



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PREVALENCIA DE *Batrachochytrium dendrobatidis* EN
LA COMUNIDAD DE ANFIBIOS DE LA UNIDAD DE
MANEJO PARA LA CONSERVACIÓN DE LA VIDA
SILVESTRE (UMA) "RANCHO EL SALADO", PUEBLA,
MÉXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

DANIELA ORTIZ MILLÁN



DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. FAHD HENRRY CARMONA TORRES

CO-DIRECTOR DE TESIS:
PhD. ROBERTO ARNULFO CERVANTES OLIVARES

2016

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX



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.

1. Datos del alumno

Ortiz

Millán

Daniela

bio.danielaortizmillan@gmail.com

**Universidad Nacional Autónoma de
México**

Facultad de Ciencias

Biología

306267936

2. Datos del tutor

M. en C.

Fahd Henry

Carmona

Torres

3. Datos de co-tutor

PhD.

Roberto Arnulfo

Cervantes

Olivares

4. Datos del sinodal 1

M. en C.

Georgina

Santos

Barrera

5. Datos del sinodal 2

Dra.

Hermelinda Margarita

Villegas

Ríos

6. Datos del sinodal 3

M. en C.

Larisa Adriana

Chávez

Soriano

7. Datos del trabajo escrito

**Prevalencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en la comunidad de anfibios
de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA)**

“Rancho El Salado”, Puebla, México

95 p

2016

RECONOCIMIENTOS

Para el concepto de autogestión académica, el conocer es transformar. No se trata tan sólo de adquirir una concepción determinada del mundo, sino de que tal concepción, al mismo tiempo, actúe como desplazamiento revolucionario de lo caduco, lo ya no vigente, lo obsoleto que se resiste a desaparecer. José Revueltas, Ciudad Universitaria, 11 de septiembre de 1968.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por ser mi segundo hogar desde mi ingreso al bachillerato a la conclusión de este trabajo.

Al financiamiento **PAPIIT IN 210410-3** para el trabajo de laboratorio.

A mi director de tesis **M. en C. Fahd Henry Carmona Torres**, por presentarme el proyecto, sus enseñanzas y apoyo en campo, así como su entusiasmo y colaboración en los congresos y simposios derivados de este trabajo.

A mi co-director **PhD. Roberto Arnulfo Cervantes Olivares**, por aceptarme como su estudiante en el laboratorio de micología, confiar en el proyecto y su apoyo incondicional, pero sobre todo su paciencia y amistad.

A la **M. en C. Larisa Adriana Chávez Soriano**, por tener una activa participación desde el inicio de este proyecto y ser una tercera asesora quien se preocupó por mi aprendizaje y comprensión del tema.

A las sinodales **M. en C. Georgina Santos Barrera y Dra. Hermelinda Margarita Villegas Rios**, por sus acertadas revisiones que me permitieron ver mi tesis con otros enfoques.

Al **M.V.Z. Juan Cortés García** por estar conmigo desde el inicio como un maestro, enseñándome sobre el quitridio y fungiendo como un colega para la discusión de artículos y métodos.

A **PhD. Joyce Longcore**, por la donación del control positivo para las pruebas de biología molecular y su asesoría a distancia. Thank you for your time and effort.

A **Daniel Pérez Olmedo, Mónica Sanchez Díaz** y los grupos intersemestrales de **Fauna Silvestre (FMVZ)** por su colaboración en campo.

A la comunidad de la **UMA "Rancho El Salado"** por su apoyo durante los recorridos en campo, especialmente a **Don Toño** y su familia por recibirme en su hogar.

AGRADECIMIENTOS

Tanto Dorothy como el Espantapájaros habían escuchado con gran interés el relato del Leñador (hombre de hojalata), y ahora comprendían por qué estaba tan deseoso de obtener un nuevo corazón. -Sin embargo -dijo el Espantapájaros-, yo pediré un cerebro en vez de un corazón, pues un tonto sin sesos no sabría qué hacer con su corazón si lo tuviera. -Yo prefiero el corazón -replicó el Leñador-, porque el cerebro no lo hace a uno feliz, y la felicidad es lo mejor que hay en el mundo. El Maravilloso Mago de Oz, L. Frank Baum 1900

Los siguientes agradecimientos son para aquellas personas que desde mi niñez me inculcaron un profundo respeto por la naturaleza y amor por el estudio, mis padres **Luz del Carmen Millán Espinosa** y **Daniel Ortiz Nava**, su amor y esfuerzo conmigo y hacia mis hermanas son un ejemplo de que no importan los obstáculos que se presenten en nuestro camino siempre se obtiene lo que uno desea si se trabaja constantemente aunque eso implique muchas veces ir en contra de la corriente, gracias por enseñarme a no darme por vencida y su inmensa paciencia en esta aventura.

A mi hermanita Química Bacterióloga Parasitóloga **Gabriela Ortiz Millán** por estar siempre a mi lado jugando y soñando en que un día llegaremos a ser grandes científicas. Mientras una hermana común podría estar platicando conmigo sobre cosas insignificantes tus pláticas y desvelos a mi lado por bioquímica, biología molecular, genética y otras asignaturas son los recuerdos más felices de no dormir.

A mi hermanita **Ángela Ortiz Millán** que aun siendo la más pequeña de la familia siempre ha tenido los abrazos y palabras oportunas en los momentos más complejos. Ser tu hermana mayor es un aprendizaje constante que me ha brindado tener herramientas para enseñar y divulgar la biología, gracias.

A mis amigos biólogos de la Facultad de Ciencias, **Mónica Sánchez Díaz**, **Aketzalli González Santiago** y **Bismarck Almazán**, por apasionarse conmigo cada día más con esta profesión y sobre todo por compartir nuestras otras tantas formas de ver la vida. Gracias por las risas, los abrazos, las tareas en equipo, las horas de estudio y sobre todo por la utopía.

A mi amiga de UNIVERSUM, la pasante de biología **Nelli Rodríguez Hernández**, porque desde el momento en que nos conocimos compartimos intereses a fines. Ser tu amiga es un privilegio, gracias por compartir conmigo el poco tiempo libre que tenía para platicar de feminismo, educación, libertad y biología.

A mis amigas del Laboratorio de Micología (FMVZ), **M.V.Z Sofía Méndez Rivera** y **M. en C. Verónica Montes de Oca**, por ayudarme en el laboratorio, explicarme conceptos veterinarios y sobre todo su apoyo en los momentos donde el temor y la desesperación se apoderaban de mi por las muchas situaciones relacionadas al proyecto. Gracias por tranquilizarme y hacerme reír en los momentos más tensos.

