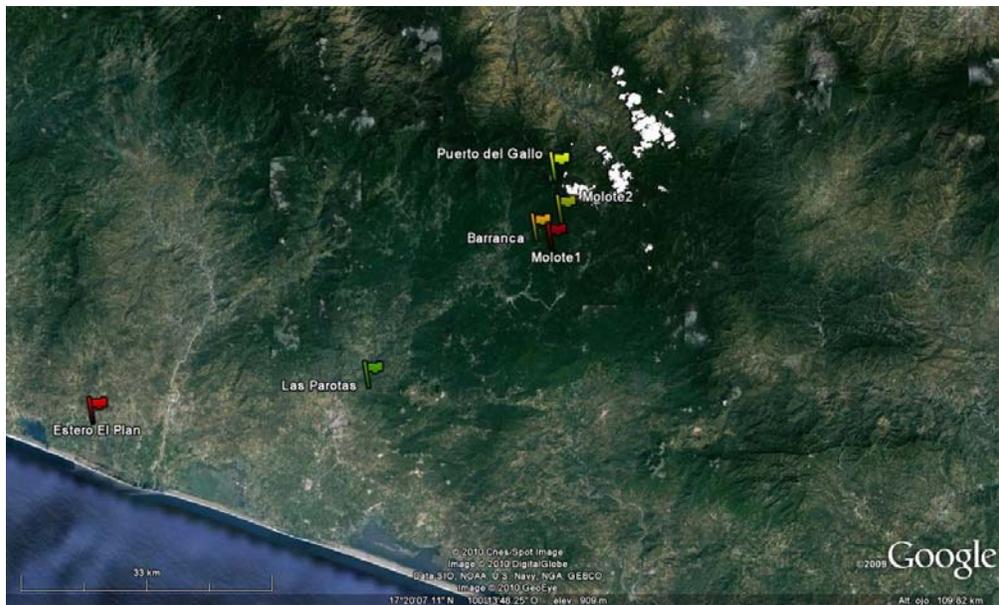
(b) Localidad 2: Poblado “Rincón de las Parotas” municipio Atoyac de Alvarez, altitud de 500 msnm (coordenadas: longitud: -100.390083, latitud: 17.2445556). Aquí existe un río permanente que cruza el poblado.

(c) Localidad 3: Barranca ubicada sobre la carretera Atoyac de Alvarez-Puerto del Gallo municipio Atoyac de Alvarez, altitud de 1000 msnm (coordenadas: longitud: -100.190833, latitud: 17.4050556). Aquí también existe un río permanente.

(d) Localidad 4: Poblado “El Molote” (Molote 1) municipio Atoyac de Alvarez, bajando por la carretera que sale del poblado hasta una altitud de 1500 msnm (coordenadas: longitud: -100.173361, latitud: 17.3933889).

(e) Localidad 5: Poblado “El Molote” (Molote 2) municipio Atoyac de Alvarez, subiendo por un camino rural hasta una altitud de 2000 msnm (coordenadas: longitud: -100.1625, latitud: 17.4227222).

(f) Localidad 6: Terminando el poblado “Puerto del Gallo” municipio General Heliodoro Castillo, altitud de 2500 msnm (coordenadas: longitud: -100.169778, latitud: 17.4675278).



(a)



(b)

Fig. 4 Mapas del área de estudio dentro del estado de Guerrero; (a) imagen satelital de los seis sitios seleccionados para los muestreos, (b) ubicación de las carreteras y poblados cercanos a las seis localidades de estudio.

3.3 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Para detectar la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* se utilizó una técnica no invasiva y letal que recolecta muestras de la superficie de la piel de los anfibios silvestres, ya que el patógeno se aloja en las partes queratinizadas de la misma. Este método consiste en tomar al anfibio con guantes estériles, pasar firmemente un hisopo de algodón de hilo fino especial (estéril) por los sitios del cuerpo del organismo donde es común que se aloje el hongo. A cada individuo se le pasó 30 veces el hisopo. En el caso de individuos adultos las muestras se tomaron de la piel del vientre, ingles y los dígitos de manos y pies, mientras que para los renacuajos se tomaron de las partes orales. Cada hisopo se colocó en microtubos con etanol al 70%, manteniéndolos en un lugar fresco para preservar la muestra hasta poder ser almacenadas a -20°C (Hyatt *et al.*, 2007; Brem *et al.*, 2007). Los anfibios muestreados en este estudio fueron liberados después de que se les tomara la muestra.

El ADN de cada muestra se extrajo mediante métodos convencionales y se analizó mediante PCR TaqMan en tiempo real, utilizando los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación de acuerdo al protocolo propuesto por Boyle *et al.*, (2004), el cual se describe de manera general en la siguiente sección de este trabajo. Esta técnica de PCR es actualmente el mejor método disponible para la detección de *B. dendrobatidis* ya que es muy sensible y rápido, además de que permite analizar varias muestras recolectadas en el campo al mismo tiempo. Asimismo, este método tiene la ventaja de poder detectar infecciones leves y se puede cuantificar el ADN del quitridio para conocer el grado de la infección (Brem *et al.*, 2007). Posteriormente se analizaron los resultados con el programa estadístico STATA versión 10.1 para determinar si existe una asociación entre la temperatura y la prevalencia de la enfermedad (Stata Corp 2007).

Es importante mencionar que en cada localidad muestreada al momento de la recolecta de las muestras de piel de anfibios se midió la temperatura y la humedad del sitio con ayuda de un termohigrómetro. Esta acción se llevó a cabo para poder

relacionar la temperatura y la humedad microambiental con la prevalencia de la enfermedad.

3.4 PRIMER ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Las muestras recolectadas en la primera temporada de lluvias fueron enviadas al Laboratorio de Enfermedades de Fauna Silvestre en la División CRES (*Conservation and Research for Endangered Species*) en el Zoológico de San Diego, en Estados Unidos de Norteamérica, con el investigador patólogo Allan Pessier para su procesamiento.

3.5 SEGUNDO ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

El análisis de las muestras recolectadas en las otras tres temporadas (frío, secas y lluvias 2) se llevó a cabo en el laboratorio de Dr. Andrew Storfer, en la Universidad Washington State, Pullman, Estados Unidos de Norteamérica, con la asistencia técnica de Ashley McCally.

En primer lugar, se extrajo el ADN de cada hisopo que contiene el raspado o frotis de la piel de los anfibios. Como las muestras se encontraban en etanol, primero se evapora éste utilizando una centrífuga de vacío. Después se utilizó un amortiguador de lisis de ADN para resuspender la muestra de células colectadas, se adicionó proteinasa K y se dejó incubando toda la noche a 50°C. Posteriormente se siguió el protocolo estándar de extracción de ADN de la compañía Qiagen (*DNeasy Blood & Tissue Handbook 07/2006*). Los pasos que incluye este protocolo son: utilizar cuatro soluciones amortiguadoras para lograr la extracción final del ADN, centrifugando entre cada adición (Fig. 5). Las muestras de ADN obtenidas se cuantificaron individualmente en un equipo Nanodrop.

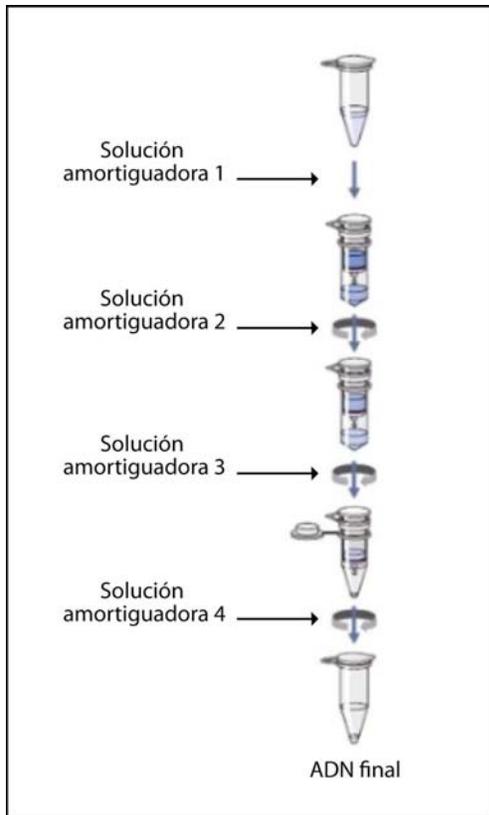


Fig. 5 Extracción de ADN utilizando las cuatro soluciones amortiguadoras del protocolo estándar de la compañía Qiagen.

Después se analizaron mediante PCR TaqMan en tiempo real utilizando los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación de acuerdo al protocolo descrito por Boyle *et al.*, (2004). Las reacciones de PCR consisten en 5 μ l de ADN templado y 20 μ l de Master Mix (Taqman master mix, oligonucleótido sentido, oligonucleótido antisentido, sonda MGB y agua nanopura). Estas reacciones se prepararon por triplicado para cada muestra de ADN analizada y se colocaron en placas de 96 pozos. En cada placa de PCR se incluyeron reacciones control conteniendo ADN de 100, 10, 1 y 0.1 equivalentes de genoma de *B. dendrobatidis* y un control negativo sin ADN (Fig. 6). Las condiciones de amplificación fueron 50 ciclos de 2 min a 50°C y 10 min a 95°C, seguidos por 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C. Las placas se corrieron en equipo Applied Biosystems, modelo 7300 Real Time PCR System. Las muestras en las que se detectó por triplicado el ADN de *B. dendrobatidis* fueron consideradas positivas, en contraste se consideraron

negativas las muestras con ausencia de *B. dendrobatidis* por triplicado. Las muestras que no presentaron por triplicado el resultado (negativo o positivo) se volvieron a analizar hasta confirmar por triplicado si eran positivas o negativas.

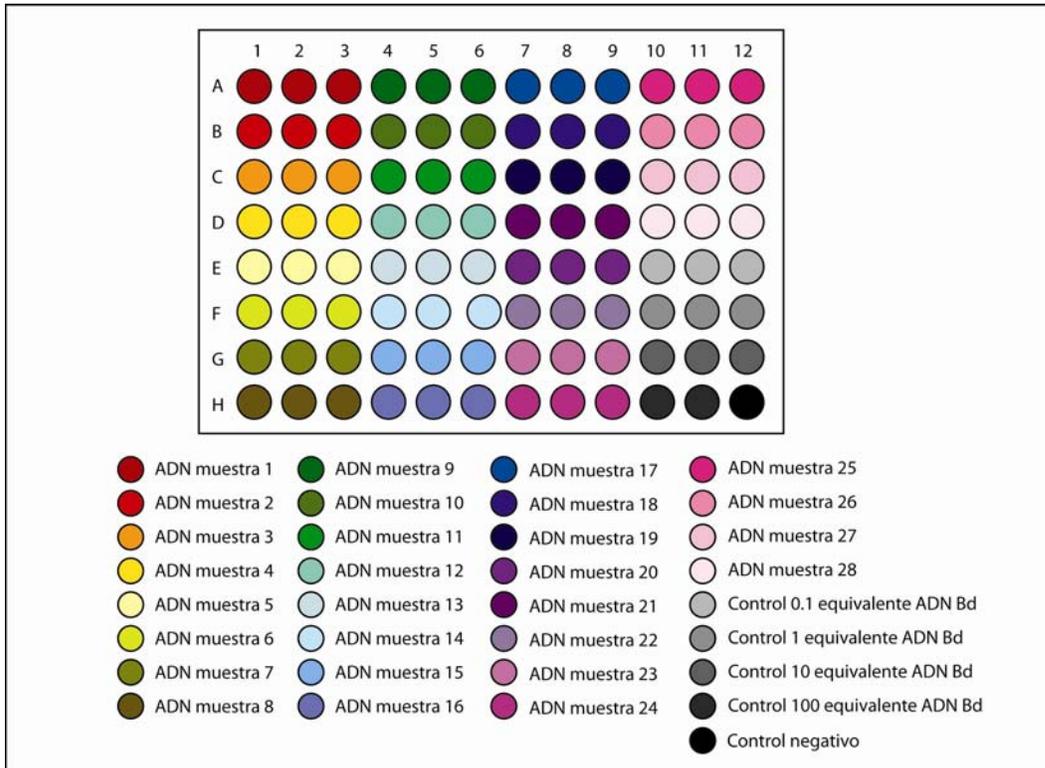


Fig. 6 Orden de las muestras de ADN y controles en la placa de PCR de 96 pozos.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis descriptivo de todas las variables de las muestras colectadas en los seis sitios de estudio durante las cuatro temporadas para detectar la distribución y frecuencia. La cuantificación promedio de esporas de *Batrachochytrium dendrobatidis* y la presencia o ausencia de quitridiomycosis fueron utilizadas como variables dependientes. Debido al gran número de especies de anfibios muestreadas en diferentes temporadas y altitudes y a los pequeños tamaños de muestras de cada una, el análisis por especie de anfibio no fue factible por lo que se tomó a todas las especies como una población conjunta. La prevalencia de la enfermedad se calculó dividiendo el número de anfibios

