



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

PREVALENCIA DEL HONGO QUÍTRIDIO *Batrachochytrium dendrobatidis* EN ZONAS CONSERVADAS Y FRAGMENTADAS, EN COMUNIDADES DE ANFIBIOS DE LA CUENCA HIDROLÓGICA DE CUIXMALA EN EL ESTADO DE JALISCO, MÉXICO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

JUAN CORTÉS GARCÍA

ASESORES: DR. GERARDO SUZÁN AZPIRI

DR. ANDRÉS GARCÍA AGUAYO

DR. ROBERTO ARNULFO CERVANTES OLIVARES



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.

*En memoria de **Reyes Castillo Escobedo***

Y especialmente para la

Llegada de:

Joanna Daniela Cortés

Elisa Cortés

Y Leonardo Cortés

Nuestros esfuerzos serán por ustedes

Dedicatorias

Juan Cortés Gómez y Estela García Castillo.

Por todos los momentos en que persistieron para que pudiera continuar en el camino y porque siempre han estado preocupados por que alcance lo que quiero. Por ustedes conocí cosas que ni siquiera me hubiera imaginado y ahora dan sentido a seguir, que sin su cariño y esmero simplemente no hubieran existido. Gracias por ser mis padres.

Marcelo Cortés Gómez y Felipa García Castillo.

Por ser mis segundos padres y estar siempre dispuestos a responder por mí, gracias por tenerme siempre en cuenta, quererme como a un hijo y estar siempre a mi lado.

A mi profesión.

A las especies que se encuentran amenazadas, aun podemos hacer un esfuerzo por intentar recuperar la estabilidad que ya hace mucho les hemos robado.



Agradecimientos

Muchas gracias a las instituciones de la UNAM que colaboraron para la realización de este trabajo: Estación biológica de Chamela, Instituto de Ecología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Dr. Gerardo Suzán Azpiri: Por su paciencia, confianza, enseñanzas, darme la oportunidad de participar y conocer otra perspectiva.

Dr. Roberto Arnulfo Cervantes Olivares: Por apoyarme en los momentos en que más perdido me sentía en el proceso de la tesis, su amistad, cariño y por los grandes consejos que me dio.

Dr. Andrés García Aguayo: Porque aunque estando lejos siempre acudió al llamado, gracias por confiar en el proyecto.

A los investigadores que me dedicaron tiempo: MC Oscar Rico Chávez, Dra. Carolina Segundo, Dr. Luis Miguel García Feria, MVZ. David Vallejo Bravo, MC Cinthya Mendoza, Dr. Daniel Martínez Gómez.

Proyecto PAPIIT IN210410-3: Por el apoyo en el laboratorio.

Proyecto PAPIIT IN215910: Por el apoyo para realizar esta tesis.

MVZ Laura Ailed Martínez León: Gracias por el apoyo en todo momento y por recordarme lo importante de las cosas. Tu compañía es lo más grato para mí.

A mis compañeros y amigos interesados en medicina de la conservación: Omar, Paola, Fernando, Shiara, André, Mónica, Juan, Chucho, Ana, Adriana, Karen, Lili, Odín, Rafa, Rafael, Iban, Citlalli, Andrés.

A mis compañeros de laboratorio: Dani, Verónica, Melisa, Karla, Nico, Alejandro, Cecy, Jesús, Sofí, Mariana y Denisse.

A el hospital de especialidades veterinarias San Jerónimo

A mis grandes amigos: Omar, Raskolnikov, Ange, Migue, Legna, Verito, Hugo, Rodrigo, Jovas, Allin, Joshua, Karla, Ninel, Sandra, Damaris, Carlitos, Mariana, Israel, Luan, Diana Vega, Yut, Lorena, Miriam, Meche, Berenice, Karol, Alberto, Ademir, Joyce, Víctor, Charly, Chayo, Adrián, Diego, Cesar, Sortek, Pepewicho, Yoda, Edén, Alpedo, Rulas, Davicho, Suffolk, Omar Hdz, Alesota, Ebert, Ivet, Carme, Lázaro, Lucy, Dulce, Eunice, Siller, Toño, Gabo, Alejandro, Javier doc, Agus, Landa, Juanpa, Julius, Pollo, Hengis, Penélope, Jungo, Jessica, Laín, Kris, León, Maga, Pilar, Erika, Leslie, Chinita, Indira, Alma, Luz, Sharon, Omar "Perú", Joe, Jorge, Mariño, Rockman, Miguel, Mario, Balanzario, Jonathan, Claudia, Armand, Alejandro Avendaño, Deya, Moi, Gaby, Alfredo, Ximena, Pepe, Cristofer, Karina, Claudia, Estrella, Sonia, Pam, Dianis, Yolanda, Ivan Bello, Alex guerrero, Cristofer, Cesi, Rosa, Chiva, Ángel, Ollin, Arturo y a todos los que me faltó por mencionar .

A mi familia: Ricardo, Nayhelli, Javier, Dayana, Daniel, Aidé, Elizabeth, Jessica, Rafa, Raziél, Beca, María, Rafael, Ángeles, Mario, Marcelo, Sandra, Nancy, Luisa, Francisco, Quico, Salvador, Javier G., Javiercito, Miguel, Liz, Miriam, Jazmín, Ali, Nix.

CONTENIDO

	Página
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1 Importancia ecológica	
2.2 Antecedentes	
2.3 Quitridiomycosis	
2.4 Situación actual de los anfibios y la quitridiomycosis en México	
3. Material y métodos.....	9
3.1 Descripción del área de estudio	
3.2 Temporada de estudio	
3.3 Selección del área de estudio	
3.4 Selección del área y sitios	
3.5 Colecta y manejo de la muestra	
4. Resultados	18
5. Discusión y conclusiones.....	20
6. Referencias.....	25
7. Figuras.....	32
8. Cuadros.....	41

1 Resumen

En las últimas décadas las poblaciones de anfibios alrededor del mundo se han visto amenazadas por distintos factores que han contribuido a su declinación. El hongo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* es considerado uno de los principales factores que han propiciado la reducción y en algunos casos la extinción de especies de anfibios.

Para detectar la presencia del hongo en anfibios de la cuenca hidrológica de Cuixmala se realizaron muestreos en épocas de lluvias y de secas en 2010 y 2011. En el estudio se analizaron 10 sitios de toda la cuenca y 3 sitios de la reserva de Chamela, basándonos en la altura y su estado de conservación. Se tomaron hisopados cutáneos de 232 anfibios, las muestras se procesaron por PCR, los datos se analizaron mediante pruebas estadísticas para encontrar su relación con los gradientes de temporalidad, altitudinales y de estado de conservación.

Se detectó la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en un Anuro de la familia Hylidae de la especie *Smilisca fodiens* en la estación biológica de Chamela a los 102 m.snm durante la época de secas y en dos Anuros de la familia Leptodactylidae de la especie *Leptodactylus melanonotus* en la parte media de la cuenca del río Cuitzmala a los 204 m.snm durante la época de lluvias. Todos los casos se encontraron en sitios conservados. Aunque no se encontró una relación entre los gradientes, se logró confirmar la presencia del hongo en la Cuenca hidrológica de Cuixmala y en la estación biológica de Chamela, en ninguno de los dos había sido reportada la presencia del hongo.

2 Introducción

2.1 Importancia ecológica

La aparición de enfermedades infecciosas habían tenido importancia únicamente cuando estaban involucradas con los sistemas de producción y salud humana, pero debido a la aparición de enfermedades emergentes en especies silvestres, surge la necesidad de tomar un enfoque molecular y ecológico que contemple distintas disciplinas para lograr una mejor comprensión de su dinámica ^{1,2,3,4}.

Las enfermedades infecciosas emergentes son aquellas de reciente aparición en poblaciones o aquellas que incrementan rápidamente su incidencia, virulencia o distribución geográfica^{3,5}. Su aparición se ha asociado a un inminente cambio ecológico ocasionado por actividades antropogénicas^{1,2,3,4}.

Los reportes de enfermedades emergentes alrededor del mundo han ido en aumento⁶, en México es posible que parte de la diversidad biológica se pierda por causa de estas enfermedades¹, los estudios que contemplan la ecología de las enfermedades pueden ayudar a determinar la importancia de los factores que favorecen a su ocurrencia ⁷.

Conjuntar herramientas de distintas disciplinas para el estudio en poblaciones silvestres ha contribuido a comprender la dinámica de enfermedades emergentes por patógenos fúngicos de reciente aparición^{4,8}. Un ejemplo es el caso del síndrome de la nariz blanca en murciélagos que ha causado alta mortalidad en el norte de Estados Unidos, en el cual se ven involucrados tanto el agente infeccioso *Geomyces destructans* como la conducta de hibernación

de los murciélagos regulado por la estacionalidad⁹. Otro caso es la quitridiomycosis^{10,11}, enfermedad a la que se le ha relacionado como factor involucrado en el declive poblacional^{12,13,14} y a la extinción de algunas especies de anfibios^{12,15}. Es una enfermedad infecciosa altamente letal considerada emergente con una distribución mundial^{8,10,11,16,17,18}.

2.2 Antecedentes

En la actualidad los anfibios se encuentran dentro de las especies más amenazadas, a tal grado que se habla de una crisis mundial, aproximadamente el 50% de las especies se encuentra en un declive acelerado, colocándolos en la clase de vertebrados más amenazada^{15,19,20,21}.

La declinación de los anfibios fue tomada con mayor seriedad cuando en 1989 se da a conocer, en el primer congreso mundial de herpetología, datos sobre la drástica disminución de los anfibios en diversas localidades del mundo. Según los datos las declinaciones en esa década habían alcanzado hasta el 40% de las especies^{19,20,22}.

Hasta entonces tales declinaciones eran aún enigmáticas, habían ocurrido en zonas con alteración y pérdida de hábitat. Sin embargo, esto también ocurría en sitios prístinos y reservas con vegetación. Las causas eran desconocidas, algo notorio es que se asociaban a zonas tropicales con altas elevaciones, algunos estudios también comenzaban a relacionarlas con agentes patógenos^{13,15,19,20}.

Se han planteado diversas hipótesis para poder explicar la etiología de los descensos drásticos y en la actualidad se mencionan cuatro posibles factores;

pérdida o destrucción de hábitat (fragmentación, cambio de uso de suelo y contaminación), cambio climático (precipitación, alta exposición a rayos ultravioleta y patrones de temperatura), enfermedades emergentes (micótica *Batrachochytrium dendrobatidis*, virales Ranavirus e Iridovirus) y manipulación antropogénica de la biota (sobreexplotación e introducción de especies exóticas)^{23,24}. Los estudios han mostrado que la suma de distintos factores han favorecido a la alta mortalidad de los anfibios^{13,15,19,22,23}.

Los anfibios se caracterizan por ser consumidores secundarios y ser altamente sensibles a los cambios de temperatura y humedad provocados por la alteración vegetal. Su conducta y rendimiento depende directamente de las condiciones ambientales haciéndolos más sensibles a las alteraciones de su hábitat, por lo que se consideran buenos indicadores del estado de conservación^{25,26}. Todas las modificaciones al ambiente como la fragmentación y la modificación del hábitat son factores importantes que participan en la declinación^{25,26}. Sin embargo, las enfermedades emergentes son consideradas los principales factores que ha propiciado la reducción y extinción de las poblaciones de anfibios^{8,10,11,28}.

Se ha sugerido a *Batrachochytrium dendrobatidis*^{10,11} como un agente importante en el declive poblacional^{12,13,14} y a la extinción de algunas especies de anfibios ya que coincide con los casos donde se han visto seriamente afectadas las poblaciones^{12,15}.

2.3 Quitridiomicosis

La quitridiomicosis es una enfermedad infecciosa de la piel, con una alta mortalidad¹⁶ causada por el hongo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) que afecta a diferentes especies de anfibios en vida libre y en cautiverio. Es considerada una enfermedad emergente de distribución mundial^{8,10,16,17,18,27,28}.

El hongo causante de la quitridiomicosis fue descrito por primera vez en 1998 y clasificado en 1999 como una nueva especie^{10,11}. Es el único quítridio capaz de infectar y desarrollarse en las células queratinizadas en la epidermis de anfibios^{11,20,29}. Afecta las zonas queratinizadas de la piel en estadios metamórficos, así como a los adultos y en estructuras bucales de la fase larvaria^{30,31,32}.

La aparición de la quitridiomicosis, ha cambiado radicalmente la visión del estudio de las enfermedades emergentes en animales silvestres, ya que es la primera enfermedad en surgir de sitios prístinos y causar la disminución en las comunidades de anfibios².

La hipótesis de la aparición de la quitridiomicosis incluye tanto la introducción, asistida por el humano, de poblaciones en contacto con el hongo¹³ como la modificación de una persistente relación entre el parásito y el hospedero debido al cambio climático².

El hallazgo más antiguo fue identificado en un ejemplar de la especie *Xenopus leavis* del año 1938 proveniente de África por el comercio internacional, la enfermedad se distribuyó en todo el mundo en los últimos 30 años⁸.