A los intérpretes ambientales del Jardín Botánico (IB-UNAM), **Biól. Monserrat Ramírez**, **Biól. Enrique Lozada**, **Biól. Carlos Bravo**, **Biól. Oscar Jiménez** y **Biól. Nayeli González**, por ser mis amigos y colegas, ayudarme a curar mi ceguera vegetal y sobre todo por los gratos momentos que pasamos en los recorridos y en el cubículo de visitas guiadas. Compartir con ustedes la vida laboral mientras realizaba la tesis fue una experiencia enriquecedora en todos los aspectos.

Al mejor veterinario de fauna silvestre que conozco, el **M.V.Z Heber Ramón Santiago López**, por ser un maestro excepcional que se preocupó por mi aprendizaje durante mi servicio social en el Centro para la Conservación de Vida Silvestre "Los Reyes" así como por mi formación como profesionista durante y después de mi estancia. Querido maestro, amigo y cómplice, gracias por llevarme en el camino de la fauna con una inmensa pasión.

A mis maestros del Herpetario de la Facultad de Ciencias, **Biól. Mónica Salmerón Estrada**, **Biól. Roberto Romero Ramírez** y **Biól. Paola Talavera Barrera**, su pasión hacia la conservación y manejo de anfibios y reptiles mexicanos fueron determinantes para continuar con mi interés por este grupo de estudio.

A mi ex jefa del Jardín Botánico (IB-UNAM), la **M. en C. Carmen Cecilia Zacarías**, por permitirme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente, confiar en mis capacidades cuando otras personas dudaron de ellas y sobre todo por las facilidades para que pudiera ausentarme para realizar experimentos y otros trámites relacionados con la tesis. Miss, gracias por la oportunidad.

A mi ex jefe de UNIVERSUM, el **Biól. Daniel Barreto Oble**, por su apoyo y disposición para que pudiera ausentarme para ir a las salidas de campo del presente proyecto.

A mi actual jefa, a la **M. en C. Alejandra De Villa Meza**, gracias por permitirme ser becaria y ahora parte del equipo ambiental, valoro mucho tu apoyo para el cierre de esta etapa de mi vida académica y el tiempo que me dedicas para que continúe aprendiendo.

A mis más queridos y emblemáticos maestros **Biól. Alejandro Gordillo**, **Dr. Horacio Merchant** y **Dra. Maria del Carmen Guzmán** por brindarme la oportunidad de trabajar con ustedes en sus respectivas áreas, dedicarme tiempo para enseñarme sobre su trabajo y permitirme aprender. Gracias por confiar en esta estudiante de biología en sus primeros semestres.

Para los amores de mi vida, la biología, los libros, mi universidad y la biodiversidad mexicana, desde las bacterias que habitan en los lugares más recónditos hasta las majestuosas ceibas y ballenas.

A los animales que se encuentran en los CIVS y en el herpetario de la Facultad de Ciencias, a las plantas del JB-UNAM, a las personas que luchan por conservar y resguardar el patrimonio natural y cultural de nuestro país.

A los niños que me recuerdan lo maravilloso que es aprender educando.

ÍNDICE

RESUMEN	i
MARCO TEÓRICO	1
2.1 Riqueza de anfibios en México	1
2.2 Declinaciones poblacionales: situación y causas	2
2.2.1 Causas regionales (Grupo A)	5
2.2.2 Causas globales (Grupo B)	7
2.3 Quitridiomycosis: <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	9
2.3.1 Características de la especie	10
2.3.2 Proceso de infección	11
2.3.3 Introducción a las poblaciones de anfibios	14
2.3.4 Diagnóstico	16
2.3.5 Reportes en México	18
OBJETIVO	22
MÉTODO	22
4.1 Área de estudio	22
4.2 Muestreo	25
4.3 Riqueza específica y abundancia observada en la comunidad de anfibios .	27
4.4 Aislamiento y caracterización micológica	27
4.5 Histopatología.....	28
4.6 Diagnóstico molecular	29
4.6.1 Obtención de control positivo	29
4.6.2 Muestras de la comunidad	30
RESULTADOS.....	31
5.1 Riqueza específica y abundancia observada en la comunidad de anfibios .	31
5.2 Aislamiento y caracterización micológica	40
5.3 Histopatología.....	44
5. 4 Diagnóstico molecular	53
5.4.1 Obtención de control positivo	53
5.4.2 Muestras de la comunidad	56
DISCUSIÓN	59
CONCLUSIONES	70

ANEXO 1. Reportes de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en especies de anfibios en México hasta el 2014	72
ANEXO 2. Medios para aislamiento y caracterización micológica de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	75
ANEXO 3. Protocolos de tinción para la identificación de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> por histopatología.	76
ANEXO 4. Protocolo de tinción para la identificación de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> de medio de cultivo.	78
ANEXO 5. Protocolo para la extracción de ADN de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> modificado de Boyle et al., (2004)	79
ANEXO 6. Especies de anfibios de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) “Rancho El Salado”, Puebla, México	80
REFERENCIAS	84