positivos para *B. dendrobatidis* entre el número total de anfibios muestreados. El análisis multivariado se basó en modelos de regresión lineal para la variable continua (cuantificación promedio de esporas de *B. dendrobatidis*) y de regresión logística para la variable dicotómica (quitridiomycosis). En ambos casos (lineal y logística) se utilizaron la altitud, la temporada, la humedad, la temperatura y las diferentes especies de anfibios como covariables. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa STATA versión 10.1 (*Stata Corp* 2007).

3.7 DATOS BIOLÓGICOS Y COBERTURAS CLIMÁTICAS

Los datos de las localidades donde se ha detectado la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en México, Centro América y Estados Unidos de Norteamérica se obtuvieron de artículos científicos (Berger *et al*, 1998; Bradley *et al*, 2002; Frías-Alarez *et al*, 2008; Green *et al*, 2005; Hale, 2001; Lips *et al*, 2003; Mendelson III *et al*, 2004; Muths *et al*, 2008; Puschendorf *et al*, 2006a; Puschendorf *et al*, 2006b; Santos-Barrera, 2004) y de comunicaciones personales de investigadores en el área. Estos datos se consideraron como los datos biológicos con los que se realizó una base en Excel (Microsoft 2001), que posteriormente se utilizó en los programas de modelado de nicho ecológico. Se obtuvieron un total de 134 localidades con presencia del patógeno en dichos países de América pero se utilizaron 43 de estos datos al ser espacialmente únicos (Anexo 1).

Como espacio geográfico actual se utilizaron las coberturas climáticas de WorldClim (Hijmans *et al.*, 2006; www.worldclim.org) a una resolución de 1km. Estas capas climáticas incluyen las siguientes 19 variables ambientales: (BIO1) temperatura promedio anual, (BIO2) promedio de variación diurna, (BIO3) isothermalidad, (BIO4) estacionalidad de la temperatura, (BIO5) temperatura máxima del mes más caliente, (BIO6) temperatura mínima del mes más frío, (BIO7) variación de la temperatura anual, (BIO8) temperatura promedio trimestre más húmedo, (BIO9) temperatura promedio trimestre más seco, (BIO10)

temperatura promedio trimestre más caliente, (BIO11) temperatura promedio trimestre más frío, (BIO12) precipitación anual, (BIO13) precipitación del mes más húmedo, (BIO14) precipitación del mes más seco, (BIO15) estacionalidad de la precipitación, (BIO16) precipitación del trimestre más húmedo, (BIO17) precipitación del trimestre más seco, (BIO18) precipitación del trimestre más caliente y (BIO19) precipitación del trimestre más frío.

En el caso de las coberturas ambientales futuras se utilizaron dos escenarios diferentes, uno conservador (B2) y otro más severo o extremo (A1), ambos con una resolución de 1Km. Estos escenarios de cambio climático se adquirieron del SRES (*Special Report on Emissions Scenarios*) del Panel Intergubernamental de Cambio Climático (Nakicenovic *et al.*, 2000), los cuales corresponden al modelo de circulación general CGCM2 elaborados por el *Canadian Centre for Climate Modelling and Analysis* (Flato *et al.*, 2000).

Los investigadores del SRES definieron cuatro grupos de escenarios futuros (A1, A2, B1 y B2). Cada uno describe las relaciones entre las fuerzas que conducen a los gases de efecto invernadero y las emisiones de aerosol y su evolución en el siglo XXI globalmente y para grandes regiones del planeta. Cada escenario representa diferentes desarrollos demográficos, sociales, económicos, tecnológicos y ambientales que divergen irreversiblemente de manera creciente. El escenario A1 describe un mundo futuro con un crecimiento económico muy rápido, una población global que alcanza su máximo a mediados de siglo y que declina después y una introducción rápida de tecnologías nuevas y más eficientes. En contraste, el escenario B2 describe un mundo en el cual el énfasis reside en soluciones locales para una sustentabilidad económica, social y ambiental, con una población (menor que en A2) en aumento continuo y desarrollo económico intermedio (Nakicenovic *et al.*, 2000).

El manejo de la información del espacio geográfico, actual y futuro, se hizo utilizando el programa ArcView 3.2 (ESRI, 2000).

3.8 MODELADO DE NICHOS ECOLÓGICOS

Para modelar la distribución potencial de *Batrachochytrium dendrobatidis*, tanto actual como en diferentes escenarios del futuro, se utilizaron dos programas de modelado de nicho ecológico: *Desktop GARP* (*Genetic Algorithm for Rule-Set Prediction*) (Stockwell y Noble 1992; Stockwell y Peters 1999). y *Maxent* (*Maximum Entropy*) (Phillips *et al.*, 2006).

La interfase de *Desktop GARP* tiene dos componentes *Dataset Manager* y *Desktop GARP*. En primer lugar se utilizó el módulo de *Dataset Manager* para preparar las capas ambientales (actuales y futuras) que se emplearon en el modelado. Para esto se exportan todos los archivos de formato ASCII, que equivalen a todas las coberturas ambientales a utilizar, al *Dataset Manager* creando un archivo de tipo DXL. Es indispensable utilizar primero el *Dataset Manager* ya que es el manejador de datos del programa GARP que permitirá el uso de las coberturas climáticas para realizar los modelos de distribución potencial.

Para elaborar los modelos de distribución potencial se utilizó el módulo de *Desktop GARP*, donde se introducen los datos de presencia de *B. dendrobatidis*. La forma de ingresar los datos fue mediante un archivo de Excel (Microsoft 2001) que contiene únicamente información que corresponde al nombre de la especie, la longitud y la latitud del registro. En el experimento se utilizaron 70% de los registros como datos de entrenamiento (construcción del modelo) y el 30 % restante se dejaron como datos de verificación de los modelos. Existe una variabilidad entre los modelos generados por GARP por lo que se corrieron 100 modelos con 0.01 de límite de convergencia y a 1000 iteraciones máximas para delimitarlos. Se seleccionaron los 20 mejores modelos con un umbral de 5% de error de omisión y de éstos se escogió el 50% para obtener finalmente los 10 mejores modelos que predicen la distribución geográfica potencial de la especie (Anderson *et al.*, 2003). Los cinco modelos de distribución potencial actual y futura obtenidos se sumaron en Arcview 3.2 (ESRI, 2000) creando mapas de consenso. El valor del píxel representa el número de modelos que predicen la presencia de la

especie en ese píxel, de la distribución geográfica del nicho ecológico de la especie para las condiciones actuales y futuras (Domínguez-Pérez, 2007). Como resultado, estos mapas tienen una región final que contiene sólo las áreas en las que coinciden los cinco mapas finales, representando las condiciones ambientales propicias para la distribución de la especie. Estos mapas finales, se reclasificaron para posteriormente sobreponerlos con los mapas resultantes del modelado de nicho ecológico, por medio del programa *Maxent* con la finalidad de comparar la distribución potencial actual y futura predicha por ambos modelos.

La interfase *Maxent* utiliza datos sólo de presencia para realizar el modelo de la distribución potencial de una especie (Phillips *et al.*, 2006). En este caso la forma de ingresar los datos es en un archivo con extensión .csv, que contiene únicamente las columnas que corresponden al nombre de la especie, la longitud y la latitud del registro, de manera similar a GARP. A diferencia de la Interfase *Desktop GARP*, *Maxent* no tiene un módulo especial que actué como manejador de datos para las coberturas climáticas, por lo que se utilizaron directamente todos los archivos en formato ASCII correspondientes a las capas ambientales actuales y del futuro. En el experimento se utilizó el 100% de los registros para la construcción del modelo, con una iteración máxima de 500 y un umbral de convergencia de 0.00001. Se obtuvieron tres mapas finales que corresponden a la distribución potencial actual y futura (dos escenarios) de *B. dendrobatidis*. Estos mapas se importaron al programa Arcview 3.2 (ESRI, 2000) con formato ASCII raster para poder visualizarlos y posteriormente reclasificarlos. Los mapas reclasificados se traslaparon con los mapas resultantes del modelado de nicho ecológico con el programa GARP para comparar la distribución potencial actual y futura predicha por ambos modelos.

4.0 RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO

Se detectó la presencia del patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* en 23.19% de las 539 muestras recolectadas durante las cuatro temporadas. Sin embargo, sólo se identificó en cuatro localidades de las seis muestreadas y en 125 muestras en las diferentes temporadas (Cuadro 1). Esto corresponde a una prevalencia global de quitridiomycosis del 23.19% para la zona de estudio en el estado de Guerrero.

En la primera temporada de lluvias (1ª salida) se recolectaron un total de 131 muestras, pertenecientes a 10 especies diferentes de anfibios, 59 en estadio de joven o adulto y 72 en estadio de renacuajos (Cuadro 1 y 2).

En la recolecta en la temporada de frío (2ª salida) se obtuvieron un total de 137 muestras al visitar las seis localidades previamente seleccionadas. Las muestras pertenecen a siete especies diferentes de anfibios, 48 en estadio de joven o adulto y 89 en estadio de renacuajos (Cuadro 1 y 2).

En la temporada de secas (3ª salida) se recolectaron un total de 159 muestras, pertenecientes a 12 especies diferentes de anfibios, 104 en estadio de joven o adulto y 55 en estadio de renacuajos (Cuadro 1 y 2).

En la recolecta en la segunda temporada de lluvias (4ª salida) se obtuvieron un total de 112 muestras, pertenecientes a 12 especies diferentes de anfibios, 65 en estadio de joven o adulto y 47 en estadio de renacuajos (Cuadro 1 y 2).

La presencia del patógeno fue detectada tanto en organismos en estadio de adultos como de renacuajos. Además, se detectó el patógeno en cuatro familias (*Ranidae*, *Eleutherodactylidae*, *Hylidae* y *Craugastoridae*) y 10 especies diferentes de anfibios (Cuadro 2). El promedio de esporas de *B. dendrobatidis* detectadas en los organismos infectados fue de 4.46 esporas (D E +/- 32.93). El número de esporas de *B. dendrobatidis* detectadas en los organismos infectados tuvo un rango de entre 1 a 523.873 esporas por individuo.