Bd pertenece al reino Fungi, de la división Chytridiomycota, del orden de los Chytridiales^{10,11}. El hongo se caracteriza por presentar zoosporas reproductivas asexuales uniflageladas acuáticas y en algunos casos terrestres, los hongos quitridiales se caracterizan por descomponer celulosa de plantas y queratina en el caso de los anfibios^{10,11,29}.

Su estructura consta de talos monocéntricos o coloniales, zoosporangios que son estructuras rizoides de forma esférica con uno o más tubos de descarga a través del cual se liberan zoosporas al medio externo, cuentan con un flagelo posterior que es móvil en agua dulce¹¹.

Las zoosporas penetran en las células del estrato corneo y el estrato granuloso en los anfibios postmetamórficos o en las células queratinizadas de las piezas bucales de las larvas, dentro de la célula las zoosporas se convierten en zoosporangios en el citoplasma de la célula invadida. El zoosporangio libera nuevas zoosporas al exterior a través del tubo de descarga para invadir a las células adyacentes y formar colonias que continuarán liberando zoosporas al medio ambiente¹⁶ (Figura 1).

Desde que se aisló por primera vez al hongo se han desarrollado diferentes técnicas para el diagnóstico de la quitridiomycosis que van desde serología, histopatología, histoquímica, microscopía electrónica y hasta técnicas moleculares (PCR convencional, PCR anidado y TaqMan rtPCR)¹⁸.

Para el monitoreo del hongo en poblaciones de vida libre el método más recomendado es la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real por ser altamente sensible y específica, con fácil repetitividad y reproductibilidad a comparación de las demás técnicas. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que la reacción en cadena de la polimerasa anidada resulta ser la técnica más efectiva para detectar bajos niveles de infección por el hongo. Esto es porque las muestras tomadas a individuos en vida libre contienen otros microorganismos y una elevada humedad que pueden degradar o contaminar el ADN del hongo, lo que resulta en falsos positivos o negativos para la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

La reacción en cadena de la polimerasa anidada es un método efectivo con alta sensibilidad cuando se tienen muestras contaminadas y degradadas. El procedimiento consiste en hacer una primera amplificación, una segunda y hasta una tercera amplificación. La lógica detrás de esta técnica es que al hacer la primera amplificación se puede tener un resultado equivocado, al hacer una segunda amplificación disminuye la probabilidad de error y al hacer una tercera amplificación aumenta la cantidad de ADN objetivo y con esto la posibilidad de obtener con éxito únicamente el ADN objetivo¹⁸.

La distribución mundial de los casos de quitridiomicosis se ha asociado a especies que habitan bosques tropicales por encima de los 1200 metros sobre el nivel del mar (m.snm) en épocas de frío, como lo son las épocas de lluvias, y puede afectar a todos los anfibios.

2.4 Situación actual de los anfibios y la quitridiomycosis en México.

México es un país megadiverso en cuanto a su flora y fauna resultado de su compleja historia geológica, topográfica y climática que han permitido el establecimiento de gran variedad de especies²⁶. En cuanto a los anfibios ocupa el quinto lugar a nivel mundial, se conocen a la fecha 372 especies de anfibios registrados³³.

La República Mexicana es un centro de endemismos y ocupa el tercer lugar a nivel mundial con 250 especies endémicas de anfibios^{26,33}. A pesar de la alta biodiversidad, con un elevado número de especies endémicas, muchas de las especies presentan problemas de conservación¹⁹. Se encuentra en el segundo lugar a nivel mundial con mayor número de especies en riesgo de extinción debido a que más del 58% están amenazadas por diversas causas³³.

En México los casos de quitridiomycosis se han reportado desde 2001 hasta el 2012, en Sonora (2001), en la montaña de la Sierra de Juárez en el estado de Oaxaca y agua de Obispo en Guerrero (2004), Michoacán (2004), Morelos (2004), Puebla (2004), Estado de México (2004), Distrito Federal (2008), Chiapas y Baja California (2012)^{23,28,34,35}.

Aunque se ha visto una distribución mundial de la quitridiomycosis¹², en México aún no se han hecho suficientes estudios para esclarecer la situación de los anfibios con respecto al hongo y su distribución^{23,28,34,35}, resulta necesario mantener un monitoreo constante de las poblaciones en vida libre por la gran diversidad de anfibios con endemismos de las zonas neotropicales como lo es la costa de Jalisco. La cuenca hidrológica de Jalisco es un modelo idóneo de

distribución para detectar la enfermedad y de importancia prioritaria para detectar agentes infecciosos emergentes como *Bd*^{1,2,3,4,5,6,7,17,18}.

El objetivo de este estudio es detectar la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en comunidades de anfibios de la cuenca hidrológica de Cuixmala en Jalisco, mediante el diagnóstico molecular con la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidado para relacionarlo a distintos gradientes altitudinales y de perturbación en las épocas de secas y lluvias del año 2011 para conocer su situación ecológica con respecto al hongo y los factores que pueden estar asociados.

3 Materiales y métodos

3.1 Descripción del área de estudio

La región de la cuenca hidrológica de Cuixmala se ubica en la zona costera central de Jalisco, México^{37,39} (Figura 2). La región es una planicie costera suroccidental, que comprende desde los 0 metros sobre el nivel del mar hasta los 500 metros sobre el nivel del mar, incluye una riqueza florística con más de 1000 especies de plantas vasculares y faunística con 19 especies de anfibios, 68 de reptiles, 270 de aves y 72 de mamíferos^{36,37,38}. Las especies de anfibios de la región están comprendidos sólo en el orden de los Anuros, las especies que se han reportado se encuentran en siete familias: Bufonidae, Eleutherodactylidae, Craugastoridae, Leptodactylidae, Hylidae, Microhylidae y Ranidae^{36,40}.

Los principales tipos de vegetación presentes en el área son; selva baja caducifolia o bosque tropical caducifolio, selva baja subperennifolia, vegetación riparia, manglar, matorral xerófilo, palmar, carrizal, manzanillera, cultivos y pastizales inducidos^{36,37,38}.

El clima es tropical, cálido-húmedo, con temperatura media anual de 25 °C y con dos estaciones bien definidas, la de lluvias, de julio a octubre y la de secas de noviembre a junio. La precipitación promedio anual varía de 748 a 1000 mm^{36,37,38}. Los ríos más importantes son el Marabasco o Cihuatlán, Purificación, Cuitzmala, San Nicolás, Tomatlán y Mascota^{36,37,39}.

El río Cuitzmala se encuentra en relación con el río San Nicolás formando la cuenca San Nicolás – Cuitzmala, que abastece a los municipios de Talpa de Allende, Tomatlán, Villa Purificación, La Huerta, Ayutla y Cuautla³⁹. Cuenta con una extensión territorial de 1089 km² y su ubicación geográfica es latitud norte 19.375181° longitud oeste 104.987651° hasta latitud norte 19.803102° longitud oeste 104.716701°⁴¹ (Figura 3).

3.2 Temporada de estudio

Se realizaron dos muestreos prospectivos en 2010; el primero en época de secas con nueve días del 24 de julio al 01 de agosto, el segundo en época de lluvias de diez días del 21 al 30 de septiembre. Durante el estudio se realizaron dos muestreos en el año 2011 para abarcar la época de lluvias con nueve días, del 26 de mayo a 30 de junio y secas con diez días, del 04 al 13 de diciembre.

3.3 Selección del área y sitios

Se escogió la cuenca del río Cuitzmala por estar asociada a una gran variedad de endemismos con 38 especies en la costa del Pacífico, de las cuales la herpetofauna representa el 46% de la región con 11 especies endémicas de anfibios, la zona se ajusta a la logística del estudio por tener buenas vías de acceso cerca de la Estación Biológica de Chamela (Figura 3), que fue utilizada como base de referencia para llegar a los sitios seleccionados de la cuenca del río de Cuitzmala. Algo importante a destacar es que la especie *Eleutherodactylus modestus* es endémica de la región de Chamela (Cuadro 1), con distribución restringida en esta zona⁴⁰.

Los mapas y la clasificación de la zona se realizaron utilizando el software ArcView 3.x (Figuras 4, 5, 6).

Se clasificó la cuenca por altitud en tres zonas; cuenca baja, cuenca media y cuenca alta, todas las zonas se categorizaron por su uso y vegetación por medio de sistemas de información geográfica (Figura 4). La zona de la cuenca baja contemplada para el estudio tiene una elevación que va de 7 m.snm a los 30 m.snm, la cuenca media comprende de los 178 m.snm a los 204 m.snm y la cuenca alta de los 501 m.snm a los 652 m.snm. En el caso de los sitios de Chamela no entran dentro de esta clasificación pero se anexa como estudio prospectivo (Cuadro 2).

Se seleccionaron cuatro sitios por categoría de la cuenca (alta, media y baja), dos sitios conservados y dos sitios perturbados (Figura 5). En total doce sitios potenciales siguiendo el cauce del río Cuitzmala (Figura 5). Se exploró la zona

y no todos los sitios fueron viables para el acceso, únicamente se accedió a diez sitios (Figura 6). Se utilizó también la referencia de la Estación Biológica de Chamela ya que algunas muestras tomadas durante el estudio fueron relevantes, se anexó al registro una captura que se tuvo en un asentamiento humano de la localidad más cercana a la cuenca baja. Las coordenadas de los puntos se registraron con un GPS (Global Positioning System) "GARMIN; Etrex Legend" (Cuadro 2).

3.4 Diseño del estudio

Se contemplan las poblaciones de las especies de anfibios reportados en la zona, la cual está conformada por individuos del Orden Anura, en total 7 Familias con 19 especies reportadas en la costa de Jalisco, México, de las cuales 11 son endémicas de México (Cuadro 1).

Teniendo en cuenta que de las 19 especies de anfibios 14 son nocturnas y 5 diurnas⁴⁰, el horario de revisión de las trampas de caída y cercas de desvío se realizó durante la mañana entre las 7 am a 8 am y la búsqueda por encuentro ocasional durante la mañana entre las 8 am a las 9 am y noche entre las 8 pm a 10 pm, para intentar abarcar tanto a las especies nocturnas como a las diurnas, los lapsos de muestreo tomaron 2 horas que incluían la captura y toma de la muestra con registro.

En cada punto se colocó un sistema de trampeo que consistió en trampas de caída con cercas de desvío. Las trampas de caída fueron cubetas de plástico de 19 litros de capacidad, de 30 cm de diámetro y 35 cm de alto enterradas hasta el nivel de la superficie⁴².

Las cercas de desvió se construyeron con plástico grueso de 300 cm de longitud por 45 cm de alto con una separación de 100 cm entre cada una de ellas⁴². La forma de ponerlas se adaptó a las condiciones de la zona en los puntos seleccionados, todas con alguna asociación al cuerpo de agua; permanentes, efímeros, y temporales. Para aquellos cuerpos de agua de gran extensión, se colocaron de forma paralela al cauce a una distancia de 100 cm a 300 cm del cuerpo de agua, para el caso de las charcas con tendencia a la forma circular se colocaron alrededor⁴² (Figura 7).

3.5 Captura y manejo de la muestra

Se muestrearon todos los anfibios en etapa metamórfica y adulta encontrados de forma ocasional en la cercanía de los sitios por eventos visuales en las áreas definidas y a los capturados por las trampas.

A cada individuo se le tomó una muestra cutánea por medio de hisopado usando la técnica recomendada según Hayatt y colaboradores en el 2007. La técnica consistió en pasar girando un hisopo estéril de rayón con punta fina por el cuerpo del individuo, pasando 5 veces por el dorso, 5 veces por el vientre, 5 veces por el costado, 5 veces en las ancas y con mayor énfasis entre cada falange o membrana interdigital en el caso de presentarse esto debido a que son las zonas más queratinizadas en los anfibios y donde se ha visto puede llegar a encontrarse las zoosporas del hongo⁴⁶ (Figura 8).

El hisopo se colocó en un tubo estéril con tapa vacío, se cortó lo suficiente del mango metálico para que al cerrarlo el resto no tocara la tapa del tubo y se identificó con un marcador de aceite indeleble con la clave de la muestra que corresponde con el reportado en la hoja de registro⁴⁵ (Figura 8).

Las muestras se almacenaron en refrigeración hasta su estudio en el laboratorio. La forma de tomar las muestras se basan en las recomendadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (por sus siglas en inglés OIE) y las reportadas en estudios previos^{18,45,47}.

Los individuos se registraron por medio de un formato de registro en una hoja de campo, considerando los aspectos que sirvieran para la determinación de la especie, sus características y las condiciones del medio en que se encontró, para el estudio los datos contemplados fueron:

- Datos generales: Nombre del realizador del registro, número de hoja de censo de anfibios muestreados, localidad, fecha (Cuadro 5).
- Datos de la especie: Número de registro, hora, especie, edad, largo de hocico cloaca, vegetación, descripción del microhábitat, punto de colecta, elevación, comentarios (Cuadro 5).

Para determinar la especie de los individuos se consultaron las guías de campo: “Guía de campo de anfibios de la costa de Jalisco” y “Claves ilustradas de los anfibios y reptiles de la región de Chamela, Jalisco”^{36,40}.