Figura 1 Principales causas relacionadas con las declinaciones de anfibios de acuerdo a la IUCN.	5
Figura 2. Estructuras de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	11
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> con dos fases: móvil y estacional	12
Figura 4. Corte histopatológico de piel de rana arborícola de White (<i>Litoria caerulea</i>) con infección de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> severa.....	13
Figura 5. Ubicación del municipio del Jolalpan en el estado de Puebla.	23
Figura 6. Ubicación del ejido “Rancho El Salado” en el municipio de Jolalpan, Puebla.	23
Figura 7. Fotografía satelital del ejido “Rancho El Salado” delimitándose la zona urbana, Jolalpan, Puebla	24
Figura 8. Técnicas de inoculación para el aislamiento y cultivo de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	28
Figura 9. Riqueza de especies durante el monitoreo en temporada de lluvias de agosto 2013 a enero 2014 en la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) “Rancho El Salado”	34
Figura 10. Abundancia observada de anfibios durante el monitoreo en temporada de lluvias de agosto 2013 a enero 2014 en la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) “Rancho El Salado”	35
Figura 11. Abundancia observada de individuos por especie durante el monitoreo en temporada de lluvias de agosto 2013 a enero 2014 en la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) “Rancho El Salado”	35
Figura 12. Climograma de agosto 2013 a enero 2014 de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) “Rancho El Salado”	36
Figura 13. Abundancia absoluta observada de <i>Tlalocohyla smithii</i> durante el muestreo.	36
Figura 14. Abundancia absoluta observada de <i>Incilius occidentalis</i> durante el muestreo.	36
Figura 15. Abundancia absoluta observada de <i>Eleutherodactylus nitidus</i> durante el muestreo.	37
Figura 17. Abundancia absoluta observada de <i>Smilisca baudinii</i> durante el muestreo.	37
Figura 18. Abundancia absoluta observada de <i>Agalychnis dacnicolor</i> durante el muestreo.	37
Figura 19. Abundancia absoluta observada de <i>Lithobates spectabilis</i> durante el muestreo.	37
Figura 20. Abundancia absoluta observada de <i>Lithobates zweifeli</i> durante el muestreo.	37
Figura 21. Abundancia absoluta observada de <i>Craugastor mexicanus</i> durante el muestreo.	38
Figura 22. Abundancia absoluta observada de <i>Rhinella marina</i> durante el muestreo.	38
Figura 23. Abundancia absoluta observada de <i>Hyla arenicolor</i> durante el muestreo.	38
Figura 24. Abundancia absoluta observada de <i>Hypopachus ustus</i> durante el muestreo.	38
Figura 25. Índices de Shannon de la comunidad de anfibios de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) "Rancho El Salado" durante la temporada de lluvias en cuatro años de monitoreo.	39
Figura 26. Curva de acumulación de especies de anfibios en la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre "Rancho El Salado" durante cincuenta días de muestreo en cuatro temporadas de lluvia de agosto 2010 a enero 2014.	39
Figura 27. Crecimiento de <i>Rhizopus</i> sp. en primocultivo de medio mTGhL a 22°C obtenido después de 3 días de las muestras de miembro posterior de <i>Eleutherodactylus nitidus</i>	42
Figura 28. Crecimiento de <i>Fusarium</i> sp en dígito de miembro posterior de <i>Smilisca baudinii</i> después de 5 días.....	42
Figura 29. Primocultivo de la muestra de biopsia de dígito de miembro posterior de <i>Agalychnis dacnicolor</i> en medio mTGhL a 22°C, después de 4 días en dos de los siete fragmentos del tejido obtenido.....	43

Figura 30. Primocultivo de tejido de dígito de miembro posterior de <i>Lithobates spectabilis</i> en medio mTGhL a 22°C sin crecimiento después de 30 días en incubación.	43
Figura 31. Regiones corporales de donde se obtuvo tejidos para el diagnóstico histopatológico de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en anuros.....	45
Figura 32. Fotomicrografía de un corte transversal de dígito de miembro posterior de <i>Hypopachus ustus</i> con tinción de rutina Hematoxilina-Eosina 40X, sin lesiones.....	47
Figura 33. Fotomicrografía de un corte transversal de dígito de miembro posterior de <i>Plectrohyla cyclada</i> , especie arborícola, con tinción de rutina Hematoxilina-Eosina 40X, sin lesiones.	48
Figura 34. Fotomicrografía de un corte transversal de dígito de miembro posterior de <i>Eleutherodactylus nitidus</i> , especie terrestre, con tinción de rutina Hematoxilina-Eosina 40X, sin lesiones.....	49
Figura 35. Fotomicrografía de corte transversal de dígito de miembro posterior de <i>Lithobates spectabilis</i> , especie semiacuática con tinción de rutina Hematoxilina-Eosina 40X, sin lesiones.....	49
Figura 36. Corte transversal de dígito de miembro posterior de <i>Tlalocohyla smithii</i> , especie arborícola, con tinción de rutina Hematoxilina-Eosina 40X, con lesiones.....	50
Figura 37. Fotomicrografía de un corte transversal de dígito de miembro posterior de <i>Lithobates spectabilis</i> (Caso IP14-044) especie semiacuática con lesiones, teñido con la tinción de rutina Hematoxilina-Eosina.....	50
Figura 38. Fotomicrografía de corte transversal de dígito de miembro posterior de <i>Lithobates spectabilis</i> (Caso IP14-044), especie semiacuática, con tinción de rutina Hematoxilina-Eosina 40X, con lesiones.....	51
Figura 39. Fotomicrografía de corte transversal de dígito de miembro posterior de <i>Lithobates spectabilis</i> (Caso IP14-044), especie semiacuática, con tinción especial Gomori-Grocott, con lesiones.....	51
Figura 40. Fotomicrografía de corte de dígito de <i>Mixophyes fasciolatus</i> , especie australina terrestre, positiva a Bd con presencia de un esporangio colapsado (→) y la presencia de bacterias cocoides (B).....	52
Figura 41. Fotomicrografía de corte longitudinal de aparato bucal de renacuajos de <i>Lithobates zweifeli</i> , especie semiacuática, con tinción de rutina Hematoxilina-Eosina 10X, sin lesiones.....	52
Figura 42. Microfotografía de corte longitudinal de aparato bucal de renacuajos de <i>Lithobates zweifeli</i> , especie semiacuática, con tinción de rutina Hematoxilina-Eosina 40X, sin lesiones.....	53
Figura 43. <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	54
Figura 44. Preparación húmeda con tinción de Gram de un crecimiento de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en medio mTGhL.....	55
Figura 45. Electroforesis de productos de PCR-EP de control positivo de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> utilizando los iniciadores Bd1a y Bd2a, amplificación a 300pb de la cepa JEL423.....	55
Figura 46. Electroforesis de productos de PCR-EP anidado de muestras de anfibios de la UMA “Rancho El Salado” con lesiones histopatológicas, utilizando los iniciadores Bd1a y Bd2a, amplificación a 300pb.....	58

Tabla 1. Especies de anfibios registradas en las diferentes categorías de la IUCN	2
Tabla 2. Especies de anfibios enlistados en cada categoría de riesgo de la Norma Oficial Mexicana	4
Tabla 3. Especies de anfibios mexicanos enlistados en la lista roja de la IUCN (2016)	4
Tabla 4. Técnicas diagnósticas de la OIE para <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	18
Tabla 5. Especies de anfibios registradas en la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) “Rancho El Salado”	25
Tabla 6. Formas de conservación de las muestras para la detección de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	26
Tabla 7. Reactivos y concentraciones de PCR-EP para la detección de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	30
Tabla 8. Especies de anfibios de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) “Rancho El Salado” (2013)	33
Tabla 9. Número de muestras tomadas de cada especie para el diagnóstico de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en la comunidad de anfibios de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) “Rancho El Salado” (2013)	34
Tabla 10. Muestras tomadas para el diagnóstico de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> por aislamiento y cultivo en la comunidad de anfibios de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) "Rancho El Salado"	41
Tabla 11. Muestras tomadas para el diagnóstico de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> por histopatología en la comunidad de anfibios de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) "Rancho El Salado"	44
Tabla 12. Lesiones presentes en los anfibios de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) "Rancho El Salado"	45
Tabla 13. Muestras tomadas para el diagnóstico de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> por PCR en la comunidad de anfibios de la Unidad de Manejo para Conservación de la Vida Silvestre (UMA) "Rancho El Salado"	56
Tabla 14. Lecturas en biofotómetro de extracciones de ADN de la comunidad de anfibios de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) "Rancho El Salado" ..	57
Tabla 15. Lecturas en biofotómetro de extracciones de ADN de anfibios con lesiones de la comunidad de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre “Rancho El Salado”	58