Cuadro 1.- Número total de muestras obtenidas por localidad en las diferentes temporadas y número entre paréntesis total de anfibios infectados con *B. dendrobatis*.

N° localidad (Elevación)	Nombre	1ª temporada de lluvias	Temporada de frío	Temporada de secas	2ª temporada de lluvias
1 (0m)	Estero el Plan	35 (0)	23 (0)	30 (0)	31 (0)
2 (500m)	Rincón de las Parotas	26 (0)	28 (1)	27 (7)	17 (5)
3 (1000m)	Barranca	23 (0)	32 (24)	29 (24)	23 (3)
4 (1500m)	Molote 1	28 (3)	35 (27)	30 (8)	30 (5)
5 (2000m)	Molote 2	14 (0)	2 (0)	20 (18)	3 (0)
6 (2500m)	Puerto del Gallo	5 (0)	16 (0)	23 (0)	8 (0)
TOTAL		131 (3)	137 (52)	159 (57)	112 (13)

Por otro lado, del total de anfibios muestreados, la prevalencia de quitridiomycosis varió dependiendo de la especie de anfibio muestreada. Las especies *Eleutherodactylus nitidus* y *Eleutherodactylus pipillans* tuvieron una frecuencia de quitridiomycosis del 100% (n= 1), mientras que en *Exerodonta sumicrasti* fue del 66.67% (n= 2). Las especies *Craugastor pygmaeus*, *Plectrohyla penthether* y *Ptychohyla leonhardschultzei* tuvieron una prevalencia de quitridiomycosis del 29.41% (n= 10), 43.26% (n= 77) y 28.21% (n=11) respectivamente. Las especies *Lithobates berlandieri*, *Lithobates sierramadrensis* y *Lithobates forreri* tuvieron una frecuencia de quitridiomycosis del 25.0% (n= 1), 55.56% (n= 10) y 60.0% (n= 6), respectivamente. La especie que presento una menor frecuencia de quitridiomycosis fue *Smilisca baudini* con un 2.56 % (n= 1).

Se calculó el promedio, por localidad, de las mediciones de temperatura y humedad obtenidas durante todos los muestreos, los cuales se resumen en el cuadro 3 de acuerdo con cada temporada.

Cuadro 2.- Lista de especies y localidades muestreadas para quitridiomycosis en las 4 temporadas de estudio.

Especie	n	Altitud (m)	Temporada	N° anfibios jóvenes o adultos examinados	N° renacuajos examinados	N° infectados/ N° examinados
<i>Thorius omiltemi</i>	5	2500	1ª de lluvias	5	0	0/5
	16	2500	Frío	16	0	0/16
	21	2500	Secas	21	0	0/21
	8	2500	2ª de lluvias	8	0	0/8
<i>Craugastor hobartsmithi</i>	1	2500	Secas	1	0	0/1
<i>Craugastor sp</i>	1	2500	Secas	1	0	0/1
<i>Plectrohyla pentheter</i>	13	2000	1ª de lluvias	1	12	0/13
	20	2000	Secas	0	20	18/20
<i>Craugastor sp</i>	1	2000	1ª de lluvias	1	0	0/1
<i>Ptychohyla leonhardschultzei</i>	1	2000	Frío	1	0	0/1
<i>Incilius occidentalis</i>	1	2000	Frío	1	0	0/1
	1	2000	2ª de lluvias	1	0	0/1
<i>Eleutherodactylus sp</i>	2	2000	2ª de lluvias	2	0	0/2
<i>Plectrohyla pentheter</i>	24	1500	1ª de lluvias	2	22	1/24
	22	1500	Frío	2	20	16/22
	2	1500	Secas	2	0	0/2
	26	1500	2ª de lluvias	2	24	3/26
<i>Craugastor pygmaeus</i>	2	1500	1ª de lluvias	1	1	0/2
	2	1500	Frío	2	0	2/2
	21	1500	Secas	21	0	7/21
	1	1500	2ª de lluvias	1	0	1/1
<i>Ptychohyla leonhardschultzei</i>	11	1500	Frío	0	11	9/11
	5	1500	Secas	5	0	1/5
	3	1500	2ª de lluvias	3	0	1/3
<i>Craugastor sp</i>	1	1500	1ª de lluvias	1	0	1/1
<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	1	1500	1ª de lluvias	1	0	1/1
<i>Pseudoeurycea sp</i>	1	1500	1ª de lluvias	1	0	0/1
<i>Craugastor mexicanus</i>	2	1500	Secas	2	0	0/2
<i>Plectrohyla pentheter</i>	21	1000	1ª de lluvias	0	21	0/21
	32	1000	Frío	0	32	24/32
	17	1000	Secas	0	17	15/17
	1	1000	2ª de lluvias	0	1	0/1
<i>Craugastor pygmaeus</i>	1	1000	1ª de lluvias	1	0	0/1

Especie	n	Altitud (m)	Temporada	N° anfibios jóvenes o adultos examinados	N° renacuajos examinados	N° infectados/ N° examinados
<i>Craugastor sp</i>	1	1000	1ª de lluvias	1	0	0/1
<i>Exerodonta sumicrasti</i>	1	1000	Secas	1	0	0/1
	2	1000	2ª de lluvias	2	0	2/2
<i>Lithobates sierramadrensis</i>	7	1000	Secas	0	7	7/7
<i>Bufo sp</i>	4	1000	Secas	0	4	2/4
<i>Ptychohyla leonhardschultzei</i>	19	1000	2ª de lluvias	3	16	0/19
<i>Smilisca baudini</i>	1	1000	2ª de lluvias	1	0	1/1
<i>Lithobates berlandieri</i>	1	500	1ª de lluvias	1	0	0/1
	2	500	Frío	2	0	0/2
	1	500	Secas	1	0	0/1
<i>Smilisca baudini</i>	18	500	1ª de lluvias	1	17	0/18
	1	500	Secas	1	0	0/1
<i>Incilius marmoreus</i>	1	500	1ª de lluvias	1	0	0/1
<i>Rhinella marina</i>	5	500	1ª de lluvias	5	0	0/5
<i>Pachymedusa dacnicolor</i>	1	500	1ª de lluvias	1	0	0/1
<i>Lithobates sp</i>	26	500	Frío	0	26	1/26
	7	500	Secas	0	7	1/7
	6	500	2ª de lluvias	0	6	0/6
<i>Lithobates sierramadrensis</i>	5	500	Secas	5	0	1/5
	6	500	2ª de lluvias	6	0	2/6
<i>Lithobates forreri</i>	8	500	Secas	8	0	4/8
	2	500	2ª de lluvias	2	0	2/2
<i>Craugastor pygmaeus</i>	5	500	Secas	5	0	0/5
	2	500	2ª de lluvias	2	0	0/2
<i>Eleuthetodactylus pipillans</i>	1	500	2ª de lluvias	1	0	1/1
<i>Rhinella marina</i>	15	0	1ª de lluvias	15	0	0/15
	1	0	Frío	1	0	0/1
	1	0	2ª de lluvias	1	0	0/1
<i>Incilius marmoreus</i>	1	0	1ª de lluvias	1	0	0/1
<i>Smilisca baudini</i>	19	0	1ª de lluvias	19	0	0/19
<i>Leptodactylus melanonotus</i>	22	0	Frío	22	0	0/22
	30	0	Secas	30	0	0/30
	30	0	2ª de lluvias	30	0	0/30

Cuadro 3.- Promedios de temperatura y humedad microambiental tomados *in situ*, primera temporada de lluvias (1ª salida), temporada de frío (2ª salida), temporada de secas (3ª salida) y segunda temporada de lluvias (4ª salida).

Localidad	TEMPORADAS							
	1ª temporada de lluvias		Temporada de frío		Temporada de secas		2ª temporada de lluvias	
	Temperatura (°C)	Humedad (%)	Temperatura (°C)	Humedad (%)	Temperatura (°C)	Humedad (%)	Temperatura (°C)	Humedad (%)
Estero el Plan	27.00	84.00	24.29	69.82	26.00	86.00	30.40	77.00
Rincón de las Parotas	25.48	87.58	24.67	60.00	24.40	75.41	26.11	87.65
Barranca	22.80	84.00	23.80	75.50	24.15	52.79	22.22	89.35
Molote 1	25.70	72.00	20.01	73.16	19.94	69.37	21.22	90.70
Molote 2	17.10	88.75	17.60	73.00	18.70	76.00	17.03	96.67
Puerto el Gallo	Sin datos	Sin datos	16.19	63.56	19.04	58.87	18.54	86.75

4.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La asociación entre el número promedio de esporas de *Batrachochytrium dendrobatidis* y la temporada de recolecta se realizó mediante regresión lineal, utilizando la primera temporada de lluvias (primera de muestreo) como referencia. Los anfibios muestreados en la segunda temporada (frío) tuvieron en promedio 10.16 esporas más (IC 95%=2.29-18.02, $p=0.011$) que los muestreados en la primera temporada y esta diferencia fue significativa. El resto de las diferencias (cada una de las temporadas comparada con la primera temporada de lluvias) resultaron no significativas. La asociación entre el número promedio de esporas de *B. dendrobatidis* y la altitud también se analizó mediante regresión lineal, usando la primera altitud (0 msnm) como referencia. Los anfibios muestreados en la altitud de 1000 msnm tuvieron en promedio 14.48 zoosporas más (IC 95%=6.0-22.97, $p=0.001$) que los muestreados en la altitud de 0 msnm y estadísticamente esta diferencia fue significativa. De igual forma, los anfibios muestreados en la altitud de 2000 msnm tuvieron en promedio 14.71 esporas más (IC 95%=2.95-26.48, $p=0.014$) que los muestreados en la altitud de 0 msnm y esta diferencia fue estadísticamente significativa. Los anfibios muestreados en el resto de las altitudes (500 msnm, 1500 msnm y 2500 msnm) resultaron presentar diferencias no significativas en comparación con los muestreados a una altitud de 0 msnm. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la concentración de zoosporas del patógeno es mayor a mayores altitudes en comparación a menores altitudes y en especial en altitudes medias.

También se ajustó un modelo multivariado para explorar la relación entre el número promedio de esporas de *B. dendrobatidis*, la temporada y la altitud. Para una misma temporada, los anfibios muestreados a 1000 msnm tuvieron en promedio 13.35 esporas más (IC 95%=4.88-21.82, $p=0.002$) que los muestreados a 0 msnm y esta diferencia fue significativa. Asimismo, los anfibios muestreados a una altitud de 2000 msnm tuvieron en promedio 15.48 esporas más (IC 95%=3.62-27.34, $p=0.011$) que los muestreados a 0msnm y esta diferencia fue significativa. Por lo tanto, ajustando por temporada, la intensidad de infecciones por el

patógeno *B. dendrobatidis* es mayor en anfibios muestreados en altitudes de 1000 y 2000 msnm que para los organismos muestreados en la altitud de 0 msnm. Por otro lado, ajustando por altitud, los anfibios muestreados en la temporada de frío tuvieron en promedio 10.91 esporas más (IC 95%=3.03-18.78, $p=0.007$) que los muestreados en la primera temporada de lluvias y esta diferencia fue significativa. Se ajustaron los modelos de regresión logística para explorar la asociación univariada entre la presencia de quitridiomycosis, la temporada y la altitud. Como grupos de referencia se utilizó la primera temporada de lluvias (primera de muestreo) y la primera altitud (0 msnm), respectivamente. Los anfibios muestreados en la temporada de frío presentan el riesgo más alto de infección por *B. dendrobatidis*; estos organismos tienen 26.10 (IC 95%=7.90-86.28, $p=0.00$) veces más riesgo de infección que los organismos de la primera temporada de lluvias. En general, los anfibios de todas las temporadas de recolecta presentaron un mayor riesgo de infección con respecto a los organismos de la primera temporada de lluvias. Además, a mayor altitud, mayor el riesgo de contraer quitridiomycosis ($\chi^2= 114.44$ $p <0.001$). En comparación con los organismos muestreados en una altitud de 0 msnm, los muestreados en una altitud 500 msnm tuvieron un 73% (IC 95%=7345532-4.09x10⁷, $p=0.00$) más infección, mientras que los individuos muestreados en una altitud de 1500 msnm tuvieron 5 veces más riesgo de infección (IC 95%=2.93x10⁷- 1.26x10⁸, $p=0.00$).