La secuencia de la toma de muestra se busco la siguiente metodología:

1. Encuentro visual y captura manual: todos los individuos se manipularon con guantes de nitrilo desechables cambiando entre cada uno.
2. Muestreo del individuo por hisopado cutáneo: se utilizaron hisopos de punta fina de rayón con mango de aluminio estériles de la marca "Pur-Wraps®".
3. Almacenamiento de la muestra: Se corta el mango del hisopo depositando dentro un tubo estéril "Eppendorf®", se rotula, se flamea las tijeras utilizadas para cortar el hisopo entre cada muestra, y se almacena en una caja de tubos para su refrigeración a 4 °C.
4. Identificación del individuo y registro: Se toman los datos merísticos del individuo, se siguen la guía y claves para determinar la especie y se llenan los datos en la hoja de registro.
5. Se libera al individuo en la zona donde se capturó (Figura 8).

Las muestras se almacenaron en refrigeración a 4 °C hasta su estudio en el laboratorio y se procesaron por medio de un PCR anidado en el laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Se realizó la extracción de ADN del hongo a partir de los hisopados colectados de los anfibios, la extracción de ADN se realizó con el kit para extracción "GF-1 Tissue DNA Extraccion Kit" de la marca "Vivantis®".

Las pruebas de PCR anidado se realizaron a cada muestra para descartar posibles casos de falsos positivos, o falsos negativos que puedan presentarse por los bajos niveles del ADN objetivo en la muestra, inhibición de la PCR por la suciedad en hisopos o, posiblemente, las secreciones de la piel del anfibio^{12,18,44}. Los iniciadores que se utilizaron fueron los reportados por Annis en 2004⁴³, Bd1a 5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3' y Bd2a 5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3', ya que son específicos para el hongo.

La técnica se basó en la descrita por Annis en 2004⁴³ considerando las modificaciones de Skerratt 2008¹⁸, se utilizó sólo el PCR anidado dado que el PCR en tiempo real a pesar de ser una prueba más sensible, se ha visto que llega a amplificar únicamente cepas del hongo altamente patógenas, y las de menor patogenicidad puede llegar a no detectarlas, además el PCR anidado es una técnica con menos costos que el PCR en tiempo real¹⁸ (Cuadros 6, 7).

Para cada prueba se utilizó un control positivo de la cepa del cultivo "JEL 423" (cepa aislada de la especie *Phyllomedusa lemur* en el Copé Panamá) de *Batrachochytrium dendrobatidis* suministrada por Joyce Longcore de la Universidad de Maine en Estados Unidos, con la que cuenta el laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y para el control negativo se utilizó agua bidestilada estéril.

Los productos de las reacciones se visualizaron en un gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio, se utilizó un marcador de pares de bases de 1kb de la marca "Vivantis®" para detectar los pares de bases que se amplifican a 300 pares de bases con la técnica de PCR (Cuadro 8).

Las reacciones se anotaban en una base de datos donde se reportaban como resultados negativos donde no se visualiza la banda o positivos donde si se visualiza. Una vez obtenidos todos los resultados se analizó la prevalencia de la enfermedad de individuos capturados durante el estudio mediante la siguiente formula.

$P = n_i/N$. Dónde: n_i = número de individuos positivos

P = prevalencia N = número total de individuos
muestreados

Se comparó la prevalencia con el gradiente altitudinal con el fin de buscar una posible correlación por medio de una regresión lineal.

Para ver si la prevalencia se relacionaba con la estacionalidad se utilizó una prueba de “T de student” para comparar la prevalencia de la época de secas contra la de lluvias en cada año.

La fragmentación se estimó utilizando un “Índice de fragmentación F”⁴⁸, para esto se utilizaron mapas del programa de libre acceso “Google Earth Pro®” en dónde se buscaron los sitios según la referencia en coordenadas tomadas con GPS, con las herramientas del programas se trazaron circunferencias de un kilómetro (8 Ha) en cada punto y se trazaron con la herramienta de polígonos las zonas con vegetación. Las manchas que se formaban se utilizaron para estimar el índice con la fórmula:

$F = \text{superficie total del hábitat} / (\text{número de manchas} \times \text{dispersión de las manchas})$

Donde, dispersión de manchas (R_c)= $2d_c (\lambda/\pi)$

d_c = distancia desde una mancha hasta la mancha más cercana/100= distancia media en hectáreas por metro.

λ = densidad media de manchas (número de manchas/superficie total del área de estudio en hectáreas) X 100 =número de manchas por cada 100 ha.

El índice de fragmentación se comparó con la prevalencia para poder ver si es que se tiene una relación entre la perturbación del ambiente con la presencia del hongo.

4 Resultados

Se obtuvieron 232 registros del orden Anura de 5 familias, 11 géneros y 17 especies diferentes en las que se encontraban; 9 de *Rhinella marina*, 35 de *Incilius marmoreus*, 66 de *Incilius mazatlanensis*, 10 de *Craugastor hobartsmithi*, 1 de *Eleutherodactylus modestus*, 14 de *Eleutherodactylus nitidus*, 3 de *Eleutherodactylus occidentalis*, 44 de *Leptodactylus melanonotus*, 1 de *Tlalocohyla smithii*, 2 de *Agalychnis dacnicolor*, 3 de *Smilisca fodiens*, 1 de *Trachycephalus typhonius*, 2 de *Smilisca baudini*, 1 de *Diaglena spatulata*, 4 de *Hypopachus ustus*, 4 de *Hypopachus variolosus*, 28 de *Lithobates forreri* y cuatro no se lograron identificar por la condición deteriorada en la que estaban.

(Cuadro 17)

Del muestreo se colectaron un total de 188 muestras útiles para las pruebas de PCR mientras que 44 no fueron viables (Cuadro 17). Para el 2010 en la época de secas se obtuvieron 12 muestras viables y 29 muestras para la temporada

de lluvias, 87 muestras para el 2011 en la temporada de secas y 60 muestras en la temporada de lluvias.

En el estudio prospectivo de 2010 se obtuvo una muestra positiva a *Batrachochytrium dendrobatidis* identificada como Ch2010-1 que logro amplificar una banda de 300pb en la prueba de PCR, la muestra fue tomada en la temporada de secas en la estación biológica tropical de Chamela a una elevación de 102 m.snm. Representó el 0.08% de la prevalencia (Cuadro 4) para ese muestreo. La muestra positiva pertenecía a un adulto de la especie *Smilisca fodiens* la muestra fue piel del individuo encontrado muerto a un costado de la entrada a la estación en la época de secas del 2010.

En la temporada de lluvias de 2010 y en la temporada de secas de 2011 no se obtuvieron ningún resultado positivo a *Bd* en la prueba de PCR.

Se obtuvieron dos muestras positivas a *Bd* en la prueba de PCR en el último muestreo de 2011 temporada de lluvias, las muestras provenían de la especie *Leptodactylus melanonotus* de la parte media de la cuenca en el punto conservado M/5 a una elevación de 204 m.snm lo que representó el 0.22% de la prevalencia en el último muestreo (Figura 10).

En la prueba de la regresión lineal para buscar una correlación entre la prevalencia y la elevación en 2010; en la época de secas una $R^2=0.9$, mientras que en la época de lluvias no se obtuvo ninguna correlación puesto que no existía una prevalencia. En 2011 para la época de secas no se obtuvo una prevalencia, en época de lluvias se obtuvo una $R^2=0.0009$. En una prueba de regresión lineal hecha para los dos años la $R^2=0.0006$.

5 Discusión y conclusiones

Las especies encontradas en este estudio representaron más del 80% de las especies reportadas en la zona, el éxito en la variedad de las especies reportadas puede estar relacionado a que las características ecogeográficas de la cuenca, cuenta con todos los tipos de vegetación y ambientes en los cuales habitan la mayoría de las especies tropicales de las costas del pacífico^{36,40}, el esfuerzo del estudio logro abarcar horarios diurnos y nocturnos en los cuales tienen mayor actividad las especies de anfibios en la zona.

En el caso particular de la especie *Leptodactylus melanonotus* que resulto la segunda especie con mayor cantidad de registros y fue positiva a la prueba de PCR en dos ocasiones, concuerda con la amplia distribución que se ha reportado tanto en la zona centro de México como en ambas zonas costeras de la República Mexicana, es muy frecuente encontrarlas durante la época de lluvia en charcos o cerca de ríos entre la vegetación⁴⁰, la presencia del hongo en relación a este comportamiento de la especie puede ser explicada por la propuesta de varios estudios en los cuales se indican que la virulencia del hongo es mayor en especies asociadas a cuerpos de agua y al movimiento de zoosporas en la misma^{7,19}. Además de esta asociación, el efecto de la quitridiomycosis en algunas especies depende de factores como la densidad de la población, que en este caso es alta en relación a las demás especies¹⁹.

En el caso de la especie *Smilisca fodiens* tuvo pocos registros pero fue positiva en una ocasión a la prueba, es una especie que en contraste a *Leptodactylus melanonotus* limita su distribución a las costas y la zona montañosa del

Pacífico, es una especie principalmente nocturna que suele salir solo en épocas de lluvias cuando se reproduce. En estudios previos se ha discutido acerca de la correlación que existe entre la distribución de *Bd* y la disminución de poblaciones de distintas especies^{3,5,10,12}, la presencia de la enfermedad puede contribuir a una alta mortalidad en zonas donde habitan especies asociadas a cuerpos de agua⁷, esto se ha visto principalmente en comunidades pequeñas de anfibios con rangos geográficos restringidos¹⁰, lo que sugiere que sitios donde se encuentra presente el hongo pueden ser susceptibles a mortalidades altas y a dispersar la enfermedad rápidamente a través del agua poniendo en riesgo a comunidades de anfibios que restringen su distribución, tal es el caso de *Smilisca fodiens* y las especies endémicas.

La zona costera de Jalisco tiene características particulares que albergan diversas especies endémicas, en este estudio logramos obtener el primer registro de la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* para la zona de la cuenca hidrológica de Cuixmala en especies que tienen conductas diferentes pero que en común están asociadas a cuerpos de agua y a diversas especies que convergen en la zona.

Los casos positivos en este estudio fueron encontrados únicamente en zonas clasificadas como conservadas, la mayor prevalencia coincidió con la zona con mayor grado de conservación que se encontraba en la parte media de la cuenca a los 102 m.snm y 204 m.snm en ambos casos por la composición de la cuenca la distribución de los rangos altitudinales están por debajo de los rangos en los que se encuentran la mayoría de los reportes de *Bd* en México que es entre los 600 y los 3000 m.snm principalmente en la zona centro^{23,28}.

Recientemente se reporto en Baja California la presencia del *Bd* en zonas por debajo de los 100 m.snm pero en ambientes aridos³⁵.

La prevalencia encontrada en el estudio (en secas a los 102 msnm de 0.08% y en lluvias a los 204 msnm 0.22%) refleja una diferencia significativa en la temporada más calurosa a principio de la temporada de secas donde fue más baja contra finales de la época de lluvias donde el clima suele ser mas frio.

La relación encontrada con la prueba de T en 2010 muestra una clara relación entre la altura con la presentación de la enfermedad, en 2011 aunque poca también se observó cierta tendencia. En la prueba de T para comprobar si existía una relación entre la altura y la prevalencia no se obtuvo una relación significativa en todo el estudio pero se nota cierta tendencia estadística.

Todo lo anterior coincide con la asociación del hongo a las variables medioambientales entre las cuales las más notables son la temperatura y la altitud²⁰, en este estudio no se tuvo una prevalencia en la zona más alta lo cual difiere con la teoría de que la ocurrencia de los casos aumenta con la altitud⁴⁹, pero coincide con otros estudios en los cuales se observo que la presencia de *Bd* es menor en altitudes bajas de climas tropicales, como los que se encuentran más cercanos al ecuador haciendo alusión a que elevaciones bajas en trópico suelen ser muy calientes y limitan el efecto del hongo en las especies¹⁶, los resultados de este estudio apoyan la teoría de que la altitud a la que se encuentren las especies puede limitar el efecto del quitridio⁵⁰.

Ninguno de los anfibios estudiados fue encontrado con signos de la enfermedad, pero en México ya se han reportado casos positivos en los cuales los individuos se encuentran asintomáticos al momento del estudio³⁵.

Conclusiones

Un aspecto que llama la atención es que mientras en diferentes países se han reportado epizootias de la enfermedad, en algunas comunidades de anfibios susceptibles, como es el caso de México, pueden coexistir junto a *Bd* sin presentar la enfermedad.

La presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en especies nativas sin signos clínicos de la enfermedad sugiere que puede ser endémica de la región, sin embargo no se puede descartar la posibilidad de que haya sido introducida por especies no nativas de la zona o por las interacciones del hombre en el manejo de la biota de la región y que la presencia de la enfermedad tenga relación con la susceptibilidad a la enfermedad.

En cualquier escenario se deben adaptar medidas preventivas para evitar la diseminación del hongo en la región en especial por el cuidado de las especies nativas.