RESUMEN

México es uno de los países que alberga mayor diversidad de especies de anfibios en el mundo, sin embargo estos se ven amenazados por diferentes factores entre los que se encuentra la enfermedad denominada quitridiomicosis causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). El diagnóstico temprano de la infección es indispensable para establecer estrategias de conservación, es por ello que en el presente trabajo de tesis se identificó la prevalencia de *Bd* durante la temporada de lluvias en la comunidad de anfibios de la Unidad de Manejo para la Conservación de la vida silvestre (UMA) “Rancho El Salado” en el municipio de Jolalpan, Puebla. El método consistió en tomar muestras de anfibios de las especies presentes en la localidad para ser procesadas por tres métodos: aislamiento y caracterización micológica, histopatología y biología molecular (PCR); en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por lo cual, a cada individuo se le identificó taxonómicamente, se anotaron sus medidas morfométricas y se le colectaron dos tipos de muestras, corte de dígito que se dividió a la mitad para ser empleada en el aislamiento e histopatología, y frotis para el método de PCR. Se muestrearon un total de 106 individuos (12 especies) para el método de PCR, de los cuales, 57 se diagnosticaron también por el método de aislamiento y caracterización micológica y 61 por histopatología. Ninguno de los individuos mostró lesiones macroscópicas sugerentes a *Bd*, en el método de aislamiento y caracterización no se logró aislar al agente patógeno. Durante la histopatología se registraron 13 individuos con lesiones, una de ellas sugerente a quitridiomicosis y en el método molecular utilizando como control positivo la cepa JEL 423 ninguna muestra fue positiva para *Bd*. Realizando un conceso en los resultados obtenidos bajo los tres métodos no se encontraron casos positivos de *Bd* en los anfibios de la UMA “Rancho El Salado” durante la temporada de lluvias del 2013 probablemente relacionado con las condiciones climáticas de la zona y la ausencia de especies invasoras que sean portadoras del patógeno.

MARCO TEÓRICO

2.1 Riqueza de anfibios en México

Los anfibios actuales se encuentran en el grupo taxonómico denominado Lissamphibia y son clasificados en tres órdenes: Anura -ranas y sapos-, Caudata -salamandras- y Gymnophiona -cecilias-. La representatividad mundial de estos organismos es de 7504 especies (Frost., 2016), las cuales se distribuyen principalmente en la región neotropical (Duellman, 1999). De acuerdo a la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés) los países que albergan más especies de anfibios son Brasil, Colombia, Ecuador, Perú y México (IUCN, 2012).

México se ubica por su riqueza en anfibios como uno de los países más importantes en anfibiofauna; con un total de 337 especies distribuidas en los órdenes Anura (237), Caudata (137) y Gymnophiona (3), por lo que resguarda el 21% de las familias de anfibios reportadas para el mundo, siendo las más representativas la familia Hylidae y Plethodontidae; a su vez del total de sus especies el 67.02% son especies endémicas (González *et al.*, 2014; Parra *et al.*, 2014).

En cuanto a la distribución en México, la riqueza de especies es mayor al sur del país, ubicándose un mayor número de especies endémicas a lo largo de la vertiente del Pacífico (Espinosa *et al.*, 2009). Los estados con mayor riqueza de anfibios son Oaxaca, Chiapas y Veracruz, mientras que con el mayor número de endemismos se encuentran Oaxaca, Guerrero, Veracruz, Puebla y Michoacán (Parra *et al.*, 2014). Sin embargo, esta diversidad ha estado sometida a fenómenos demográficos como las declinaciones, fluctuaciones y extinciones que actualmente son inconsistentes con las características naturales de las poblaciones (Alford, 2010).

Los estudios de riqueza, abundancia y de los factores que repercuten en la sobrevivencia e interacciones de las poblaciones de anfibios han sido complejos al momento de diferenciar los fenómenos demográficos, principalmente por los pocos estudios existentes. Cuando las especies a estudiar en una localidad poseen datos demográficos se pueden identificar los eventos antes mencionados (Green, 2003; Wake y Vredendurg, 2008).

Las declinaciones se definen como una tendencia descendente en el número de individuos a través de un periodo de tiempo (Pechmann y Wilbur, 1994); en una fluctuación natural las poblaciones presentan oscilaciones en el reclutamiento de individuos durante los eventos reproductivos de forma cíclica (Alford y Richard, 1999). La extinción, que puede ocurrir de manera

local, regional y mundial y es cuando los adultos de una especie en particular están ausentes de su sitio natural de reproducción por varios años (Blaustein *et al.*, 1994, 2009). Las poblaciones pueden experimentar alguno de los fenómenos demográficos antes mencionados, o bien presentar más de uno.

2.2 Declinaciones poblacionales: situación y causas

En escala mundial, la situación de las poblaciones de anfibios es alarmante. Se estima que el número de extinciones de especies de anfibios, a partir de 1980 es mayor al registrado en los últimos quinientos años (McCallum, 2007). Por lo menos 168 especies se clasifican como extintas y al menos un 43% de las especies presentan declinaciones poblacionales (Hussain *et al.*, 2012). Aunado a ello, existe un aumento considerable en el número de especies dentro de las categorías de “en peligro crítico” y “en peligro” de la IUCN (Tabla 1).

Tabla 1. **Especies de anfibios registradas en las diferentes categorías de la IUCN**

Categoría	Número de especies		
	1980	2004	2007
Extinto	25	34	34
Extinto en vida libre*	0	1	1
En peligro crítico*	231	427	441
En peligro	807	761	737
Vulnerables	734	668	630
Cerca de estar amenazada*	322	359	369
Baja preocupación	2322	2199	2277
Información insuficiente	1302	1294	1426

Número de especies de anfibios enlistados en las diferentes categorías de la IUCN en 1980, 2004 y 2007. Con * se indican las categorías con incremento en el número de especies en el listado más reciente; la categoría con una disminución en el número de especies es debido a que fueron clasificadas en categorías más altas; las especies que se encuentran en la categoría de información deficiente no poseen estudios poblacionales que determinen su estado de conservación. Tomado de: Alford, R. (2010).