	Diferencia en promedio de esporas	IC 95%		p
Temporada				
1 lluvias	referencia	-		-
frío	10.16	2.295531	18.02375	0.011
secas	3.94	-3.663003	11.52402	0.310
2 lluvias	-0.084	-8.366181	8.197867	0.984
Altitud (m)				
0	referencia	-		-
500	0.08	-8.608192	8.769725	0.985
1000	14.48	5.996285	22.96713	0.001
1500	2.20	-5.98555	10.3914	0.597
2000	14.71	2.949805	26.47584	0.014
2500	1.04x10 ⁻¹³	-10.59534	10.59534	1.00
Temperatura				
< 16	-1.1	-18.87614	16.69925	0.90
17-27	4.0	-6.121407	14.03958	0.44
> 28	referencia			
Humedad				
<45	referencia	-		-
46-90	4.47	-11.51635	20.4546	0.58
>91	0.73	-17.40244	18.86571	0.94

Cuadro 4.- Modelo univariado lineal. Asociación entre el promedio de esporas de *B. dendrobatidis*, la temporada, la altitud, la temperatura y la humedad.

	Razón de momios (OR)	IC 95%		p
Temporada				
1 lluvias	referencia	-		-
frío	26.10	7.896204	86.28353	<0.0001
secas	23.84	7.255374	78.35505	<0.0001
2 lluvias	5.60	1.553897	20.20094	<0.0008
Altitud (m)				
0	referencia	-		-
500	1.73x10 ⁷	7345532	4.09x10 ⁷	<0.0001
1000	1.03x10 ⁸	4.95x10 ⁷	2.15x10 ⁸	<0.0001
1500	6.09x10 ⁷	2.93x10 ⁷	1.26x10 ⁸	<0.0001
2000	9.71x10 ⁷	-	-	-
2500	-	-	-	-
Temperatura				
< 16	*	*		*
17-27	7.44	1.774181	31.15893	0.006
> 28	referencia	-		-
Humedad				
<45	referencia	-		-
46-90	0.038	.0085864	.1694769	<0.0001
>91	0.015	.0025982	.0844749	<0.0001

* No es posible calcular por falta de observaciones.

Cuadro 5.- Modelo univariado logístico. Asociación entre quitridiomycosis, temporada y altitud la temperatura y la humedad.

4.3 MODELADO DE NICHOS ECOLÓGICOS

Los resultados del modelado de nicho ecológico del patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* obtenido mediante ambos programas (GARP y *Maxent*) identificó una región extensa, que comprende gran parte de la República mexicana, con condiciones climáticas favorables para el establecimiento de dicho patógeno y, por tanto, para el desarrollo de esta enfermedad emergente de los anfibios (Fig.7). Sin embargo, es importante mencionar que la predicción de la distribución potencial actual y futura (escenarios A1 y B2) de *B. dendrobatidis* obtenida con el programa GARP fue más amplia que la obtenida con *Maxent*. En el mapa de distribución potencial actual de *B. dendrobatidis* en México se puede observar que la distribución modelada del quitridio abarca mayoritariamente las zonas montañosas del país (Fig. 7). Por lo que las áreas más propicias para el establecimiento de este patógeno se localizan en regiones significativas de la Sierra Madre Occidental, Eje Volcánico Transversal, Tierras Altas de Chiapas e Istmo de Tehuantepec. En contraste, ambos modelos predicen que la mayor parte de las zonas costeras del país son regiones ecológicamente inapropiadas para el establecimiento del quitridio.

En cuanto a la distribución potencial futura de *B. dendrobatidis* modelada con ambos escenarios, se distinguen las zonas montañosas del país como zonas propicias para el establecimiento del patógeno. Esto también se observa en la distribución actual modelada. Sin embargo, a diferencia de la distribución actual modelada, la distribución modelada para el futuro presenta una reducción en ciertas áreas del país que si fueron propicias para el establecimiento del quitridio en la actual. La distribución resultante modelada con el escenario A1 (escenario futuro extremo) presenta una reducción mayor de las áreas propicias para el establecimiento del patógeno que la distribución modelada con el escenario B2 (escenario futuro conservador), en comparación con la distribución actual modelada. En general las zonas donde se presentan las reducciones de distribución en el futuro son las áreas cercanas a la costa y en la zona sur del país comprendiendo los estados de Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Tabasco y

Chiapas. También se reconocen áreas de reducción de distribución potencial futura en la zona norte del país, entre los estados de Tamaulipas, Nuevo León y Coahuila.

Por otro lado, los resultados obtenidos del modelado con el programa *Maxent* nos indican la contribución relativa de las variables ambientales que más influyeron en el modelado de la distribución potencial actual y futura de *B. dendrobatidis* siendo las siguientes: (BIO5) temperatura máxima del mes más caliente, (BIO3) isothermalidad, (BIO17) precipitación del trimestre más seco, (BIO4) temperatura estacional y (BIO14) precipitación del mes más seco. Además, *Maxent* realiza una prueba de jackknife para determinar la importancia de las variables ambientales. En este caso la variable climática con mayor información por si misma resultó (BIO5) que corresponde a la temperatura máxima del mes más caliente.

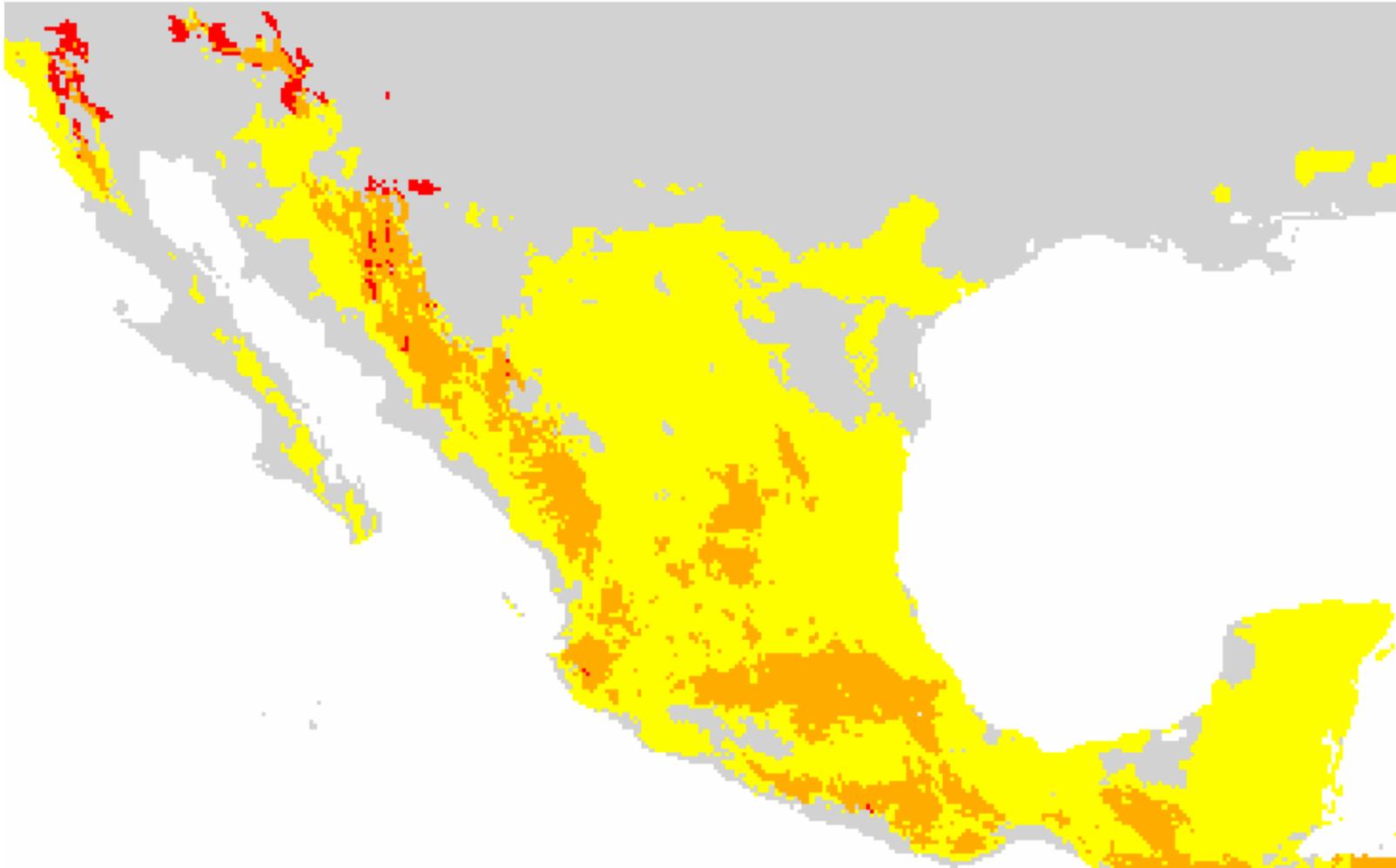


Fig. 7 Distribución potencial actual de *B. dendrobatidis* en México. Áreas en color rojo modeladas por *Maxent*; áreas en amarillo modeladas por GARP; áreas naranjas modeladas por ambos métodos; áreas grises modeladas como sitios de ausencia del patógeno.