Dado que la muestra arrojó una prevalencia baja no es posible poder determinar de forma significativa una relación entre las características de la zona, tanto la altura como la temporalidad están bien determinadas y valdría la pena quizá enfocar más el estudio a especies abundantes como lo es *Leptodactylus melanonotus* que resultó positiva a la prueba, el hongo podría estarse manteniendo y siendo transportado a través de especies generalistas.

Aunque no se obtuvieron muchos positivos a la prueba de PCR se logró evidenciar que existe la presencia del patógeno en una zona para la que no estaba reportada, resulta necesario poder seguir teniendo un monitoreo para realmente conocer si existe un patrón en la aparición del patógeno, es de importancia ecológica poder determinar la situación ecológica de los anfibios en México, por el gran valor de las especies con las que cuenta en especial las endémicas.

6 Referencias

- 1.- Suzán AG, Galindo MF, Ceballos GC. La importancia del estudio de enfermedades en la conservación de fauna silvestre. *Veterinaria México* 2000; 31:223-230.
- 2.- Daszak P, Cunningham AA y Hyatt DA. Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. *Wildlife Ecology* 2000; 287:443-449.
- 3.- Velo-Antón G, Rodríguez D, Savage AE, Parra-Olea G, Lips KR y Zamudio KR. Amphibian-killing fungus loses genetic diversity as it spreads across the New World. *Biological Conservation* 2012; 146:213–218.
- 4.- Borer ET, Antonovics J, Kinkel LL, Hudson PJ, Daszak P, Ferrari MJ, Garrett KA, Parrish CR, Read AF y Rizzo DM. Bridging taxonomic and disciplinary divides in infectious disease. *EcoHealth* 2011; 8: 261–267.
- 5.- Daszak P, Cunningham AA y Hyatt DA. Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and distributions* 2003; 9:141-150.
- 6.- Daszak P, Cunningham AA y Hyatt DA. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica* 2001;78; 103-116.
- 7.- Woodhams DC, Bigler L y Marschang R. Tolerance of fungal infection in European water frogs exposed to *Batrachochytrium dendrobatidis* after experimental reduction of innate immune defenses. *Veterinary Research*. 2012; 8:197.

- 8.- Weldon C, du Preez LH, Hyatt AD, Muller R y Speare R, Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging infectious disease*. 2004; 10(12): 2100-2115.
- 9.- Blehert DS, Hicks AC, Behr M, Meteyer CU, Berlowski-Zier BM, Buckles EL, Coleman JTH, Darling SR, Gargas A, Niver R, Okoniewski JC, Rudd RJ y Stone WB. Bat white-nose syndrome: an emerging fungal pathogen? *Science*. 2009; 323:227.
- 10.- Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham AA, Goggin CL, Slocombe R, Ragan MA, Hyatt AD, McDonald KR, Hines HB, Lips KR, Marantelli G y Parkes H. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Population Biology*. 1998; 95: 9031–9036.
- 11.- Longcore JE, Pessier AP y Nichols DK. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*. 1999; 91:219-227.
- 12.- Skerratt LF, Berger L, Speare R, Cashins S, McDonald KR, Phillott AD, Hines HB y Kenyon N. Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth*. 2007 10.1007/s10393-007- 0093-5.
- 13.- Collins JP y Storfer A. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions*. 2003; 9:89–98.
- 14.- Carey C, Bradford DF, Brunner JL, Collins JP, Davidson EW, Longcore JE, Ouellet M, Pessier AP, Schock DM. Biotic factors in amphibian population declines. In: Linder G, Krest SK, Sparling DW y eds. *Amphibian Decline: An Integrated Analysis of Multiple Stressor Effects*. Pensacola: Society of Environmental Toxicology and Chemistry Press. 2003:153-208.

- 15.- Pounds AJ, Bustamante MR, Coloma LA, Consuegra JA, Fogden MPL, Foster PN, *et al.* Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 2006; 439:161–167.
- 16.- Berger L, Marantelli G, Skerratt LF y Speare R. Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. *Diseases of Aquatic Organisms* 2005; 68: 47–50.
- 17.- Santiago RR. Predicting the Distribution of the Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica* 2005; 37(2): 209–221.
- 18.- Skerratt LF, Berger L, Hines HB, McDonald KR, Mendez D y Speare R. Survey protocol for detecting chytridiomycosis in all Australian frog populations. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2008; 80: 85-94.
- 19.- Stuart NS, Chanson SJ, Cox AN, Young EB, Rodrigues SLA, Fischman LD y Waller WR. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*. 2004; 306:1783-1786.
- 20.- Fisher MC, Garner TW y Walker SF. Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. *Annu Rev Microbiol.* 2009; 63:291-310.
- 21.- Desmore CL. Global Amphibian Declines: Perspectives from the United States and beyond. 2011; 329-335.
- 22.- 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 y Romo D. Population declines and priorities for Amphibian Conservation in Latin America. *Conservation Biology*. 2001; 15:1213–1223.

- 23.- Lips K.R., Mendelson J.R., Muñoz-Alonso A., Canseco-Márquez L. y Mulcahy D.G. Amphibian population declines in montane Southern México: resurveys of historical localities. *Biological Conservation*. 2004; 119:555-564.
- 24.- Densmore CL. Amphibian declines: perspectives from the United States and beyond. 2011;329-335.
- 25.- Petranka, J.W, Eldridge, M.E y Haley, K.E. Effects of timber harvesting on souther appalachian salamander. *Conservation Biology*. 1993; 7: 363-370.
- 26.- Flores Villela O. y L. Canseco-Márquez. Nuevas especies y cambios taxonómicos para la herpetofauna de México. *Acta Zoológica Mexicana*. 2004; 20(2):115-144.
- 27.- Santiago RR. Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica* 2005; 37(2): 209–221.
- 28.- Frias P, Vredenburg VT, Lopez MF, Longcore JE, Gonzalez E, Santos G, Zambrano L y Parra G. Chytridiomycosis survey in wild and captive mexican amphibians. *EcoHealth* 2008; 5: 18-26.
- 29.- Kilpatrick AM, Briggs CJ y Daszak P. The ecology and impact of chytridiomycosis: an Emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology and Evolution* 2009; 30(10): 1-11.
- 30.- Fellers GM, Green DE y Longcore JE. Oral chytridiomycosis in the mountain yellow-legged frog (*Rana muscosa*). *Copeia* 2001; 4: 945-953.
- 31.- Marantelli G, Berger L, Speare R y Keegan L. Distribution of the amphibians chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin during tadpole development. *Pacific Conservation Biology* 2004; 10: 173-179.

- 32.- Rachowicz LJ y Vredenburg VT. Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life states. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004; 61: 75-83.
- 33.- Frias-Alvarez P, Zuñiga-Vega JJ y Flores-Villela O. A general assessment of the conservation status and decline trends of Mexican amphibians. *Biodiversity and conservations*. 2010; 19(13): 3699-3742.
- 34.- Hale Sf, Philp CR, James LJ y Gregory AB. Effects of the chytrid fungus on the Tarahumara frog (*Rana tarahumarae*) in Arizona and Sonora, Mexico. *USDA Forest service Proceedings*. 2005;36:407-411.
- 35.- Luja HV, Rodríguez-Estrella R, Ratzlaff K, Parra-Olea G y Ramírez-Bautista A. The Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in isolated populations of the Baja California Treefrog *Pseudacris Hypochondriaca curta* in Baja California sur Mexico. *The Southwestern Naturalist*. 2012; 57(3):323-327.
- 36.- García A y Ceballos G. Guía de campo de los reptiles y anfibios de la costa de Jalisco, México. Fundación ecológica de Cuixmala, A.C. Instituto de Biología, UNAM 1994.
- 37.- García A, Valtierra-Azotla M, Cuarón A y Ceballos G. Tendencias poblaciones de *Crocodylus acutus* en condiciones de protección en la Reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala, Jalisco, México. *Revista Latinoamericana de Conservación*. 2010; 1 (2): 52-62.38.- Navarro-García JC, García A y Méndez FR. Estacionalidad, eficiencia termorreguladora de *Aspidoscelis lineatissima* (*Sauria teiideae*) y la calidad térmica del bosque tropical caducifolio en Chamela, Jalisco, México. *Revista mexicana de la biodiversidad*. 2008; 79:413-419.

- 39.- INEGI. Conjunto de Datos Geográficos de la Carta Hidrológica de Aguas Superficiales. <http://www.ceajalisco.gob.mx/cuencas/sannicolas-cuitz.html>. Consultado en noviembre del 2012.
- 40.- Ramírez BA. 1994. Manual y Claves ilustradas de los anfibios y reptiles de la Región de Chamela, Jalisco, México. Cuadernos del Instituto de Biología, UNAM No. 23.
- 41.- Martínez-Trinidad S, Cotler H, Etchevers-Barra JD, Ordaz Chaparro VM y de León FG. Effect of Management on Soil Aggregation in a Tropical Dry Ecosystem. *Terra Latinoamericana*.2008; 26(4):299-307.
- 42.- Crosswhite DL, Fox SF y Thill RE. Comparison of Methods for Monitoring Reptiles and Amphibians in Upland Forests of the Ouachita Mountains Proc. Okla. Acad. Sci. 1999; 79:45-50.
- 43.- Annis S L, Dastoor P, Ziel H, Daszak P y Longcore J E. 1A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases*. 2004;40;(3) pp. 420–428.
- 44.- Boyle DG, Boyle DB, Olsen V, Morgan JAT y Hyatt AD. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis Aquat Org* 2004; 60:141–148.
- 45.- Hyatt AD, Boyle DG, Olsen V, Boyle DB, Berger L, Obendorf D, Dalton A, Kriger K, Hero M, Hines H, Phillott R, Campbell R, Marantelli G, Gleason F y Colling A. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of aquatic organisms* 2007; 73:175-192.

- 46.- Olsen V, Hyatt AD, Boyle DG y Méndez D. Co-localisation of *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin for enhanced diagnosis of chytridiomycosis in frogs. *Dis aquat Organ* 2004; 61 (1-2): 85-88.
- 47.- Kirshtein JD, Anderson CW, Wood JS, Longcore JE y Voytek MA. Quantitative PCR detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* DNA from sediments and water. 2007; 77:11-15.
- 48.- Rodríguez GL, Amezaga IA y Onaindia MO. Landscape pattern and change level in the Urdaibai Biosphere Reserve. *Naturzale* 2008;19: 149-165.
- 49.- Kriger K.M. y Hero J.M. Altitudinal distribution of chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) infection in subtropical Australian frogs *Austral Ecology* 2008: 33;1022-1032.
- 50.- Puschendorf R., Castañeda F. y McCranie. Chytridiomycosis in wild frogs from Pico Bonito National Park, Honduras. *EcoHealth* 2006: 3;178-181.