La situación de las poblaciones y sus declinaciones comenzó a tomar importancia desde el Primer Congreso Mundial de Herpetología en 1989 al reunirse datos históricos de diferentes poblaciones de anfibios que experimentaban disminución de nacimientos e inmigrantes de forma considerable, todos ellos en lapsos de tiempo cortos, en áreas protegidas y aisladas (Pechmann y Wilbur, 1994; Stuart *et al.*, 2004). Por ello dos años más tarde, en 1991, se consolidó en la IUCN un grupo de especialistas de anfibios para el estudio de las declinaciones, bajo el nombre de DAPTF (Declining

Amphibian Populations Task Force). El DAPTF fue la primera instancia internacional que coordinó los esfuerzos para entender y controlar las declinaciones en las poblaciones de anfibios (Alford, 2010). Este grupo recopiló información de diferentes regiones donde había una o más especies que en los últimos años había registrado disminución en sus individuos. Las recopilaciones dieron lugar a la publicación de documentos de análisis a nivel mundial, siendo publicado el primero en 1993 (Vial y Saylor, 1993).

Con estos trabajos y el análisis generado se ha logrado identificar patrones dentro de las declinaciones poblacionales de anfibios. Por ejemplo, el mayor número de declinaciones se registran en las familias Bufonidae, Leptodactylidae, Hylidae y Ranidae, por lo que se les consideran como las familias más susceptibles a las declinaciones. Otro ejemplo es con respecto a la distribución biogeográfica y los hábitats, los anfibios que se distribuyen en el neotrópico en hábitats como bosques, montañas y ambientes asociados a corrientes de agua presentan un mayor número de casos de declinaciones (Stuart *et al.*, 2004).

La susceptibilidad de ciertos grupos taxonómicos o de poblaciones que se distribuyen en regiones tropicales se debe a tres factores: 1) son especies con interés comercial, 2) su historia de vida da lugar a que tengan sobrevivencia baja de larvas y tiempos de metamorfosis prolongados y 3) por un ciclo de vida bifásico con larvas acuáticas y adultos terrestres con alta permeabilidad en la piel, lo cual los hace más sensibles a los cambios ambientales (Lips *et al.*, 2004; Stuart *et al.*, 2004).

En el caso específico del neotrópico (Latinoamérica), también se han realizado diversos reportes donde se visualizan patrones de declinación en poblaciones que se distribuyen en altitudes superiores a los 600 m.snm (Gardner, 2001; Lips *et al.*, 2005; Skerratt *et al.*, 2007). Estas poblaciones son de especial interés para México, ya que son pocos los estudios que se han realizado sobre la demografía de los anfibios cuando es un territorio con una importante concentración de biodiversidad (Lips *et al.*, 2005; Parra *et al.*, 2014).

En México, se han reportado más casos de declinaciones poblacionales en anfibios en las cadenas montañosas del centro y suroeste. En todo el territorio, el 43% de las especies se encuentran amenazadas (Parra *et al.*, 2014). Conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT (SEMARNAT, 2002; SEMARNAT, 2010) las especies en las categorías de “Peligro de Extinción” y “Amenazadas” han aumentado en los últimos años (Tabla 2) y aunque de acuerdo a esta fuente no existen especies extintas en vida libre, en el compendio “Capital Natural de México” de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO, 2008) se presenta una lista de 29 especies que se consideran dentro de esta categoría, 18 pertenecientes al grupo de los anuros y 11 al grupo de los urodelos (Baena y Halffter, 2008), mientras que en la lista roja de la IUCN tampoco se mencionan anfibios que estén extintos en vida libre (Tabla 3).

Tabla 2. **Especies de anfibios enlistados en cada categoría de riesgo de la Norma Oficial Mexicana**

Categorías	2002	2010
Probablemente extinta	0	0
Peligro de extinción	6	7
Amenazada	42	44
Sujeta a Protección Especial	149	143
Total	197	194

Número de especies de anfibios en las diferentes categorías de la Norma Oficial Mexicana NOM-59-SEMARNAT, considerando la versión del año 2002 y la actualización del 2010. En la actualización del documento se considera un menor número de especies totales en alguna categoría de riesgo, incrementándose el número de especies en “Peligro de Extinción” y “Amenazadas”, pero disminuyen las especies “Sujetas a Protección Especial”.

Tabla 3. **Especies de anfibios mexicanos enlistados en la lista roja de la IUCN (2016)**

Categorías	No. de especies
En peligro crítico (Critically endangered)	90
En peligro de extinción (Endangered)	82
Vulnerable (Vulnerable)	43
Casi amenazada (Near threatened)	19
Menor preocupación (Least concern)	97
Datos insuficientes (Data deficient)	34
Total de especies enlistadas (2016)	365

Número de especies de anfibios mexicanos en las diferentes categorías de la lista roja de la IUCN, no todas las especies mexicanas se encuentran enlistadas, las cifras se refieren a la consulta: The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 01 August 2016.

Los efectos de las declinaciones poblacionales de anfibios en las comunidades ecológicas son principalmente la alteración en las cadenas tróficas acuáticas y terrestres, además de los cambios físicos y químicos de la materia orgánica y sedimentos del hábitat. Las alteraciones en las cadenas tróficas se desencadenarían al ser los anfibios un factor de control de las poblaciones, mientras que en la materia orgánica y sedimentos conforman una parte importante de la biomasa (Blaustein *et al.*, 2011).

Las causas de las declinaciones son diversas, entre ellas tenemos al cambio climático con el incremento en la radiación de rayos ultravioleta, la prevalencia de agentes causantes de enfermedades, las causas desconocidas o enigmáticas y las relacionadas con actividades antropogénicas como la pérdida del hábitat, introducción de especies, extracción y tráfico de fauna

(Alford, 2010). Estas causas pocas veces actúan de manera independiente ya que las poblaciones están sometidas a más de una por lo cual pueden fungir como causas principales o cofactores de las declinaciones presentando una variación temporal y espacial (Kiesecker *et al.*, 2001; Blaustein *et al.*, 2011). Las actividades que más se relacionan con las declinaciones poblacionales son la pérdida del hábitat, seguida por la contaminación y las causas desconocidas (Figura 1).