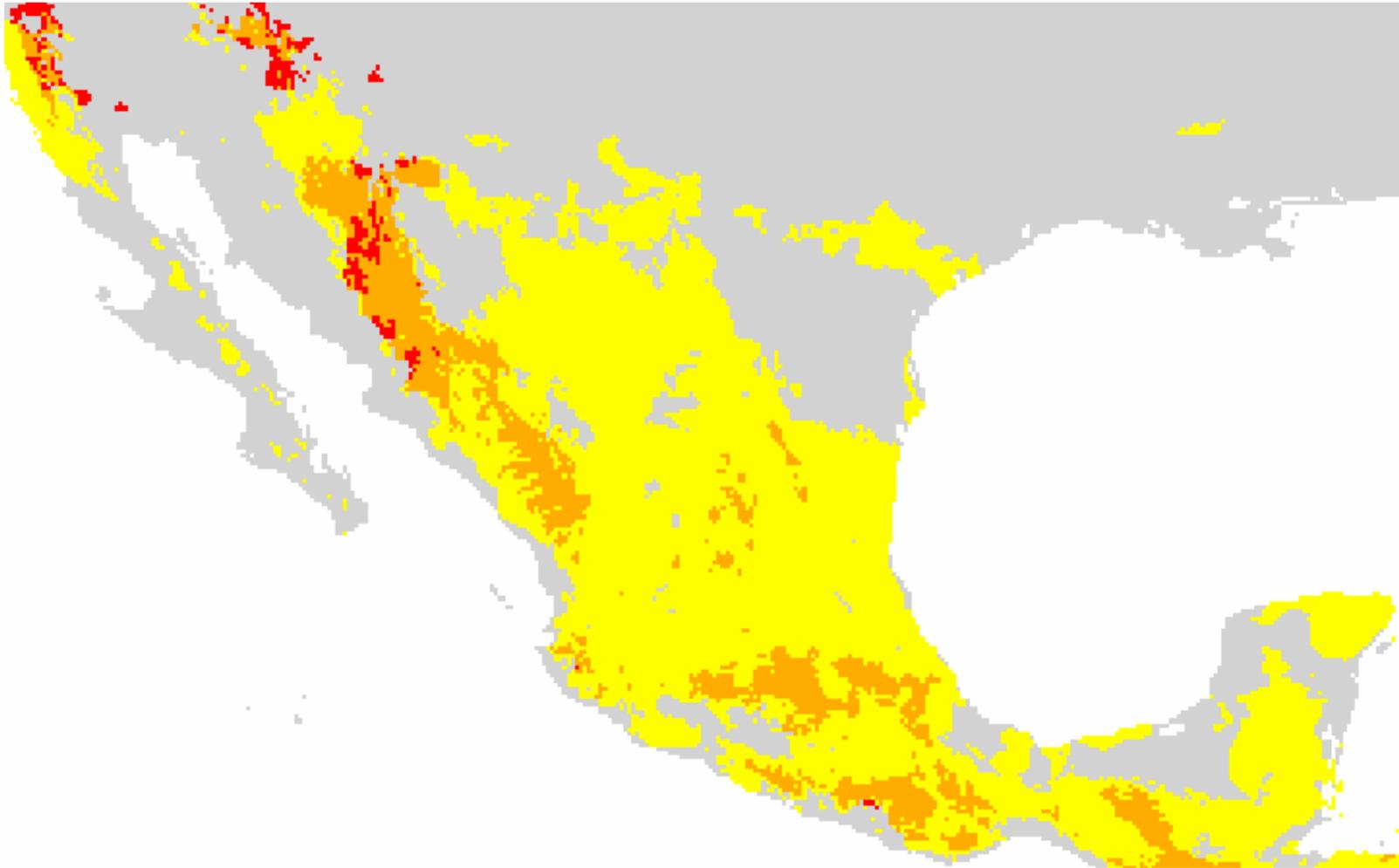


Fig. 8 Distribución potencial futura (escenario A1) de *B. dendrobatidis* en México. Áreas en color rojo modeladas por *Maxent*; áreas en amarillo modeladas por GARP; áreas naranjas modeladas por ambos métodos; áreas grises modeladas como sitios de ausencia del patógeno.

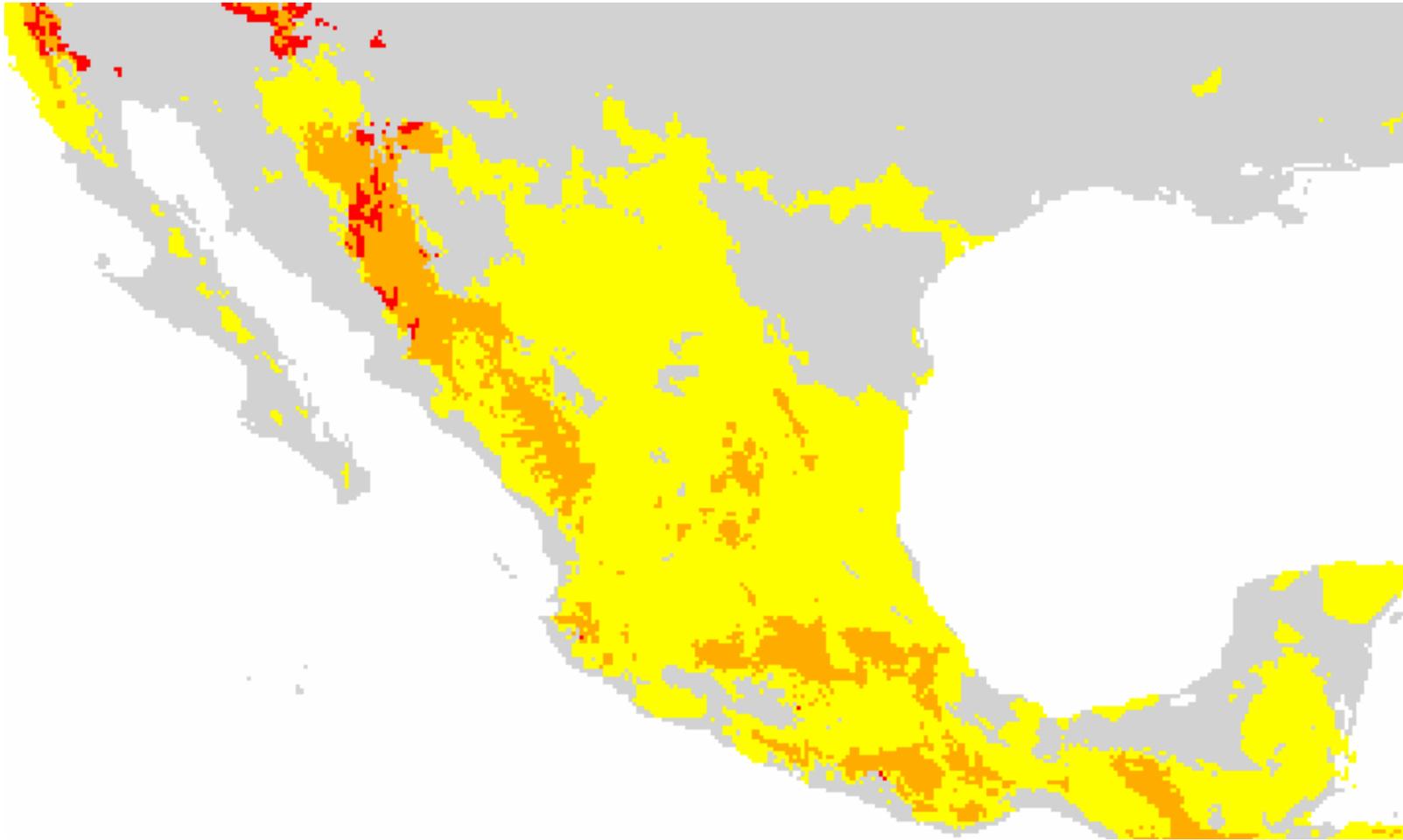


Fig. 9 Distribución potencial futura (escenario B2) de *B. dendrobatidis* en México. Áreas en color rojo modeladas por *Maxent*; áreas en amarillo modeladas por *GARP*; áreas naranjas modeladas por ambos métodos; áreas grises modeladas como sitios de ausencia del patógeno.

5.0 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Varios estudios sugieren que las declinaciones de anfibios asociadas con quitridiomycosis han ocurrido generalmente en periodos fríos del año y/o en elevaciones altas (Berger *et al.*, 1998, 2004; Lips, 1998, 1999; Bosch *et al.*, 2000; Bradley *et al.*, 2002; McDonald *et al.*, 2005; Puschendorf *et al.*, 2006). De hecho, se ha demostrado que *Batrachochytrium dendrobatidis* presenta una mayor patogenicidad a bajas temperaturas (Berger *et al.*, 2004; Daszak *et al.*, 2003). También, varios estudios indican que la virulencia del hongo es mayor a altas elevaciones y entre especies asociadas a arroyos (Stuart *et al.*, 2004). Además de este patrón, se sabe de la preferencia de *B. dendrobatidis* a condiciones frías en cultivo (Longcore *et al.*, 1999), lo que indica que la temperatura ambiental puede ser un factor importante en el surgimiento de los brotes de esta enfermedad (Woodhams *et al.*, 2003) y aparentemente podrían limitar su efecto (Puschendorf *et al.*, 2006). La sensibilidad del hongo a la temperatura ha sido postulada como una explicación para la localización de los brotes (Berger *et al.*, 2004). Esto también podría explicar el mayor impacto del patógeno en poblaciones de anfibios que habitan zonas montañosas (Stuart *et al.*, 2004).

Los datos de este estudio mostraron que en todas las temporadas de muestreo, los sitios donde hubo ausencia de anfibios infectados con *B. dendrobatidis* fueron en las zonas más bajas (0 msnm) y las más altas (2500 msnm), mientras que en las localidades con altitudes medias se detectó la presencia del patógeno en diferentes especies de anfibios. De hecho, los anfibios muestreados en las altitudes de 1000 y 2000 msnm tuvieron en promedio más zoosporas que los muestreados a 0 msnm, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.001$ y $p=0.014$, respectivamente). Por lo tanto, estos resultados indican que es mayor la concentración de zoosporas del patógeno a altitudes medias. Esto concuerda con un estudio previo donde se propuso un modelo teórico acorde a los datos de la literatura sobre el comportamiento y preferencias de temperatura de *B. dendrobatidis* en 2 localidades, una en Guerrero y otra en Oaxaca (Familiar López, 2007). Los resultados de este estudio previo también predicen las zonas con

altitudes medias como sitios con condiciones de temperatura ideales para el desarrollo de *B. dendrobatidis*. Estas observaciones contrastan con lo reportado por Kriger y colaboradores (2008) que no encontraron evidencia consistente para soportar la hipótesis de que la prevalencia de quitridiomycosis incrementa con la altitud. Sin embargo, en otro estudio del mismo grupo de investigadores se encontró una disminución significativa en la intensidad de las infecciones por *B. dendrobatidis* en anfibios de altitudes bajas habitantes de regiones calientes cercanas al Ecuador, sugiriendo que las tierras bajas tropicales al ser muy calientes no presentan niveles altos de infección. Por otro lado, en estas regiones tropicales sí puede existir un aumento significativo en los niveles de infección por *B. dendrobatidis* en altitudes mayores donde es suficientemente fresco como para que el quitridio brote (Kriger *et al.*, 2007). Esto concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación, en donde los anfibios de tierras bajas tropicales no presentan infecciones por el patógeno *B. dendrobatidis*, mientras que los organismos en regiones de mayor altitud sí están infectados.

La ausencia de individuos infectados en la localidad con una altitud de 0 msnm puede deberse a que las altas temperaturas que se registran a lo largo del año no facilitan el desarrollo del patógeno. Alternativamente, se puede asumir que a temperaturas ambientales altas, como ocurre en tierras bajas de los trópicos o en los meses de verano, disminuya la incidencia de quitridiomycosis en las poblaciones de anfibios e incluso pueda erradicarse de algunas regiones (Woodhams *et al.*, 2003). Esto puede deberse a que las temperaturas altas (i.e. >25°C) incrementan la tasa de intercambio epidérmico y reducen el crecimiento del quitridio en la piel de los anfibios. Por tanto, la pérdida de la infección en anfibios en condiciones cálidas puede ocurrir porque el hongo no tiene suficiente tiempo para completar su ciclo de vida antes de que empiece a desprenderse incorporado a la capa epidérmica (Piotrowski *et al.*, 2004; Berger *et al.*, 2004, 2005; McDonald *et al.*, 2005).