7 Figuras

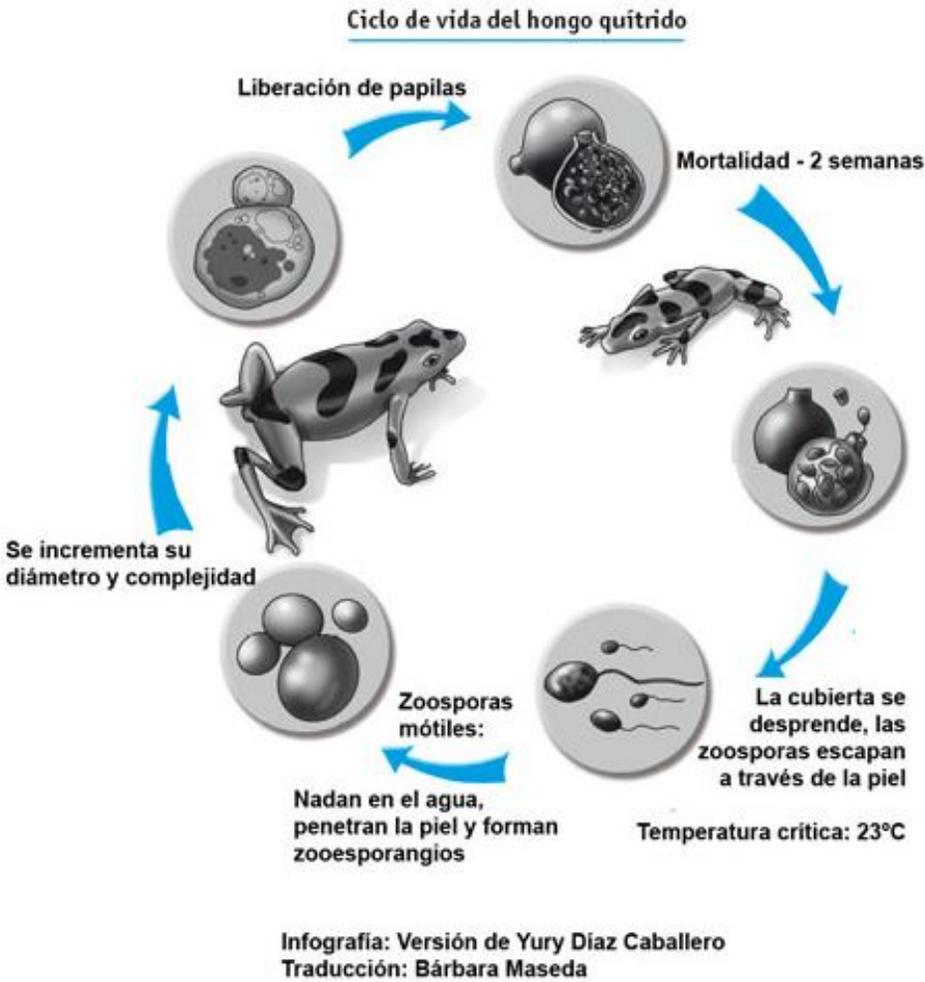
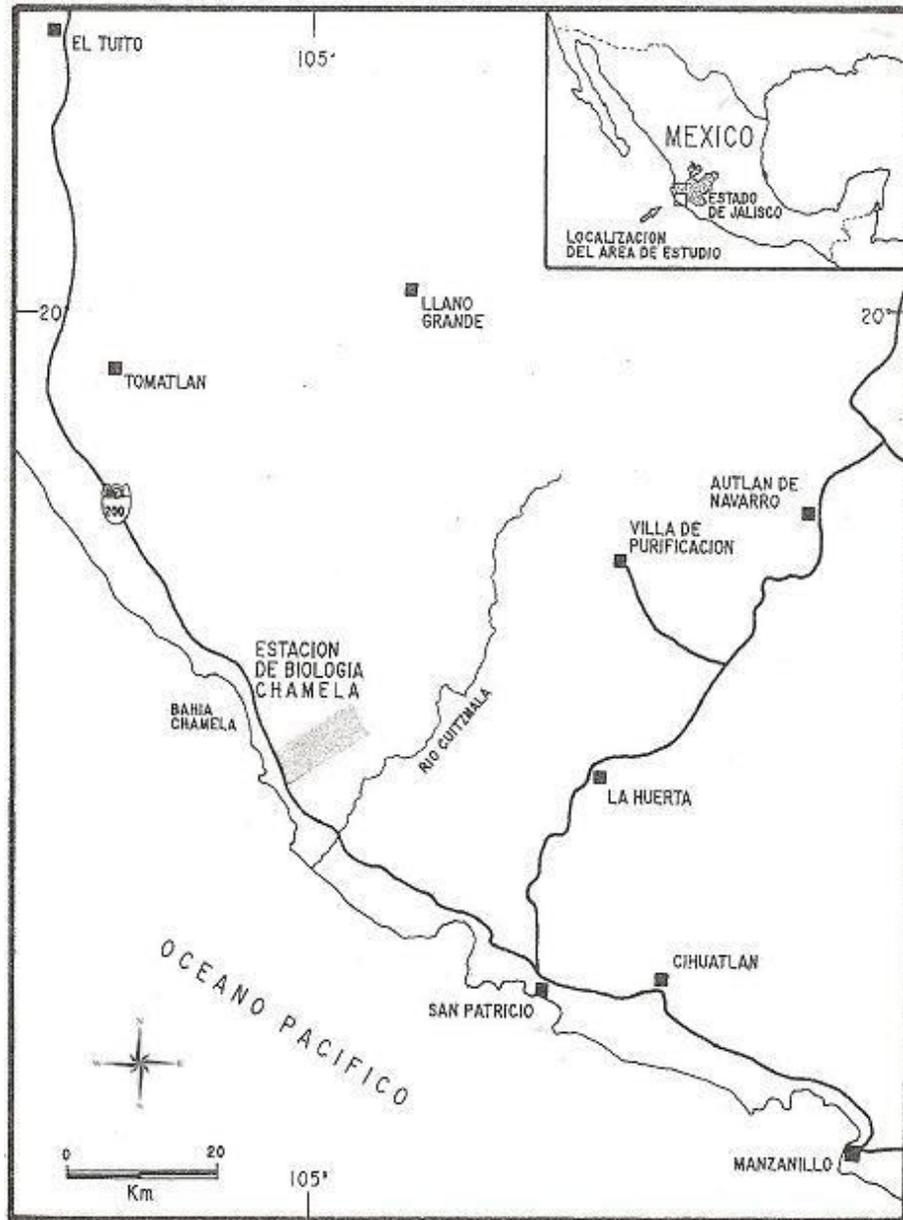


Figura1. Ciclo de vida de *Batrachochytrium dendrobatidis*.

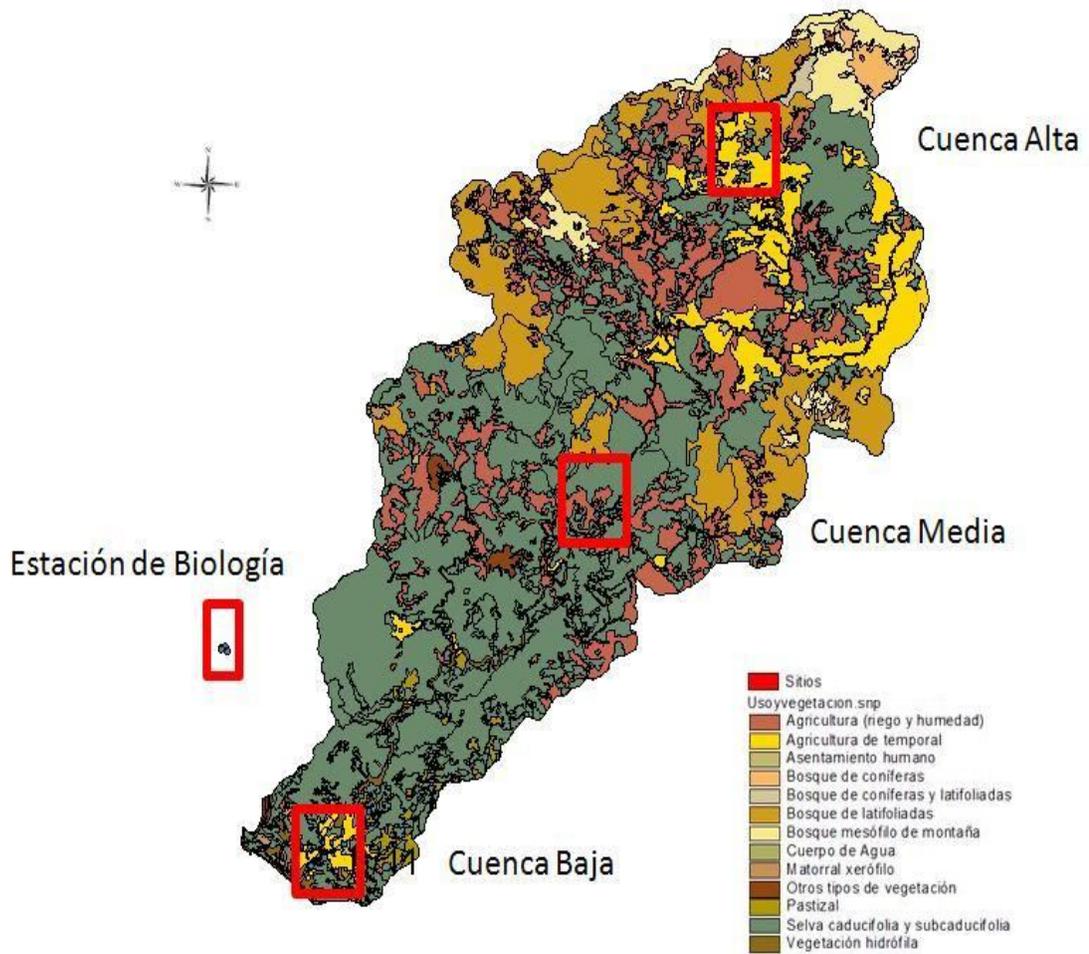
Ubicación geográfica de la Cuenca del río Cuitzmala



FUENTE: Manual y claves ilustradas de los Anfibios y reptiles de la región de Chamela, Jalisco, México.

Figura 3. Localización del río Cuitzmala.

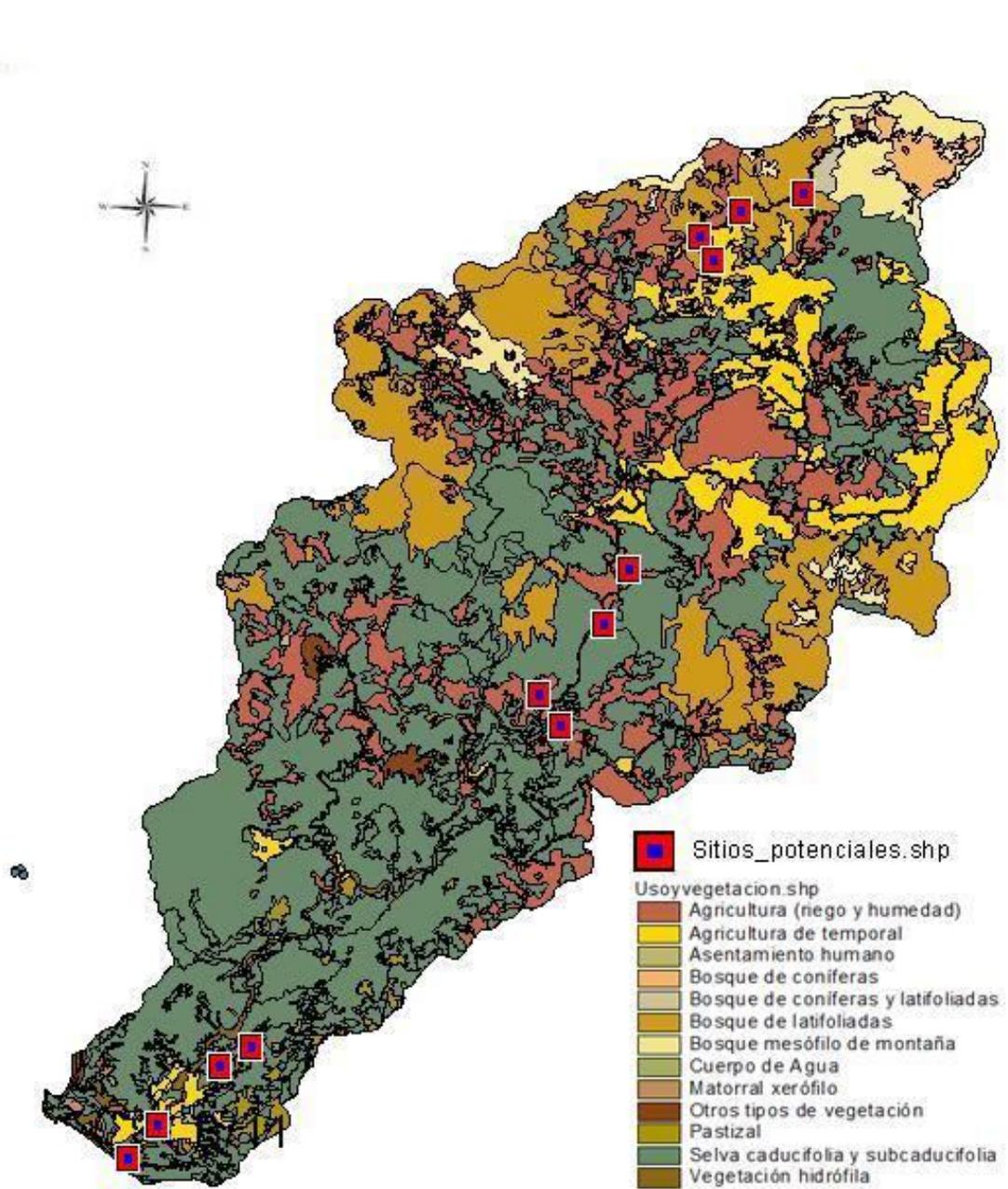
Categorización de la Cuenca del río Cuitzmala



FUENTE: Andrés García Aguayo, Categorización por SIG.

Figura 4. Categorización de la cuenca del río Cuitzmala en relación a su elevación sobre el nivel del mar, uso y vegetación.