Collins y Storfer (2003) clasificaron las causas antropogénicas de las declinaciones en dos grandes grupos. Con respecto a la escala que actúan, el grupo A engloba a las causas relacionadas con los cambios en los ecosistemas por causas antropogénicas en una región, como la presencia de i) especies exóticas y exóticas invasoras, ii) sobreexplotación de ejemplares y iii) cambio del uso de suelo. Por otro lado, en el grupo B se agrupan las causas que tienen una relación con los ecosistemas globales y la evolución de los ejemplares, como i) el calentamiento global, ii) la contaminación y iii) enfermedades emergentes.

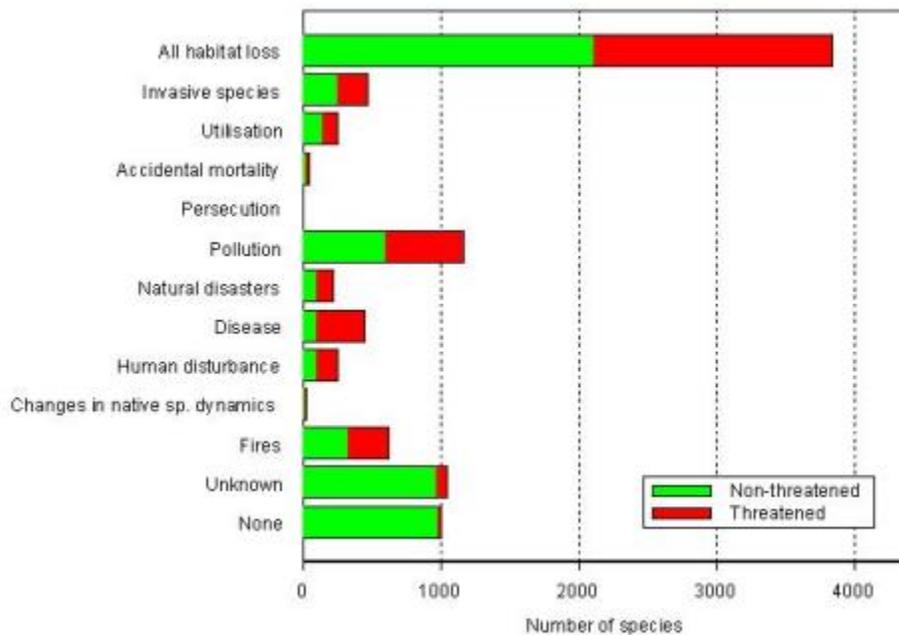


Figura 1 **Principales causas relacionadas con las declinaciones de anfibios de acuerdo a la IUCN.** Las tres principales son la pérdida del hábitat, contaminación y causas desconocidas, en esta se incluyen especies en la cual se tiene reportada la declinación de sus poblaciones, pero no las causas que provocan su disminución. Tomado de: IUCN, 2016b.

2.2.1 Causas regionales (Grupo A)

Especies exóticas y exóticas invasoras

Todas las especies exóticas son aquellas que se distribuyen fuera de su área nativa y que por condiciones favorables logran sobrevivir y reproducirse tornándose en especies exóticas invasoras al ser agentes de cambio y amenaza en el ecosistema donde se establecen (IUCN, 2000). Sus efectos en las poblaciones nativas de anfibios son directos ya que se incrementa la competencia por espacio y alimento, pueden introducir patógenos y son depredadores de larvas y adultos (Alford, 2010; Collins y Storfer, 2003).

En México el Comité Asesor Nacional sobre Especies Invasoras en la “Estrategia Nacional sobre especies invasoras en México: prevención, control y erradicación” (2010) indica que una de las principales causas de la pérdida de biodiversidad en nuestro país son las especies invasoras. El ISSG (2016), menciona en la base global de especies invasoras (Global Invasive Species Database) que en nuestro país se registran 210 especies exóticas invasoras, cinco de ellas perteneciente a la clase amphibia: *Eleutherodactylus planirostris*, *Lithobates castesbeianus*, *Osteopilus septentrionalis*, *Xenopus laevis* y *Rhinella marina*. Para el caso de *Rhinella marina*, Gavito y García (2010) la reportan como una especie invasora de las Áreas Naturales Protegidas del país. En el caso de *Lithobates castesbeianus* se ha realizado un único estudio sobre su impacto en las poblaciones nativas de nuestro territorio, explicando que su introducción a las poblaciones nativas es por la fuga de granjas reproductoras empleadas para el consumo humano (Luja *et al.*, 2010).

Sobreexplotación de ejemplares

El tráfico y comercio de anfibios que serán empleados como mascotas, fuentes de alimento, uso medicinal, de investigación y enseñanza son, en la mayoría de los casos, ejemplares capturados de vida silvestre, por lo cual las poblaciones disminuyen de forma considerable (Bishop *et al.*, 2012). A su vez, el transporte de estos ejemplares se considera de gran riesgo por la posibilidad de transportar patógenos a poblaciones nativas cuando no se tiene un control sanitario adecuado durante su vida en cautiverio (Alford, 2010).

En México, la introducción de especies con fines de conservación también ha dado lugar a la introducción de patógenos. En colonias de estudio y posterior reintroducción de la especie de ajolote mexicano *Ambystoma mexicanum*, no se realizó un diagnóstico del hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* lo que provocó que fuera introducido al liberarse ejemplares infectados del ajolote en las poblaciones conservadas (Frías *et al.*, 2008).

Cambio en el uso del suelo

El cambio en el uso del suelo es la remoción del hábitat nativo por procesos de deforestación, degradación, desertificación y otros eventos naturales. En las últimas décadas las variaciones

principales en el uso del suelo son por las diversas actividades humanas que dan lugar a la pérdida de la cobertura natural de una región, desencadenando la transformación de los ecosistemas y pérdida de la biodiversidad a una escala local y eventualmente regional, incluso se considera la principal causa en las declinaciones poblacionales de las especies de vertebrados en el mundo (Oliver y Morecroft, 2014).

Las consecuencias del cambio de uso de suelo en las poblaciones de anfibios dan lugar a la pérdida de sitios estratégicos para su ciclo de vida como son los sitios de reproducción, los cuerpos de agua donde se desarrollan los renacuajos (Alford, 2010) y las rutas de dispersión de individuos post-metamórficos (Cushman, 2006). Por ejemplo, la rana de madriguera *Smilisca dentata*, una especie en peligro de extinción, se distribuye en el centro de México en los estados de Jalisco y Aguascalientes de donde es endémica, las poblaciones del estado de Aguascalientes se ubican cerca de zonas urbanizadas y por lo tanto sus zonas de reproducción se han visto disminuidas por la construcción principalmente del aeropuerto estatal (Quintero y Vázquez, 2009).