Se ha descrito que la prevalencia de la enfermedad en zonas localizadas al nivel del mar se ve afectada por las altas temperaturas, ya que la diseminación de la quitridiomycosis puede estar limitada por el calor y la desecación (Berger *et al.*,

2004). En general, la temperatura y la disponibilidad de agua usualmente interaccionan para determinar las condiciones óptimas del hongo (Bosch *et al.*, 2007).

El efecto de la quitridiomycosis en una especie en particular puede depender del sitio debido a factores como la temperatura, densidad del hospedero y movimientos del agua; en regiones donde la enfermedad persiste hay tiempo para que ocurran introducciones múltiples del patógeno que le ofrecen la oportunidad de recombinar genes (Morgan *et al.*, 2007).

Rachowicz y colaboradores (2004) demostraron experimentalmente que se podían infectar renacuajos de *Rana muscosa* con zoosporas de *B. dendrobatidis*, y que estos renacuajos infectados podían transmitir la infección a otros renacuajos y a animales post-metamorfos. Los renacuajos con infección permanecieron clínicamente sanos, mientras que los animales post-metamorfos infectados murieron. Esto sugiere la posibilidad de que congregaciones de renacuajos se conviertan en reservorios del quitridio, lo que puede extender la enfermedad a organismos de todas las categorías de edad que habiten un mismo cuerpo de agua (Rachowicz y Vredenburg, 2004). En las zonas con altitudes medias analizadas en el presente estudio se identificó la presencia del patógeno en diferentes especies de anfibios, y se detectó tanto en renacuajos como en adultos que habitaban los mismos cuerpos de agua. Por lo que sugiero que los renacuajos pueden estar actuando como reservorios de la enfermedad y así favoreciendo el fenómeno de transmisión en las zonas de altitudes medias, donde se encontró la presencia del patógeno *B. dendrobatidis* en diferentes categorías de edad. Esta transmisión de quitridiomycosis puede ser sin contacto directo entre individuos debido a la naturaleza móvil de las zoosporas y del patógeno (Rachowicz y Briggs, 2007). Además, los individuos infectados pueden liberar zoosporas por largos periodos (24 a 220 días) antes de morir (Berger *et al.*, 2004), por lo que en zonas de altitudes medias pueden estarse infectando individuos nuevos constantemente. Las declinaciones de anfibios exhiben importantes patrones tanto regionales como taxonómicos. De hecho, el riesgo de extinción de un anfibio y de declinación de una población es taxonómicamente no azaroso, aún a escalas geográficas

pequeñas, indicando que la susceptibilidad a la declinación de las especies está influida por sus atributos biológicos (Bielby *et al.*, 2006 y 2008; Stuart *et al.*, 2004). Cuatro familias de anfibios presentan especies con declinaciones más rápidas que el promedio para todos los anfibios a nivel mundial: Rheobatrachidae, Leptodactylidae, Bufonidae y Ambystomatidae. Además otras dos familias contribuyen fuertemente al número total de especies declinando rápidamente: Hylidae y Ranidae (Stuart *et al.*, 2004). En el caso de México, en un estudio previo Frías-Alvarez y colaboradores (2008) encontraron que los géneros *Ambystoma* y *Rana* presentaron los niveles más altos de infección con *B. dendrobatidis*. En este estudio se detectó la presencia del patógeno *B. dendrobatidis* en 4 familias de anfibios: Ranidae (3 especies), Eleutherodactylus (2 especie), Hylidae (4 especies) y Craugastoridae (1 especie). Los niveles más altos de infección, de las muestras analizadas hasta ahora, se detectaron en la familia Hylidae en el género *Plectrohyla* en la localidad “el Molote 2” (2000 msnm). A nivel mundial, varias de las declinaciones de poblaciones de anfibios se han asociado con el patógeno *B. dendrobatidis* por lo que si en la zona de estudio de Guerrero, las especies de anfibios de las familias Ranidae e Hylidae se encuentran infectadas con dicho patógeno es posible especular que sus poblaciones pueden estar declinando o en riesgo de declinar. Aunado a esto, las especies con ciclos de vida acuáticos o parte de ellos son particularmente más susceptibles a declinaciones rápidas, esto puede ser el caso de las especies muestreadas en este estudio pertenecientes a las familias Ranidae e Hylidae. Sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios poblacionales continuos para poder determinar si dichas especies se encuentran declinando en la zona.

En México existe una gran diversidad de anfibios. Como se mencionó anteriormente, oficialmente se conocen 361 especies, de las cuales más del 62% aproximadamente son endémicas (Flores-Villela y Canseco-Márquez, 2004). No obstante, de manera similar a la mayor parte del mundo, en México ha habido una declinación de las poblaciones de anfibios (Parra-Olea *et al.*, 1999). Estudios recientes, incluyendo éste, han detectado la presencia del patógeno *B.*

dendrobatidis en diferentes partes del país, lo que constituye un riesgo serio para la sobrevivencia de las poblaciones de anfibios.

La Faja Volcánica Transmexicana (FVT) es la región del país que tiene la segunda mayor riqueza herpetofaunística del país. Las especies habitantes de la FVT representan el 21.3% de la herpetofauna de México; de estas especies 52 se reconocen como endémicas a este sistema montañoso, representando el 20.8% del total de especies de la FVT. Si consideramos el total de especies endémicas de México (690), en la FVT se distribuyen 184 especies endémicas del país (incluyendo las endémicas a la FVT), y son el 26.6% de todas las endémicas del país. Las especies endémicas de México representan el 78.3% de la herpetofauna de la FVT (Flores-Villela y Canseco-Márquez, 2007). De acuerdo a lo reportado anteriormente por Ochoa-Ochoa y Flores-Villela (2006), las zonas de mayor riqueza potencial de especies endémicas de anfibios en México son la parte sur de la FVT y la Depresión del Balsas. Esta región coincide con parte de la distribución potencial de *B. dendrobatidis* obtenida en este trabajo por los modelos GARP y *Maxent*. Analizando los datos anteriores se puede pensar que hay una gran cantidad de especies de anfibios en riesgo de contraer quitridiomycosis, lo que es muy grave y tiene implicaciones importantes sobre la pérdida de la biodiversidad en México. También la diversidad taxonómica de la FVT es representativa de la diversidad de anfibios de México en general (Flores-Villela y Canseco-Márquez, 2007). Los géneros que contribuyen principalmente al número total de especies endémicas del país son *Ambystoma* y *Rana* y en ellos se ha reportado una gran incidencia de quitridiomycosis (Frías-Alvarez *et al*, 2008), por lo que podrían ser los principales blancos de esta infección. Los resultados de esta investigación ofrecen evidencia adicional del estado de amenaza en el que se pueden encontrar estos taxones.

La Evaluación Global de Anfibios (GAA, *Global Amphibian Assessment*) estimó el estado de conservación de 363 especies de anfibios de México y reportó que 71 están en peligro crítico, 85 en peligro, 42 son vulnerables, 22 con riesgo de amenaza, 95 son de menor preocupación y en 48 los datos son insuficientes (IUCN, 2007). De acuerdo a la predicción de los modelos obtenidos en este

estudio, las cifras de las especies en peligro podrían aumentar de manera considerable como resultado de la posible infección por *B. dendrobatidis*. Esto debido a que zonas donde habitan una muestra representativa de especies de anfibios y especies endémicas coincide con las áreas con condiciones apropiadas para el establecimiento de la quitridiomycosis; enfermedad que ha causado serias declinaciones de poblaciones de anfibios en diferentes partes del mundo.

Los resultados de la distribución potencial actual y futura (escenarios A1 y B2) de *B. dendrobatidis* en México indican que mayoritariamente las zonas montañosas del país son regiones con condiciones favorables para su desarrollo. En contraste, ambos modelos predicen que la mayor parte de las zonas costeras del país son regiones ecológicamente inapropiadas para el establecimiento del quitridio (Fig. 7, 8 y 9). Además, en el modelado con *Maxent* la variable climática BIO5 (temperatura máxima del mes más caliente) resultó la variable con mayor poder explicativo de la distribución del patógeno. Esto coincide con la investigación de Rödder y colaboradores (2008) en donde BIO5 fue la variable con mayor poder explicativo para la intensidad de la infección por *B. dendrobatidis*. La dirección de la relación sugiere que temperaturas altas están asociadas con menor prevalencia e intensidad de la infección por *B. dendrobatidis* (Rödder *et al.*, 2008). Esto coincide con los resultados del presente estudio en donde la intensidad de la infección aumenta con la altitud asociada a temperaturas menores, además de que los anfibios muestreados en la temporada de frío presentaron un mayor riesgo de infección.

El conocimiento de la distribución de *B. dendrobatidis* en México puede aportar información valiosa sobre cuáles especies y poblaciones de anfibios están en riesgo potencial de ser infectados por este patógeno. La identificación de áreas de riesgo podría permitir desarrollar estrategias efectivas de conservación y optimizar los recursos humanos y económicos disponibles para lograr esta meta. Para fines de conservación, las especies catalogadas en peligro de extinción o amenazadas, que son endémicas y además están restringidas a una o a unas cuantas localidades, deben tener prioridad sobre aquéllas que no están en peligro, o bien que no son endémicas o de distribución restringida. Aunado a esto, el

conocimiento de los factores ambientales implicados en la prevalencia de la enfermedad puede jugar un papel importante en el control y manejo de ésta. Por lo que investigaciones futuras deberían centrar sus esfuerzos en la ecología de la enfermedad, las implicaciones directas de los brotes de quitridiomycosis en las poblaciones de anfibios mexicanos y en soluciones para prevenir declinaciones de las especies asociados con dicho patógeno.

6.0 REFERENCIAS

- Anderson, R. P., D. Lew y A. T. Peterson. (2003) Evaluating predictive models of species' distributions: criteria for selecting optimal models. *Ecological Modelling* 162: 211-232.
- Anderson, R. P. y Martínez-Meyer E. (2004) Modeling species' geographic distributions for preliminary conservation assessments: an implementation with the spiny pocket mice (*Heteromys*) of Ecuador. *Biological Conservation* 116:167-179.
- Berger L. (2001) Diseases in Australian frogs. Ph.D thesis, James Cook University, Townsville, Queensland, Australia.
- Berger L., Speare R., Green D.E., Cunningham A.A., Goggin C.L., Slocombe R., Ragan M.A., Hyatt A.D., McDonald K.R., Hines H.B., Lips K.R., Marantelli G. y Parkes H. (1998) Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of National Academy of Science USA* 95:9031–9036.
- Berger L., Speare R., Hines H.B., Marantelli G., Hyatt A.D., McDonald K.R., Skerratt L.F., Olsen V., Clarke G., Gillespie G., Mahony M., Sheppard N., Williams C. and Tyler M.J. (2004) Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Australian Veterinary Journal* 82:434-439.
- Berger L., Hyatt A.D., Speare R. and Longcore J.E. (2005) Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 68:51-63.
- Bielby J., Cunningham A.A. and Purvis A. (2006) Taxonomic selectivity in amphibians: ignorance, geography or biology? *Animal Conservation* 9:135-143.
- Bielby J., Cooper N., Cunningham A.A., Garner T.W.J. and Purvis A. (2008) Predicting susceptibility to future declines in the world's frogs *Conservation Letters* 1:82-90.
- Bishop P. (2000) Chytrid fungi identified from dying frogs in New Zealand. *Froglog* 39:1-2.