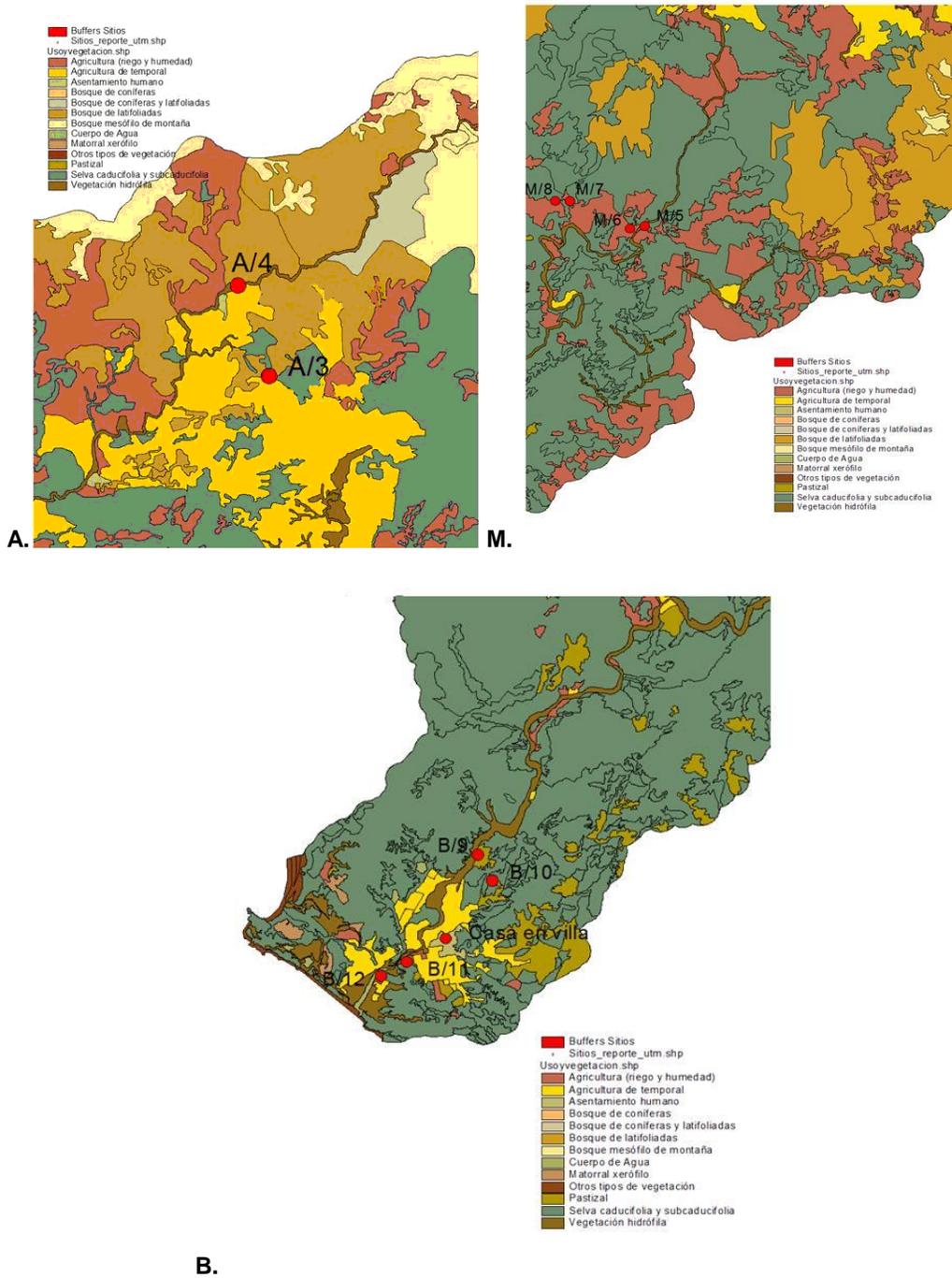
Sitios potenciales de la Cuenca del río Cuitzmala



FUENTE: Andrés García Aguayo, Caracterización por SIG

Figura 5. Ubicación y caracterización de los sitios para el estudio en la cuenca del río Cuitzmala.

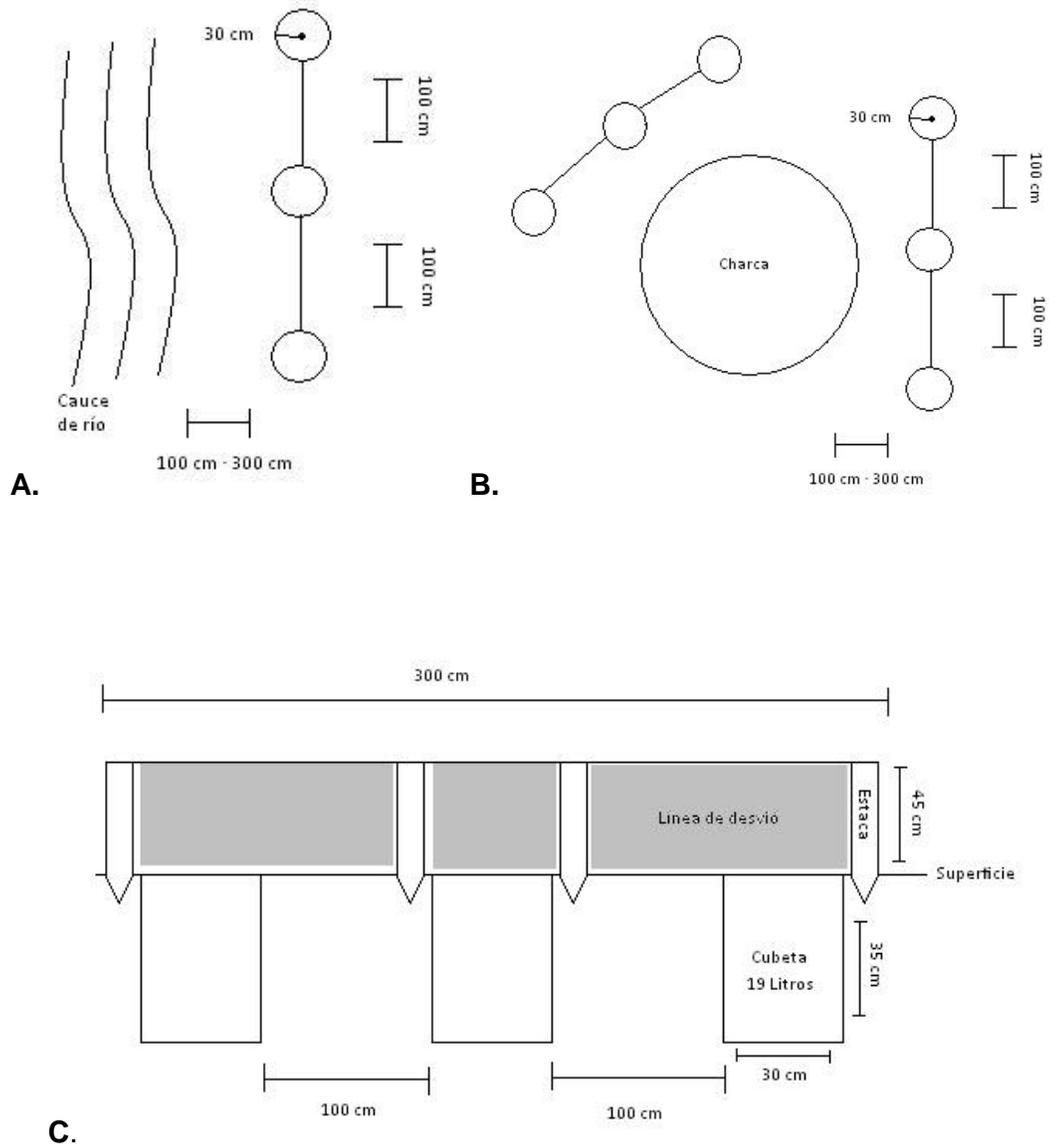
Sitios viables de la Cuenca del río Cuitzmala



FUENTE: Andrés García Aguayo, Caracterización por SIG

Figura 6. Ubicación y caracterización de los sitios empleados para el estudio en la cuenca del río Cuitzmala, **A.** Cuenca alta, **M.** Cuenca media, **B.** Cuenca baja.

Técnica modificada de método de monitoreo de reptiles y anfibios (44).



FUENTE: Juan Cortés García, por recomendación de Andrés García Aguayo.

Figura 7. Diseños de la colocación y características de las trampas: de caída, **A.** Diseño para cuerpo de agua longitudinal (Ejemplo. Borde de río), **B.** Diseño para cuerpo de agua circular (Ejemplo. Charca de agua temporal), **C.** Características de la instalación de las trampas.

Secuencia de eventos en la toma de muestra.



FUENTE: Fotos de Chamela, André Rubio, FMVZ, UNAM.

Figura 8. Protocolo de hisopado para los anfibios. 1. Captura manual, 2. Hisopado cutáneo, 3. Almacenamiento de la muestra, 4. Identificación, 5. Registro, 6. Liberación del individuo.

Visualización de las reacciones de obtenidas en el PCR Anidado

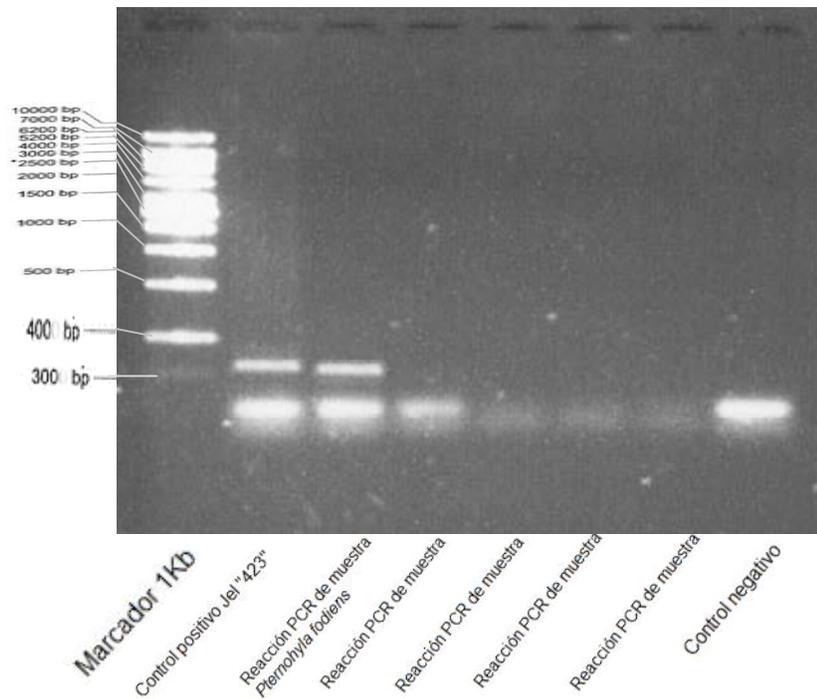


Figura 9. Gel de agarosa al 3% visto en fotodocumentador, DNA de *Batrachochytrium dendrobatidis* Jel 423 y muestras amplificadas.

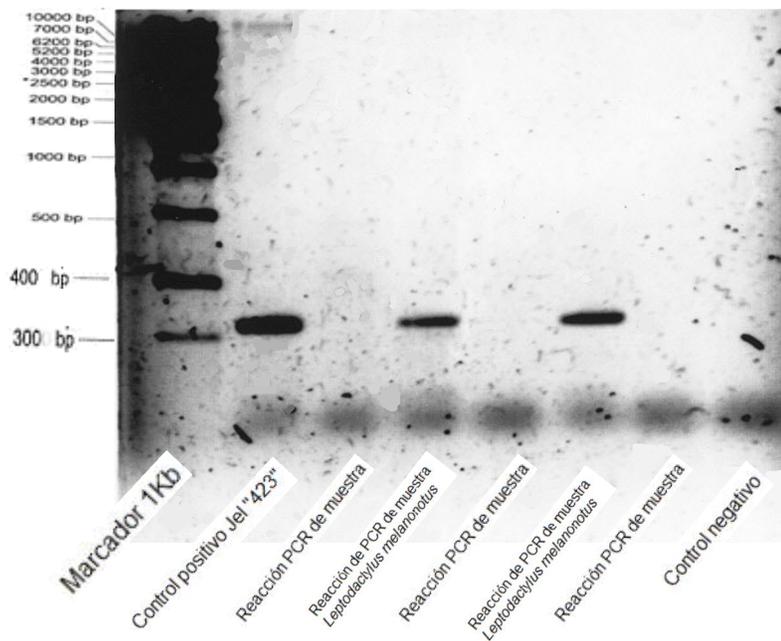


Figura 10. Gel de agarosa al 3% visto en fotodocumentador, DNA de *Batrachochytrium dendrobatidis* Jel 423 y muestras amplificadas.

8 Cuadros

Cuadro 1. Composición de la población de anfibios reportados en la zona costera de Jalisco, México.

FAMILIA	ESPECIES	Endemismos
Bufonidae	<i>Rhinella marina</i>	<i>Incilius marmoreus</i>
	<i>Incilius marmoreus</i>	
	<i>Incilius mazatlanensis</i>	<i>Incilius mazatlanensis</i>
Leptodactylidae	<i>Craugastor hobartsmithi</i>	<i>Craugastor hobartsmithi</i>
	<i>Craugastor occidentalis</i>	<i>Craugastor occidentalis</i>
	<i>Eleutherodactylus modestus</i>	<i>Eleutherodactylus modestus</i>
	<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	<i>Eleutherodactylus nitidus</i>
	<i>Leptodactylus melanonotus</i>	
Hylidae	<i>Dendropsophus sartori</i>	<i>Dendropsophus sartori</i>
	<i>Exerodonta smaragdina</i>	<i>Exerodonta smaragdina</i>
	<i>Tlalocohyla smithii</i>	<i>Tlalocohyla smithii</i>
	<i>Agalychnis dacnicolor</i>	<i>Agalychnis dacnicolor</i>
	<i>Smilisca fodiens</i>	
	<i>Trachycephalus typhonius</i>	
	<i>Diaglena spatulata</i>	<i>Diaglena spatulata</i>
	<i>Smilisca baudini</i>	
Microhylidae	<i>Hypopachus ustus</i>	
	<i>Hypopachus variolosus</i>	
Ranidae	<i>Lithobates forreri</i>	
5 familias	19 especies	11 endemismos

Origen: Datos obtenidos de referencia Andrés García 1994 y Ramírez Bautista 1994

Cuadro 2. Características de los sitios seleccionados y de la “Estación Biológica Chamela” (EBCHAMELA).