2.2.2 Causas globales (Grupo B)

Calentamiento global

El calentamiento global es el incremento en la temperatura del planeta desde hace 150 años por la acumulación excesiva del dióxido de carbono en la atmósfera debido a las actividades humanas y causas naturales, que lleva de la mano el incremento de la fijación de nitrógeno y concentración de gases de efecto invernadero (Caballero *et al.*, 2007). El calentamiento global y los fenómenos meteorológicos que se le relacionan, como es el incremento en la exposición de rayos ultravioleta, dan lugar a que la sobrevivencia de especies de anfibios sea menor, especialmente por favorecer el establecimiento de patógenos en los individuos (Pounds *et al.*, 2006; Alford, 2010).

La región donde principalmente se ha evidenciado que el calentamiento global tiene un efecto en las poblaciones de anfibios son las zonas montañosas del trópico. El incremento de la temperatura superficial del Océano Pacífico genera un cambio en los patrones de precipitación y temperatura, por lo que los anfibios de altas altitudes son más susceptibles al establecimiento de patógenos, los cuales encuentran las condiciones ideoneas para su crecimiento y propagación (Pounds *et al.*, 1999). Por ejemplo, la rana *Atelopus ignescens* de Ecuador experimentó declinaciones poblacionales importantes como consecuencia del calentamiento global, debido a que en las zonas de su distribución se registró un cambio en la temperatura que optimizó el crecimiento del hongo quitridio pero también generó que los individuos de la especie tuvieran un estrés constante por la alteración en las condiciones de humedad y calor excesivos, disminuyendo así su respuesta inmune al patógeno (Pounds *et al.*, 2006).

La exposición a la radiación solar puede provocar en los renacuajos una mayor vulnerabilidad a las infecciones, por ejemplo al hongo oomycete *Saprolegnia ferax*. Este agente patógeno incrementa su incidencia cuando los renacuajos se encuentran en lugares con un menor nivel de agua y por lo tanto hay una mayor exposición a los rayos UV-B (Kiesecker *et al.*, 2001). Por otro lado, en la especie *Bufo bufo* los cambios en los patrones de temperatura han dado lugar que desde 1980 presenten declinaciones como resultado de una disminución en la condición corporal y talla de las hembras y por lo tanto disminuye la ovoposición (Reading, 2007).

La interacción entre el cambio en los patrones de temperatura y precipitación, y su relación con la susceptibilidad a los patógenos se ha estudiado en diferentes perspectivas, una de ellas desde el punto de vista de la fisiología. Los anfibios al estar en factores de estrés presentan niveles altos de corticosterona que inhibe la respuesta inmunológica ante los agentes patógenos, aunado a que estos individuos dependen de la temperatura, la respuesta inmunológica depende de la temperatura, a una menor temperatura esta disminuye, Algunos estudios proponen que el incremento de temperatura podría favorecer en aquellas regiones donde la temperatura ya es alta, sin embargo en las regiones donde se presenta bajas temperaturas puede favorecer el incremento de propagación de las enfermedades (Rollins, 2015).

Contaminación

La contaminación del ambiente involucra la introducción de contaminantes como el dicloro difenil tricloroetano (DDT), los policlorobifenilos (PCBs), los clorofluorocarburos (CFCs) y otros componentes orgánicos en un hábitat (Collins *et al.*, 2003). La introducción de contaminantes afecta la composición química y física de los sitios de distribución de los anfibios. Lo anterior, afecta su sobrevivencia por ser su fisiología y conducta el resultado directo de su interacción con el ambiente (Alford, 2010). En los renacuajos, la contaminación por pesticidas genera un retraso en su crecimiento y desarrollo, así como la supresión del sistema inmune por tener una acción directa en el timo (Hayes *et al.*, 2006). También se ha reportado que los desechos industriales, contaminantes orgánicos persistentes (POPs, por sus siglas en inglés), pueden alterar la conformación genética de los anfibios que se encuentran cerca de zonas industrializadas (González *et al.*, 2013).

Enfermedades infecciosas emergentes

Se denominan enfermedades infecciosas emergentes a las causadas por nuevos patógenos o patógenos que han aumentado su incidencia y distribución geográfica o aquellos recientemente descubiertos. Estas enfermedades son consideradas dentro de las causas principales de muertes de ejemplares de fauna silvestre (Daszak, 1999) y su incremento se debe a: 1) aumento de la susceptibilidad de los huéspedes, 2) aumento en la virulencia de los patógenos por cambios

climáticos, definiendo virulencia como la intensidad o gravedad de una enfermedad provocada por un agente infeccioso y 3) los patógenos han invadido recientemente nuevos huéspedes con un sistema inmune debilitado a causa del cambio de hábitat, contaminación, introducción de especies y cambio climático (Medina, 2010).

En los anfibios, estas enfermedades han repercutido de forma alarmante en las poblaciones, principalmente por alterar las funciones dérmicas como es el intercambio gaseoso. Se han descubierto dos enfermedades que causan la muerte en masa de anfibios: ranavirus y quitridiomycosis, ambas clasificadas como emergentes. En el grupo de ranavirus se reconocen diferentes virus que afectan a los anfibios, el ATV (*Virus Ambystoma trigrinum*), EHNV (Necrosis Hematopoyética epizootica, por sus siglas en ingles), FV3 (Virus de la rana tipo 3) y IVB (Iridovirus Bohle) han sido los mejor estudiados y documentados (Daszak *et al.*, 1999).

Los dos grupos de enfermedades infecciosas emergentes de los anfibios - ranavirus y quitridiomycosis - pueden causar declinaciones de las poblaciones locales considerables, debido a que tienen la capacidad de evolucionar sus estrategias de sobrevivencia conforme a la presencia de sus hospederos. Además, poseen la capacidad de infectar una gran gama de especies, sobrevivir largos periodos en condiciones adversas y se ven favorecidos por los cambios climáticos (Daszak *et al.*, 1999).

Las diferencias entre ambos grupos de enfermedades son considerables, la primera de ellas es que la quitridiomycosis afecta solamente a los anfibios mientras que los ranavirus afectan también a peces y reptiles, los ranavirus ocasionan hemorragia sistémica y necrosis mientras que la quitridiomycosis afecta la epidermis de los anfibios provocando hiperqueratosis, los ranavirus requieren de agentes patógenos (bacterias y hongos) que estén inmunosuprimiendo a los individuos para poder infectar a los anfibios en comparación con *Bd* que infecta directamente a los anfibios (Miller *et al.*, 2011).