- Bosch J., Martínez-Solano I. and García-París M. (2000) Evidence of a Chytrid fungus involved in the decline of the common midwife toad in protected areas of central Spain. *Froglog* 40:1.
- Bosch J., Carrascal L.M., Durán L., Walter S. and Fisher C. (2007) Climate change and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of Central Spain; is there a link? *Proceedings of the Royal Society B* 274:253-260.
- Boyle D.G., Boyle D.B, Olsen V., Morgan J.A.T. y Hyatt A.D. (2004) Rapid quantitative detection of Chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms* 60:141-148.
- Bradley G.A., Rosen P.C., Sredl M.J., Jones T.R. and Longcore J.E. (2002) Chytridiomycosis in native Arizona frogs. *Journal of Wildlife Diseases* 38:206-212.
- Brem F., Mendelson III J.R. y Lips K.R. (2007) Field-Sampling Protocol for *Batrachochytrium dendrobatidis* from Living Amphibians, using Alcohol Preserved Swabs. Version 1.0 (18 July 2007). Electronic document accessible at <http://www.amphibians.org> Conservation International, Arlington, Virginia, USA.
- Chefaoui R.M., Hortal J. y Lobo J.M. (2005) Potential distribution modelling, niche characterization and conservation status assessment using GIS tools: a case study of Iberian *Copris* species. *Biological Conservation* 122:327-338.
- Collins J.P. and Storfer A. (2003) Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distribution* 9:89-98.
- Daszak P., Berger L., Cunningham A.A., Hyatt A.D., Green D.E. and Speare R. (1999) Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerg Inf Dis* 5:735-748.
- Daszak P., Cunningham A.A. and Hyatt A.D (2000) Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. *Science* 287: 443-449.
- Daszak P., Cunningham A.A. and Hyatt A.D (2003) Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions* 9:141-150.
- Daszak P., Strieby A., Cunningham A.A., Longcore J.E., Brown C.C. and 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.

- Domínguez-Pérez A. (2007) Efecto del cambio climático en la distribución del conejo endémico de México *Romerolagus diaza* (Lagomorpha: Leporidae). Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.

- Drew A., Allen E.J. and Allen L.J.S. (2006) Analysis of climatic and geographic factors affecting the presence of chytridiomycosis in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms* 68: 245-250.

- Drost C.A. and Fellers G.M. (1996) Collapse of a regional frog fauna in the Yosemite area of the California Sierra Nevada, USA. *Conservation Biology* 10:414-425.

- Elith J., Graham C.H., Anderson R.P., Dudík M., Ferrier S., Guisan A., Hijmans R.J., Huettmann F., Leathwick J.R., Lehmann A., Li J., Lohmann L.G., Loiselle B.A., Manion G., Moritz C., Nakamura M., Nakazawa Y., Overton J. McC, Townsend Peterson A., Phillips S.J., Richardson K., Scachetti-Pereira R., Schapire R.E., Soberón J., Williams S., Wisz M.S. and Zimmermann N.E. (2006) Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography* 29: 129.151.

- Familiar López M. (2007) La variación de la temperatura diaria y su relación con los brotes de quitridiomycosis en anfibios de las montañas de Guerrero y Oaxaca, México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.

- Flato, G.M., G. J. Boer, W.G. Lee, N.A. McFarlane, D. Ramsden, M.C. Reader, and A.J. Weaver, 2000. The Canadian Centre for Climate Modelling and Analysis Global Coupled Model and its Climate. *Climate Dynamics* 16:451-467.

- Flores-Villela O. and Canseco-Márquez L. (2004) Nuevas especies y cambios taxonómicos para la herpetofauna de México. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)* 20(2):115-144.

- Flores-Villela O. and Canseco-Márquez L. (2007) Riqueza de la herpetofauna. En Luna I., J.J. Morrone y D. Espinosa (eds) Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana. Las prensas de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. pp. 514.

- Frías-Alvarez P., Vredenburg V.T., Familiar-López M., Longcore J.E., González-Bernal E., Santos-Barrera G., Zambrano L. y Parra-Olea G. (2008) Chytridiomycosis Survey in Wild and Captive Mexican Amphibians. *EcoHealth* 5:18-26.
- Green D.E. y Muths E. (2005) Health evaluation of amphibians in and near Rocky Mountain National Park (Colorado, USA). *Alytes* 22:109-129.
- Hale S.F. (2001) The status of the Tarahumara frog in Sonora, Mexico. A Re-survey of selected localities and report on additional populations. *U. S. Fish and Wildlife Service* 71 pp.
- Hijmans R.J., Cameron S. y Parra J. 2006. WORLDCLIM 1.4. (On line). Museum of Vertebrate Zoology University of California Berkeley (www.worldclim.org).
- Hyatt A.D., Boyle D.G., Olsen V., Boyle D.B, Berger L., Obendorf D., Dalton A., Kriger K., Hero M., Hines H., Phillott R., Campbell R., Marantelli G., Gleason F. y Colling A. (2007) Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 73: 175 - 192.
- Hutchinson G.E. (1957) Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 22:415-427.
- IUCN, International C, Nature Serve (2007) Global Amphibian Assessment (online database). Available at: <http://www.globalamphibians.org>
- Kriger K.M. y Hero J.M. (2007) Large-scale seasonal variation in the prevalence and severity of chytridiomycosis. *Journal of Zoology* 271:352-359.
- Kriger K.M. y Hero J.M. (2008) Altitudinal distribution of chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) infection in subtropical Australian frogs *Austral Ecology* 33:1022-1032.
- Lips K.R. (1998) Decline of a tropical montane amphibian fauna. *Conservation Biology* 12:106-117.
- Lips K.R. (1999) Mass Mortality and Population declines of Anurans at an Unpland Site in Western Panama. *Conservation Biology* 13:117–125.
- Lips K.R., Green D.E. and Papendick R. (2003) Chytridiomycosis in wild frogs from southern Costa Rica. *Journal of Herpetology* 37:215-218.

- Lips K.R., Mendelson J.R., Muñoz-Alonso A., Canseco-Márquez L. and Mulcahy D.G. (2004) Amphibian population declines in montane Southern México: resurveys of historical localities. *Biological Conservation* 119:555-564.
- Lips K.R., Burrowes P.A., Mendelson III J.R. and Parra-Olea G. (2005) Amphibian population declines in Latin America: a synthesis. *Biotropica* 37:222-226.
- Lips K.R., Brem F., Brenes R., Reeve J.D., Alford R.A., Voyles J., Carey C., Livo L., Pessier A.P. and Collins J.P. (2006) Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of National Academy of Science* 103: 3165– 3170.
- Longcore J.E., Pessier A.P. and Nichols D.K. (1999) *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91:219-227.
- Martínez-Meyer E. (2005) Climate Change and biodiversity: some considerations in forecasting shifts in species' potential distributions. *Biodiversity Informatics* 2: 42-55.
- Mendelson III J.R., Brodie E.D., Malone J.H., Acevedo M.E., Baker M.A., Smatresk N.J. y Campbell J.A. (2004) Factors associated with the catastrophic decline of a cloudforest frog fauna in Guatemala. *Revista de Biología Tropical* 52:991-1000.
- McDonald K.R., Méndez D., Müller R., Freeman A.B. and Speare R. (2005) Decline in the prevalence of chytridiomycosis in upland frog populations in North Queensland, Australia. *Pacific Conservation Biology* 11:114-120.
- Morehouse E.A., James T.Y., Ganley A.R.D., Vilgalys R., Berger L., Murphy P.J. and Longcore J.E. (2003). Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone. *Molecular Ecology* 12:395-403.
- Morgan J.A.T., Vredenburg V. T., Rachowicz L.J., Knapp R.A., Stice M.J., Tunstall T., Bingham R.E., Parker J.M., Longcore J.E., Moritz C., Briggs C.J. and Taylor J.W. (2007) Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* *Proceedings of National Academy of Science* 104: 13845-13850.

- Muths E., Pilliod D.S. y Livo L.J. (2008) Distribution and environmental limitations of an amphibian pathogen in the Rocky Mountains, USA. *Biological Conservation* 141:1484-1492.
- Navarro-Singuenza A., A. T. Peterson, Y. Nakazawa e I. Liebig. 2003. Colecciones biológicas, modelaje de nichos ecológicos y los estudios de la biodiversidad. En J.J. Morrone y J. Llorente (eds.). Una perspectiva Latinoamericana de la Biogeografía. Facultad de Ciencias, UNAM, México, 115-122.
- Nakicenovic, N. *et al* (2000). *Special Report on Emissions Scenarios: A Special Report of Working Group III of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 599 pp. Disponible en línea en : <http://www.grida.no/climate/ipcc/emission/index.htm>
- Nichols D.K., Lamirande E.W., Pessier A.P. and Longcore J.E. (2001) Experimental transmisión of cutaneous chytridiomycosis in dendrobatid frogs. *Journal of Wildlife Diseases* 37:1-11.
- Ochoa-Ochoa L.M. y Flores-Villela O. (2006) Áreas de diversidad y endemismo de la herpetofauna mexicana. Ed. UNAM-CONABIO, México. pp. 211.
- Parra-Olea G., García Paris M. and Wake D.B. (1999) Status of some populations of Mexican salamanders (Amphibia: Plethodontidae). *Revista Biología Tropical* 47:217-223.
- Pérez-Ramos E, Saldaña de la Riva L. y Uribe-Peña Z. (2000) A checklist of reptiles and amphibians of Guerrero, México. *Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología* 71:21-40.
- Peterson A. T. (2001) "Predicting species' geographic distributions based on ecological niche modeling". *The Condor* 103:599-605.
- Peterson A.T. (2003) Predicting the geography of species' invasions via ecological niche modeling. *The Quarterly Review of Biology* 78: 419-433.
- Peterson A.T. y Cohoon K. C. (1999) Sensitivity of distributional prediction algorithms to geographic data completeness. *Ecological Modelling* 117:159-164.

- Peterson A.T. y Robins C.R. (2003) Using Ecological-Niche Modeling to predict Barred Owl Invasion with Implications for Spotted Owl Conservation. *Conservation Biology* 17:1161-1165.
- Peterson A.T. y Shaw J. (2003) *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *International Journal of Parasitology* 33:919-931.
- Peterson A.T. y Holt (2003) Niche differentiation in Mexican birds: using point occurrences to detect ecological innovation. *Ecology Letters* 6:774-782.
- Peterson A.T., Papes M. and Kluza D.A. (2003) Predicting the potential invasive distributions of four alien plant species in North America. *Weed Science* 51: 863-868.
- Peterson A.T., Martínez-Campos C., Nakazawa Y. y Martínez-Meyer E. (2005) Time-specific ecological niche modeling predicts spatial dynamics of vector insects and human dengue cases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 99:647-655.
- Phillips S.J., Anderson R.P. y Schapire R.E. (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190:231-259.
- Piotrowski J.S, Annis S.L. y Longcore J.E. (2004) Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96:9-15.
- Puschendorf R., Castañeda F. y McCranie (2006a) Chytridiomycosis in wild frogs from Pico Bonito National Park, Honduras. *EcoHealth* 3:178-181.
- Puschendorf R., Bolaños F. and Chaves G. (2006b) The amphibian chytrid fungus along an altitudinal transect before the first reported declines in Costa Rica. *Biological Conservation* 132:136-142.
- Rachowicz L.J. and Vredenburg V.T. (2004) Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Diseases of Aquatic Organisms* 61:75-83.
- Rachowicz L.J. and Briggs C.J. (2007) Quantifying the disease transmission function: effects of density on *Batrachochytrium dendrobatidis* transmission in the mountain yellow-legged frog *Rana mucosa*. *Journal of Animal Ecology* 76: 711-721.