Cuenca	Nomenclatura de sitio	Situación ecológica	Latitud	Longitud	Altitud msnm
1 ALTA	A/3-ECA	Conservado	19.781648	-104.709211	652
2 ALTA	A/4-ECA	Perturbado	19.803102	-104.716701	501
3 MEDIA	M/5	Conservado	19.575167	-104.802132	204
4 MEDIA	M/6	Perturbado	19.574106	-104.808021	208
5 MEDIA	M/7	Conservado	19.585286	-104.831975	195
6 MEDIA	M/8	Perturbado	19.585416	-104.837775	178
7 BAJA	B/9	Conservado	19.414754	-104.956280	15
8 BAJA	B/10	Perturbado	19.406333	-104.961583	22
9 BAJA	B/11	Conservado	19.379708	-104.979375	30
10 BAJA	B/12	Perturbado	19.375181	-104.987651	7
BAJA	Casa en villa	Perturbado	19.387378	-104.966639	14
EBCHAMELA	Estación Chamela	Conservado	19.498139	-105.044394	102
EBCHAMELA	Sendero Antiguo sur	Conservado	19.496673	-105.040499	52
EBCHAMELA	Sendero Búho	Conservado	19.499329	-105.041805	70

Origen: Datos colectados de La cuenca hidrológica de Cuitzmala, Proyecto cuencas PAPIT.

Cuadro 3. Distribución espacial y temporal del éxito de captura y diagnóstico durante temporada de lluvias y secas en el 2010.

Mes	Año	Temporada	Sitio	Capturas	%Capturas	PCR	Positivos
Julio	2010	Secas	Estación biológica Chamela	30	12.93%	7	1
Julio	2010	Secas	Sendero de Búho	10	4.31%	2	0
Julio	2010	Secas	Sendero antiguo sur	16	6.89%	3	0
Total			3	56	24.13%	12	1
Septiembre	2010	Lluvias	A/3	0	0%	0	0
Septiembre	2010	Lluvias	A/4	0	0%	0	0
Septiembre	2010	Lluvias	M/5	3	1.29%	3	0
Septiembre	2010	Lluvias	M/6	14	6.03%	14	0
Septiembre	2010	Lluvias	M/7	2	0.86%	2	0
Septiembre	2010	Lluvias	M/8	4	1.72%	4	0
Septiembre	2010	Lluvias	B/9	0	0%	0	0
Septiembre	2010	Lluvias	B/10	1	0.43%	1	0
Septiembre	2010	Lluvias	B/11	3	1.29%	3	0
Septiembre	2010	Lluvias	B/12	2	0.86%	2	0
Total			10	29	12.48%	29	0

Origen: Datos obtenidos del muestreo

Cuadro 4. Distribución espacial y temporal del éxito de captura y diagnóstico, durante temporada de lluvias y secas en el 2011.

Mes	Año	Temporada	Sitio	Capturas	%Capturas	PCR	Positivos
Mayo-Junio	2011	Secas	A/3	16	6.89%	16	0
Mayo-Junio	2011	Secas	A/4	22	9.48%	22	0
Mayo-Junio	2011	Secas	M/5	44	18.96%	44	0
Mayo-Junio	2011	Secas	M/6	4	1.72%	4	0
Mayo-Junio	2011	Secas	M/7	1	0.43%	1	0
Mayo-Junio	2011	Secas	M/8	0	0%	0	0
Mayo-Junio	2011	Secas	B/9	0	0%	0	0
Mayo-Junio	2011	Secas	B/10	0	0%	0	0
Mayo-Junio	2011	Secas	B/11	0	0%	0	0
Mayo-Junio	2011	Secas	B/12	0	0%	0	0
Total			3	87	37.48%	87	0
Diciembre	2011	Lluvias	A/3	8	3.44%	8	0
Diciembre	2011	Lluvias	A/4	7	3.01%	7	0
Diciembre	2011	Lluvias	M/5	9	3.87%	9	2
Diciembre	2011	Lluvias	M/6	1	0.43%	1	0
Diciembre	2011	Lluvias	M/7	0	0%	0	0
Diciembre	2011	Lluvias	M/8	0	0%	0	0
Diciembre	2011	Lluvias	B/9	2	0.86%	2	0
Diciembre	2011	Lluvias	B/10	13	5.60%	13	0
Diciembre	2011	Lluvias	B/11	15	6.46%	15	0
Diciembre	2011	Lluvias	B/12	4	1.72%	4	0
Diciembre	2011	Lluvias	Casa en villa	1	0.43%	1	0
Total			10	60	25.82%	60	2

Origen: Datos obtenidos del muestreo

Cuadro 5 . Hoja de registro para el censo de los anfibios muestreados.

Nombre de realizador del registro:					Censo de anfibios muestreados #:				
Nombre de la localidad o ejido:					Fecha:				
#	Hora	Especie	Sexo	Edad	Medidas	Descripción del micro hábitat	Clave de sitio	Altitud	Comentarios
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									

Cuadro 6. Hoja de cálculos para reacciones de PCR en Excel.

Nombre del estudio			Número de estudio			
Nombre de los marcadores				N°muestras		
Mezcla			x muestra	Total =1	Concentración final	
Agua destilada			8.30	8.30		
10X Buff PCR	10	X	4.00	4.00	1.00	X
Mezcla dNTPs	10.0	mM	1.00	1.00	0.500	mM
Taq	5.00	U/μl	0.10	0.10	0.025	U/μl
MgCl2	25.00	mM	1.60	1.60	2.00	mM
Facilitador-	10.0	mg/μl	1.00	1.00	0.500	mg/μl
Primer Bd1	10.0	μM	1.00	1.00	0.500	μM
Primer Bd2	10.0	μM	1.00	1.00	0.500	μM
		Por muestra		18.00		
		μIDNAtoadd		2.00		
		Otro		0.00		
		Total PCRvol		20.00		

Fuente: Luis Miguel García; Formato de registro en Excel realizado en el laboratorio de Micología de la FMVZ UNAM.

Cuadro 7. Condiciones para la técnica de PCR en el termociclador.

Número de PCR	1		
Fecha	DÍA/MES/AÑO		
Nombre	JCG		
Tipo de PCR	Anidado		
Programa	"Annis"	Temperatura (°C)	Tiempo (Min:Sec)
Paso 1		95	00:09:00
Paso 2		94 30 veces	00:00:30
Paso 3		50 30 veces	00:00:30
Paso 4		72 30 veces	00:02:00
Paso 5		72	00:07:00
Paso 6		4	00:00:00

Fuente: Luis Miguel García; Formato de registro en Excel realizado en el laboratorio de Micología de la FMVZ UNAM.

Cuadro 8. Orden de la muestras para registro de los resultados obtenidos del gel en la cámara de electroforesis.

#Tubos	#Muestra	Resultado	Gel Carril	Orden de carga # Muestras
1	Rótulo de la muestra	(+)o(-)	1	Marcador 1 kb
2	Rótulo de la muestra	(+)o(-)	2	Control (+) "JEL 423"
3	Rótulo de la muestra	(+)o(-)	3	Reacciones de la muestra
4	Rótulo de la muestra	(+)o(-)	4	Reacciones de la muestra
5	Rótulo de la muestra	(+)o(-)	5	Reacciones de la muestra
			6	Reacciones de la muestra
			7	Reacciones de la muestra
			8	Control (-)H ₂ O

Cuadro 9. Prevalencia en época de secas 2010 (estudio prospectivo)

Sitio	Elevación (msnm)	N capturas	Positivos	Prevalencia
Sendero antiguo sur	32	3	0	0
Sendero de Búho	52	2	0	0
Estación biológica Chamela	102	7	1	0.142854
Total		12	1	0.083333

Origen: Datos obtenidos del muestreo

Cuadro 10. Prevalencia en época de lluvias 2010 (estudio prospectivo)

Sitio	Elevación (msnm)	N capturas	Positivos	Prevalencia
B/12	7	2	0	0
B/9	15	0	0	0
B/10	22	1	0	0
B/11	30	3	0	0
M/8	178	4	0	0
M/7	195	2	0	0
M/5	204	3	0	0
M/6	208	14	0	0
A/4	501	0	0	0
A/3	652	0	0	0
Total		29	0	0

Origen: Datos obtenidos del muestreo

Cuadro 11. Prevalencia en todo el 2010

Sitio	Elevación (msnm)	N capturas	Positivos	Prevalencia
Sendero antiguo sur	32	3	0	0
Sendero de Búho	52	2	0	0
Estación biológica Chamela	102	7	1	0.142854
Baja	B/12	7	2	0
	B/9	15	0	0
	B/10	22	1	0
	B/11	30	3	0
Media	M/8	178	4	0
	M/7	195	2	0
	M/5	204	3	0
	M/6	208	14	0
Alta	A/4	501	0	0
	A/3	652	0	0
Total		41	1	0.020408

Origen: Datos obtenidos del muestreo

Cuadro 12. Prevalencia en época de secas 2011.

Sitio	Elevación (msnm)	N capturas	Positivos	Prevalencia
B/12	7	0	0	0
B/9	15	0	0	0
B/10	22	0	0	0
B/11	30	0	0	0
M/8	178	0	0	0
M/7	195	1	0	0
M/5	204	44	0	0
M/6	208	4	0	0
A/4	501	22	0	0
A/3	652	16	0	0
Total		87	0	0

Origen: Datos obtenidos del muestreo

Cuadro 13. Prevalencia en época de lluvias 2011.

Sitio	Elevación (msnm)	N capturas	Positivos	Prevalencia
B/12	7	4	0	0
casa en villa	14	1	0	0
B/9	15	2	0	0
B/10	22	13	0	0
B/11	30	15	0	0
M/8	178	0	0	0
M/7	195	0	0	0
M/5	204	9	2	0.222222
M/6	208	1	0	0
A/4	501	7	0	0
A/3	652	8	0	0
Total		60	2	0.033333

Origen: Datos obtenidos del muestreo

Cuadro 14. Prevalencia en todo el 2011.

Sitio	Elevación (msnm)	N capturas	Positivos	Prevalencia
B/12	7	4	0	0
casa en villa	14	1	0	0
B/9	15	2	0	0
B/10	22	13	0	0
B/11	30	15	0	0
M/8	178	0	0	0
M/7	195	1	0	0
M/5	204	53	2	0.222222
M/6	208	5	0	0
A/4	501	29	0	0
A/3	652	24	0	0
Total		147		0.013605

Origen: Datos obtenidos del muestreo

Cuadro 15. Prevalencia total de todo el estudio (2010 y 2011)

Sitio	Elevación (msnm)	N capturas	Positivos	Prevalencia
B/12	7	6	0	0
casa en villa	14	1	0	0
B/9	15	2	0	0
B/10	22	14	0	0
B/11	30	18	0	0
Sendero antiguo sur	32	3	0	0
Sendero de Búho	52	2	0	0
Estación biológica Chamela	102	7	1	0.142854
M/8	178	4	0	0
M/7	195	3	0	0
M/5	204	56	2	0.035714
M/6	208	19	0	0
A/4	501	29	0	0
A/3	652	24	0	0
Total		188	3	0.015957

Origen: Datos obtenidos del muestreo

Cuadro16. Prueba de “t” para comparar la relación entre la temporada de lluvias y secas en el muestreo del 2010.

	Secas 2010	Lluvias 2010
	0	0
	0	0
	0.14285714	0
		0
		0
		0
		0
		0
		0
N=	3	10
Promedio=	0.047619047	0
Desviación estándar=	0.082478608	0
Rango d confianza	95%	
Significancia (-1)	5%	

Prueba t para dos muestras		
	Variable 1	Variable 2
Media	0.011111111	0
Varianza	0.00037037	0
Observaciones	3	10
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	1	
P(T<=t) una cola	0.21132487	
Valor crítico de t (una cola)	2.91998558	
P(T<=t) dos colas	0.42264973	
Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273	

Cuadro17. Prueba de “t” para comparar la relación entre la temporada de lluvias y secas en el muestreo del 2011.

	Secas 2011	Lluvias 2011
	0	0
	0	0
	0	0
	0	0
	0	0
	0	0
	0	0
	0	0
	0	0
	0	0.22222222
	0	0
	0	0
		0
N=	10	11
Promedio=	0	0.02020202
Desviacion estandar=	0	0.06700252
Rango d confianza	95%	
Significancia (-1)	5%	

	Variable 1	Variable 2
Prueba t para dos muestras		
Media	0	0.02020202
Varianza	0	0.00448934
Observaciones	10	11
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	-1	
P(T<=t) una cola	0.17044657	
Valor crítico de t (una cola)	1.81246112	
P(T<=t) dos colas	0.34089313	
Valor crítico de t (dos colas)	2.22813885	

Cuadro 18. Índice de fragmentación temporada de secas 2011.