- Rödder D., Veith M. and Lötters S. (2008) Environmental gradients explaining the prevalence and intensity of infection with the amphibian chytrid fungus: the host's perspective *Animal Conservation* 11:513-517.
- Ron S.R. (2005) Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica* 37: 209-221.
- Ron S.R. and Merino-Viteri A. (2000) Declinación de anfibios del Ecuador: información general y primer reporte de quitridiomycosis para Sudamérica. *Froglog* 42:2-3.
- Sánchez-Cordero V., Cirelli V., Murguía M. y Sarkar S. (2005) Place prioritization for biodiversity representation using species' ecological niche modeling. *Biodiversity Informatics* 2:11-23.
- Santos-Barrera G. (2004) Las enfermedades infecciosas y su papel en la declinación mundial de las poblaciones de anfibios. *Biodiversitas* 56:1-6.
- Soberón J. y Peterson A. T. (2005) Interpretation of models of fundamental ecological niches and species' distributional areas. *Biodiversity Informatics* 2:1-10.
- StataCorp. *Stata Statistical Software: Release 10*. 2007;10.1.
- Stockwell, D. R. B. y I.R. Noble. 1992. Induction of sets of rules from animal distribution data a robust and informative method of data analyst. *Mathematics and Computers in Simulation* 33: 385-390.
- Stockwell, D. R. B. y D. Peters. 1999. The GARP modelling system: problems and solutions automated spatial prediction. *International Journal of Geographic Information Science* 13:143-158.
- Stuart S.N., Chanson J.S., Cox N.A., Young B.E., Rodrigues A.S.L., Fischman D.L. and Waller R.W. (2004) Status and Trends of Amphibians Declines and Extinctions Worldwide. *Science* 306:1783-1786.
- Voyles J., Young S., Berger L., Campbell C., Voyles W.F., Dinudom A., Cook D., Webb R., Alford R.A., Skerratt L.F. and Speare R. (2009) Pathogenesis of Chytridiomycosis, a Cause of Catastrophic Amphibian Declines. *Science* 326: 582-585.

- Weldon C., du Preez L.H., Hyatt A.D., Muller R. and Spear R. (2004) Origin of the Amphibian Chytrid Fungus. *Emerging Infectious Diseases* 10(12):2100–2104.
- Woodhams D.C., Alford R.A. and Marantelli G. (2003) Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Diseases of Aquatic Organisms* 55:65-67.
- Young B.E., Lips K.R., Reaser J.K., Ibáñez R., Salas A.W., Cedeño J.R., Coloma L.A., Ron S., La Marca E., Meyer J.R., Muñoz A., Bolaños F., Chaves G. and Romo D. (2001) Population declines and Priorities for Amphibian Conservation in Latin America. *Conservation Biology* 15:1213–1223.
- Young B.E., Stuart S. N., Chanson J. S., Cox N. A. y Boucher T.M. (2004) Joyas que están desapareciendo: el estado de los anfibios en el nuevo mundo. NatureServe, Arlington, Virginia.

ANEXO 1

País	Estado	Longitud	Latitud	Género	Especie	Fuente
México	Estado de México	-99.8618	19.8384	<i>Hyla</i>	<i>eximia</i>	Frías-Alvarez <i>et al</i> 2008
México	Estado de México	-99.949	20.0101	<i>Rana</i>	<i>megapoda</i>	Frías-Alvarez <i>et al</i> 2008
México	Oaxaca	-96.6315	17.1944	<i>Hyla</i>	<i>euphorbiaceae</i>	Frías-Alvarez <i>et al</i> 2008
México	Michoacán	-100.2781	19.6686	<i>Ambystoma</i>	<i>rivulare</i>	Frías-Alvarez <i>et al</i> 2008
México	Guerrero	-100.2811	17.2911	<i>Agalychnis</i>	<i>moreletii</i>	Frías-Alvarez <i>et al</i> 2008
México	Estado de México	-99.4166	19.5833	<i>Ambystoma</i>	<i>altamirani</i>	Frías-Alvarez <i>et al</i> 2008
México	Michoacán	-100.2166	20.0333	<i>Ambystoma</i>	<i>granulosum</i>	Frías-Alvarez <i>et al</i> 2008
México	Puebla	-97.3500	19.3666	<i>Ambystoma</i>	<i>velasci</i>	Frías-Alvarez <i>et al</i> 2008
México	Guerrero	-98.6519	17.1272	<i>Exerodonta</i>	<i>melanomma</i>	Frías-Alvarez <i>et al</i> 2008
México	Estado de México	-99.9538	20.0166	<i>Rana</i>	<i>neovolcanica</i>	Frías-Alvarez <i>et al</i> 2008
México	Morelos	-99.0019	18.5019	<i>Rana</i>	<i>spectabilis</i>	Frías-Alvarez <i>et al</i> 2008
México	Distrito Federal	-99.1900	19.3150	<i>Rana</i>	<i>moctezumae</i>	Frías-Alvarez <i>et al</i> 2008
México	Sonora	-119.2500	30.6250	<i>Rana</i>	<i>tarahumarae</i>	Hale, 2001
México	Sonora	-109.3000	30.5916	<i>Rana</i>	<i>tarahumarae</i>	Hale, 2001
México	Sonora	-108.8500	29.7833	<i>Rana</i>	<i>tarahumarae</i>	Hale, 2001
México	Sonora	-108.8000	28.3166	<i>Rana</i>	<i>tarahumarae</i>	Hale, 2001
México	Sonora	-108.7833	28.3000	<i>Rana</i>	<i>tarahumarae</i>	Hale, 2001
México	Sonora	-108.6666	26.9833	<i>Rana</i>	<i>tarahumarae</i>	Hale, 2001
México	Puebla	-97.5726	19.5770	<i>Rana</i>	<i>berlandieri</i>	Santos-Barrera 2004
México	Baja California	-115.6525	30.9164	<i>Rana</i>	<i>aurora</i>	GSB
México	Chiapas	-92.8627	17.1150	<i>Plectrohyla</i>	<i>acanthodes</i>	Quintero-Díaz
México	Chiapas	-92.8605	17.1163	<i>Plectrohyla</i>	<i>ixil</i>	Quintero-Díaz

México	Chiapas	-92.9969	17.1880	<i>Plectrohyla</i>	<i>ixil</i>	Quintero-Díaz
México	Guerrero	-100.1733	17.3933	<i>Craugastor</i>	<i>pygmaeus</i>	MFL/GSB
México	Guerrero	-100.1760	17.4213	<i>Craugastor</i>	<i>uno</i>	MFL/GSB
México	Guerrero	-100.1768	17.4223	<i>Craugastor</i>	<i>pygmaeus</i>	MFL/GSB
Honduras		-86.8000	15.6333	<i>Rana</i>	<i>maculata</i>	Puschendorf <i>et al</i> 2006a
Hondura		-86.8500	15.7000	<i>Eleutherodactylus</i>	<i>aurilegulus</i>	Puschendorf <i>et al</i> 2006a
Panamá		-82.2333	8.7166	<i>Atelopus</i>	<i>varius</i>	Berger <i>et al</i> 1998
Costa Rica		-83.5333	10.0333	<i>Eleutherodactylus</i>	<i>sp</i>	Puschendorf <i>et al</i> 2006b
Costa Rica		-83.5666	10.2333	<i>Eleutherodactylus</i>	<i>sp</i>	Puschendorf <i>et al</i> 2006b
Guatemala		-90.3177	15.2116	<i>Ptychohyla</i>	<i>hypomykter</i>	Mendelson III <i>et al</i> 2004
Guatemala		-90.1955	15.1914	<i>Ptychohyla</i>	<i>hypomykter</i>	Mendelson III <i>et al</i> 2004
Costa Rica	Puntarenas	-82.7333	8.9166	<i>Eleutherodactylus</i>	<i>melanosticus</i>	Lips <i>et al</i> 2003
USA	Arizona	-110.9166	32.4666	<i>Rana</i>	<i>yavapaiensis</i>	Bradley <i>et al</i> 2002
USA	Arizona	-112.3000	33.7833	<i>Rana</i>	<i>yavapaiensis</i>	Bradley <i>et al</i> 2002
USA	Arizona	-111.5000	33.7333	<i>Rana</i>	<i>yavapaiensis</i>	Bradley <i>et al</i> 2002
USA	Arizona	-111.2000	31.4166	<i>Rana</i>	<i>tarahumare</i>	Hale 2001
USA	Colorado	-106.0000	40.6666	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Green <i>et al</i> 2005
USA	Montana	-113.9437	48.7262	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.9957	48.5900	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.9685	48.5623	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.9724	48.5559	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.9638	48.5679	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.9756	48.5864	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.9474	48.5792	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008

USA	Montana	-113.8447	48.8290	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.8682	48.7862	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.5504	48.8390	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.5536	48.8298	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.6799	48.9804	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.8919	48.9566	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.6784	48.9767	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.6783	48.9763	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.9764	48.5550	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-111.2097	46.5005	<i>Rana</i>	<i>luteiventris</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.9514	45.6903	<i>Rana</i>	<i>luteiventris</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.4480	46.8894	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.4406	46.8914	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.4423	46.8948	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.4421	46.8962	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.4440	46.8957	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.4416	46.8951	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.4423	46.8948	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-113.4452	46.8965	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Montana	-112.1738	46.4476	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.4923	44.6707	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.3460	43.8334	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.9639	44.5130	<i>Rana</i>	<i>luteiventris</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.9371	44.5015	<i>Rana</i>	<i>luteiventris</i>	Muths <i>et al</i> 2008

USA	Wyoming	-110.4446	43.0259	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.7228	43.5221	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-1107982	44.9521	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.3423	43.5785	<i>Ambystoma</i>	<i>tigrinum</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.3425	43.5829	<i>Pseudacris</i>	<i>maculata</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-109.9505	43.2982	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.7671	37.3426	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.3271	44.5446	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.6557	42.4939	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.3998	44.5464	<i>Rana</i>	<i>luteiventris</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.3907	44.5939	<i>Rana</i>	<i>luteiventris</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.4018	44.5566	<i>Rana</i>	<i>luteiventris</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.4018	44.5574	<i>Rana</i>	<i>luteiventris</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.7191	43.5208	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.6868	43.5026	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.6713	43.7121	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.6668	44.1316	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.5300	42.7583	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.8089	44.5427	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.6826	44.0885	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.7487	43.6396	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.7490	43.6380	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-110.3994	44.5599	<i>Rana</i>	<i>luteiventris</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Colorado	-106.5971	40.9800	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008

USA	Colorado	-105.8045	40.3178	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Colorado	-106.3402	38.8262	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Colorado	-105.8886	40.2073	<i>Rana</i>	<i>sylvatica</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Colorado	-105.6869	40.3425	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Colorado	-105.8511	40.4103	<i>Rana</i>	<i>sylvatica</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Colorado	-105.8574	40.3782	<i>Pseudacris</i>	<i>maculata</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Colorado	-105.8588	40.3160	<i>Rana</i>	<i>sylvatica</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Colorado	-106.5848	40.9515	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Colorado	-106.6050	40.9410	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-106.4748	41.3279	<i>Rana</i>	<i>sylvatica</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-106.4821	41.3133	<i>Pseudacris</i>	<i>maculata</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-106.4317	41.2340	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-106.4381	41.2325	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-106.4380	41.2326	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008
USA	Wyoming	-106.3798	41.2700	<i>Bufo</i>	<i>boreas</i>	Muths <i>et al</i> 2008