Sitio	Superficie total del Hábitat (Ha)	Número de manchas	Distancia media entre manchas cercanas (dc en hm)	Superficie total del área de estudio(Ha)
A/3	8	2	1.67	108900
A/4	8	3	1.092	108900
M/5	8	2	0.71	108900
M/6	8	3	1.116	108900
M/7	8	3	0.883	108900
M/8	8	0	0	108900
B/9	8	2	1.61	108900
B/10	8	4	0.739	108900
B/11	8	2	1.83	108900
B/12	8	3	1.813	108900

Cuadro 19. Índice de fragmentación temporada de lluvias 2011.

Sitio	Densidad media de manchas (λ)	Dispersión de las manchas (R_c)	Índice de fragmentación (F)
A/3	0.001836547	0.019270743	207.5685425
A/4	0.002754821	0.018901483	141.0824038
M/5	0.001836547	0.008192951	488.2246001
M/6	0.002754821	0.0193169	138.0483736
M/7	0.002754821	0.015283892	174.4756341
M/8	0	0	0
B/9	0.001836547	0.018578381	215.3040162
B/10	0.003673095	0.017055184	117.2663958
B/11	0.001836547	0.021117042	189.4204733
B/12	0.002754821	0.031381308	84.97627408

Cuadro 20. Datos obtenidos a lo largo del estudio, se reporta la especie, el sitio, la muestra que se tomó y el resultado a la prueba de PCR, en total 232 registros a lo largo del estudio.

TEMPORADA	FECHA	SITIO DE MUESTREO	N	W	ALTITUD	ESPECIE	MUESTRA	Bd
Secas	24/07/2010	Sobre el camino para llegar a la estación.	19.49815	105.0444	102	<i>Pternohyla fodiens</i>	Piel	positivo
Secas	24/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Pternohyla fodiens</i>	Piel	negativo
Secas	24/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Diaglena spatulata</i>	Piel	negativo
Secas	25/07/2010	Sendero Buho	19.499329	105.041805	70	<i>Incilius marmoreus</i>	Piel	negativo
Secas	25/07/2010	Sendero Buho	19.499329	105.041805	70	<i>Incilius marmoreus</i>	Piel	negativo
Secas	25/07/2010	Sendero Antiguo sur	19.4966833	105.0405	52	<i>Incilius marmoreus</i>	Piel	negativo
Secas	25/07/2010	Sendero Antiguo sur	19.4966833	105.0405	52	<i>Incilius marmoreus</i>	Piel	negativo
Secas	25/07/2010	Sendero Antiguo sur	19.4966833	105.0405	52	<i>Incilius mazatlanensis</i>	Piel	negativo
Secas	26/07/2010	Sendero Buho	19.499329	105.041805	70	<i>Hypopachus ustus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	26/07/2010	Sendero Buho	19.499329	105.041805	70	<i>Hypopachus ustus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	26/07/2010	Sendero Antiguo sur	19.4955833	105.0395333	32	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	26/07/2010	Sendero Antiguo sur	19.4955833	105.0395333	32	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	26/07/2010	Sendero Antiguo sur	19.4955833	105.0395333	32	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	26/07/2010	Sendero Antiguo sur	19.4955833	105.0395333	32	<i>Hypopachus variolosus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	26/07/2010	Sendero Antiguo sur	19.4955833	105.0395333	32	<i>Hypopachus variolosus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	27/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Rhinella marina</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	27/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	27/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	27/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	27/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	28/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	28/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	28/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius marmoreus</i>	Piel	negativo
Secas	28/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius marmoreus</i>	Piel	negativo
Secas	28/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius mazatlanensis</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	28/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius mazatlanensis</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	28/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius mazatlanensis</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	28/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	28/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	28/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius mazatlanensis</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	28/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	28/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius mazatlanensis</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	28/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	28/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius marmoreus</i>	Piel	negativo
Secas	29/07/2010	Sendero Buho	19.499329	105.041805	70	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	29/07/2010	Sendero Buho	19.499329	105.041805	70	<i>Incilius</i>	Sin muestra	Sin muestra

						<i>mazatlanensis</i>		
Secas	30/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Rhinella marina</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	30/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Similisca baudini</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	30/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Similisca baudini</i>	Piel	negativo
Secas	31/07/2010	Sendero Antiquo sur	19.4966833	105.0405	52	<i>Hypopachus variolosus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	31/07/2010	Sendero Antiquo sur	19.4966833	105.0405	52	<i>Rhinella marina</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	31/07/2010	Sendero Antiquo sur	19.4966833	105.0405	52	<i>Incilius mazatlanensis</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	31/07/2010	Sendero Antiquo sur	19.4966833	105.0405	52	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	31/07/2010	Sendero Antiquo sur	19.4966833	105.0405	52	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	31/07/2010	Sendero Antiquo sur	19.4955833	105.0395333	32	<i>Incilius mazatlanensis</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	31/07/2010	Sendero Antiquo sur	19.4955833	105.0395333	32	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	31/07/2010	Sendero Antiquo sur	19.4955833	105.0395333	32	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	31/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	31/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Pternohyla fodiens</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	31/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	31/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius mazatlanensis</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	31/07/2010	Estacion Chamela	19.49815	105.0444	102	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	01/08/2010	Sendero Buho	19.499329	105.041805	70	<i>Hypopachus ustus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	01/08/2010	Sendero Buho	19.499329	105.041805	70	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	01/08/2010	Sendero Buho	19.499329	105.041805	70	<i>Incilius mazatlanensis</i>	Sin muestra	Sin muestra
Secas	01/08/2010	Sendero Buho	19.499329	105.041805	70	<i>Incilius marmoreus</i>	Sin muestra	Sin muestra
Lluvias	21/09/2010	M/6	19.5741	104.808017	208	<i>Hypopachus ustus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	23/09/2010	M/6	19.5741	104.808017	208	<i>Craugastor hobartsmithi</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	23/09/2010	M/6	19.5741	104.808017	208	<i>Craugastor hobartsmithi</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	23/09/2010	M/6	19.5741	104.808017	208	<i>Craugastor hobartsmithi</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	23/09/2010	M/8	19.5741	104.808017	178	<i>Hypopachus variolosus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	23/09/2010	M/6	19.5741	104.808017	208	<i>Incilius mazatlanensis</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	23/09/2010	M/6	19.5741	104.808017	208	<i>Craugastor hobartsmithi</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	23/09/2010	M/6	19.5741	104.808017	208	<i>Incilius mazatlanensis</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	23/09/2010	M/6	19.5741	104.808017	208	<i>Craugastor hobartsmithi</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	23/09/2010	M/6	19.5741	104.808017	208	<i>Incilius marmoreus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	24/09/2010	M/5	19.575183	104.802133	204	<i>Craugastor hobartsmithi</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	24/09/2010	M/5	19.575183	104.802133	204	<i>Craugastor hobartsmithi</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	24/09/2010	M/6	19.5741	104.808017	208	<i>Incilius marmoreus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	24/09/2010	M/7	19.5853	104.8319833	195	<i>Incilius mazatlanensis</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	24/09/2010	M/8	19.5854	104.8377833	178	<i>Craugastor hobartsmithi</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	24/09/2010	M/6	19.5741	104.808017	208	<i>Leptodactylus</i>	Hisopado	negativo

							cutáneo	
Secas	29/05/2011	M/5	19.575183	104.802133	204	<i>Lithobates forreri</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	29/05/2011	M/5	19.575183	104.802133	204	<i>Lithobates forreri</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	29/05/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Lithobates forreri</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	29/05/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	29/05/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	29/05/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	29/05/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	30/05/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	30/05/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	30/05/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	30/05/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	30/05/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	30/05/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	31/05/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	31/05/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	31/05/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	31/05/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Eleutherodactylus modestus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	31/05/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	31/05/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Eleutherodactylus occidentalis</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	31/05/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Lithobates forreri</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	31/05/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Lithobates forreri</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	01/06/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Lithobates forreri</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	01/06/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Lithobates forreri</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	01/06/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Lithobates forreri</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	01/06/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Lithobates forreri</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	01/06/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Lithobates forreri</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	02/06/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Incilius mazatlanensis</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	02/06/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Lithobates forreri</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	02/06/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Incilius mazatlanensis</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	02/06/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Incilius</i>	Hisopado	negativo

						<i>mazatlanensis</i>	cutáneo	
Secas	02/06/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Incillius mazatlanensis</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	03/06/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Incillius mazatlanensis</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	03/06/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Incillius mazatlanensis</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	03/06/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Incillius mazatlanensis</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	03/06/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Incillius mazatlanensis</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	03/06/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Craugastor hobartsmithi</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	03/06/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Craugastor hobartsmithi</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	03/06/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Incillius mazatlanensis</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	03/06/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Incillius mazatlanensis</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Secas	03/06/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Incillius mazatlanensis</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	04/12/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Lithobates forreri</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	04/12/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Lithobates forreri</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	04/12/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Lithobates forreri</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	04/12/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Lithobates forreri</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	04/12/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	NI	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	05/12/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	NI	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	05/12/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Rhinella marina</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	05/12/2011	A/3	19.766667	104.709267	652	<i>Rhinella marina</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	06/12/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Lithobates forreri</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	06/12/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	NI	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	06/12/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	NI	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	06/12/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Phrynohyla venulosa</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	07/12/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	07/12/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	07/12/2011	A/4	19.8031	104.716717	501	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	07/12/2011	M/5	19.575183	104.802133	204	<i>Rhinella marina</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	08/12/2011	M/5	19.575183	104.802133	204	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	positivo
Lluvias	08/12/2011	M/5	19.575183	104.802133	204	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	08/12/2011	M/5	19.575183	104.802133	204	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	positivo
Lluvias	08/12/2011	M/5	19.575183	104.802133	204	<i>Leptodactylus</i>	Hisopado	negativo

						<i>melanotus</i>	cutáneo	
Lluvias	08/12/2011	M/5	19.575183	104.802133	204	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	08/12/2011	M/5	19.575183	104.802133	204	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	08/12/2011	M/5	19.575183	104.802133	204	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	08/12/2011	M/5	19.575183	104.802133	204	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	08/12/2011	M/6	19.5741	104.808017	208	<i>Lithobates forreri</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	10/12/2011	B/9	19.414733	104.956267	15	<i>Agalychnis dacnicolor</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	10/12/2011	B/10	19.4063333	104.9615833	22	<i>Incilius marmoratus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	10/12/2011	B/10	19.4063333	104.9615833	22	<i>Incilius marmoratus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	10/12/2011	B/10	19.4063333	104.9615833	22	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	10/12/2011	B/9	19.414733	104.956267	15	<i>Agalychnis dacnicolor</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	11/12/2011	B/11	19.3797	104.979383	30	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/11	19.3797	104.979383	30	<i>Lithobates forreri</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/11	19.3797	104.979383	30	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Ejemplar muerto	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/11	19.3797	104.979383	30	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Ejemplar muerto	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/11	19.3797	104.979383	30	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Ejemplar muerto	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/11	19.3797	104.979383	30	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Ejemplar muerto	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/11	19.3797	104.979383	30	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/11	19.3797	104.979383	30	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/11	19.3797	104.979383	30	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/11	19.3797	104.979383	30	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/11	19.3797	104.979383	30	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/11	19.3797	104.979383	30	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/11	19.3797	104.979383	30	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/11	19.3797	104.979383	30	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/11	19.3797	104.979383	30	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/10	19.4063333	104.9615833	22	<i>Incilius mazatlanensis</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/12	19.3751833	104.98765	7	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Ejemplar muerto	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/12	19.3751833	104.98765	7	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Ejemplar muerto	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/12	19.3751833	104.98765	7	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Ejemplar muerto	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/12	19.3751833	104.98765	7	<i>Leptodactylus</i>	Ejemplar	negativo

						<i>melanotus</i>	muerto	
Lluvias	12/12/2011	B/10	19.4063333	104.9615833	22	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/10	19.4063333	104.9615833	22	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/10	19.4063333	104.9615833	22	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/10	19.4063333	104.9615833	22	<i>Lithobates forreri</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/10	19.4063333	104.9615833	22	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/10	19.4063333	104.9615833	22	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/10	19.4063333	104.9615833	22	<i>Leptodactylus melanotus</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/10	19.4063333	104.9615833	22	<i>Tlalocohyla smithii</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	12/12/2011	B/10	19.4063333	104.9615833	22	<i>Lithobates forreri</i>	Hisopado cutáneo	negativo
Lluvias	13/12/2011	Casa en villa	19° 22,998	104° 58,057	14	<i>Tlalocohyla smithii</i>	Hisopado cutáneo	negativo

Origen: Datos obtenidos del muestreo