2.3 Quitridiomycosis: *Batrachochytrium dendrobatidis*

Entre las enfermedades emergentes que afectan a la mayoría de las poblaciones de anfibios se encuentra la quitridiomycosis, causada por dos agentes patógenos: *Batrachochytrium dendrobatidis* (abreviado como *Bd*) (Longcore *et al.*, 1999) y *Batrachochytrium salamandrivorans* (abreviado como *Bsa*) (Martel *et al.*, 2013).

La quitridiomycosis está considerada como una de las enfermedades de los anfibios con particular importancia para la Oficina Internacional de Epizootias de la Organización Internacional de la Salud Animal (World Organisation for Animal Health - OIE), debido a que es una enfermedad contagiosa que ataca a un número inusual de ejemplares (Hyatt *et al.*, 2007), causando el 100% de mortalidad de los individuos infectados (Berger *et al.*, 2005a). El reporte histórico más antiguo de *Bd* que se tiene es de 1938 en una rana sudafricana de la especie *Xenopus laevis* (Rosenblum *et al.*, 2009), mientras que para *Bsal* su primer reporte fue en el 2013 en una población de *Salamandra salamandra* en los Países Bajos (Martel *et al.*, 2013).

2.3.1 Características de la especie

El hongo *Bd* se aloja en la epidermis de especímenes adultos y en partes bucales de renacuajos, específicamente en los denticulos (Alford, 2010). Los tres órdenes de anfibios son susceptibles al patógeno, siendo en los anuros y caudados donde hay numerosos reportes (Boyle *et al.*, 2004). Actualmente, de acuerdo a los registros mundiales, 520 especies han sido detectadas como positivas al quitridio, registrándose el mayor número de casos en Estados Unidos de Norteamérica, Australia y Puerto Rico (Aanensen, 2016). Para el orden Gymnophiona los reportes son recientes, el primero de ellos fue realizado en África (Doherty *et al.*, 2013), aunque se han evaluado ejemplares de Sudamérica, que no han tenido contacto con el patógeno (Gower *et al.*, 2013). A su vez se ha registrado en reptiles sin desarrollar alguna lesión (Kilburn *et al.*, 2011).

De acuerdo a su taxonomía, *Bd* es un hongo perteneciente a la división Chytridiomycota que posee zoosporas uniflageladas móviles en medios acuosos con forma elongada a ovoide de 3 a 5µm de diametro, que ultraestructuralmente se caracterizan por presentar crestas discoidales en las mitocondrias, el retículo endoplasmático rodeando a una serie de ribosomas agrupados que se extienden hasta el cinetosoma, numerosos glóbulos de lípidos y un núcleo anidado en una masa de ribosomas (Berger *et al.*, 2005b).

Por otro lado, el talo es eucárpico, monocéntrico o colonial con la presencia de uno o numerosos rizoides. Del talo colonial, cada fragmento forma un zoosporangio con una o más papilas de descarga y en etapas inmaduras se divide por un septo, la formación colonial no es tan común en los individuos infectados (Longcore *et al.*, 1999; Figura 2). Se diferencia de *Bsal* por características morfológicas, fisiológicas y patológicas. *Bsal* es un hongo con talo monocéntrico que a diferencia de *Bd* genera un tubo germinativo y en los individuos infectados forma colonias, sus zoosporas son esféricas con una superficie irregular y un núcleo que no se encuentra rodeado por la masa de ribosoma como en *Bd*. Fisiológicamente, el rango de temperatura en el cual crece el quitridio es de 5°C a 22°C, siendo más óptimo de 10°C a 15°C, siendo un rango más bajo que el de *Bd*; y

patológicamente, desarrolla su talo de forma interna en los queratinocitos, generando erosiones multifocales y ulceraciones en la superficie de la piel de todo el cuerpo (Martel *et al.*, 2013).

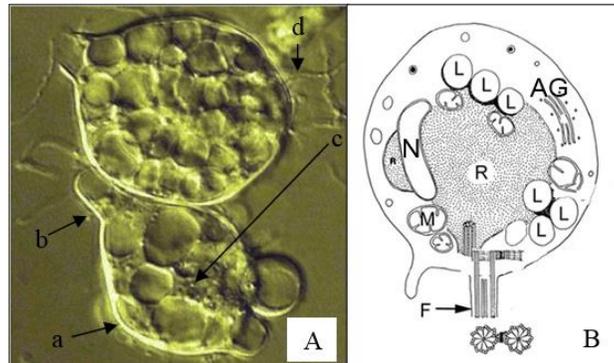


Figura 2. **Estructuras de *Batrachochytrium dendrobatidis*** A) Electromicrografía de zoosporangio (a) donde se logra observar la papila de descarga (b), zoosporas (c) y rizoides (d). B) Esquema de zoospora; se observan las estructuras intracelulares que lo diferencian de otras especies de la división Chytridiomycota: ribosomas (R), mitocondrias (M), lisosomas (L), aparato de golgi (AG), núcleo (N) y flagelo (F). Modificado de: University of Alabama (2014).

En cuanto a sus características ecológicas *Bd* es un hongo necrótrofo que se encuentra en hábitats acuáticos y suelos húmedos, adaptado a intervalos de temperatura de 4°C a 28°C, siendo el intervalo de 17°C a 25°C la temperatura en la que presenta un crecimiento más rápido (Longcore *et al.*, 1999; Alford, 2010). Su desarrollo y reproducción requiere de celulosa, queratina y quitina, los cuales se encuentra en el estrato córneo y espinoso de las capas externas de la epidermis de anfibios metamórficos (Daskaz *et al.*, 1999). Debido a lo anterior, el quitridio necesita infectar los tejidos de estos individuos para desarrollarse y reproducirse. También encuentra estos nutrientes en las piezas queratinizadas del aparato bucal de renacuajos, solamente esta región anatómica esta queratinizada en los estadios tempranos de vida de anfibios con desarrollo indirecto (Berger *et al.*, 2000).

2.3.2 Proceso de infección

La infección de *Bd*, es de tipo horizontal, al estar los individuos en contacto directo con el agente dentro de cuerpos de agua donde se albergan una cantidad representativa de zoosporas móviles y animales infectados. El ciclo de vida y el proceso de infección están estrechamente relacionados y se dividen en dos estados principales: móvil y estacional (Berger *et al.*, 2005 b; Figura 3).

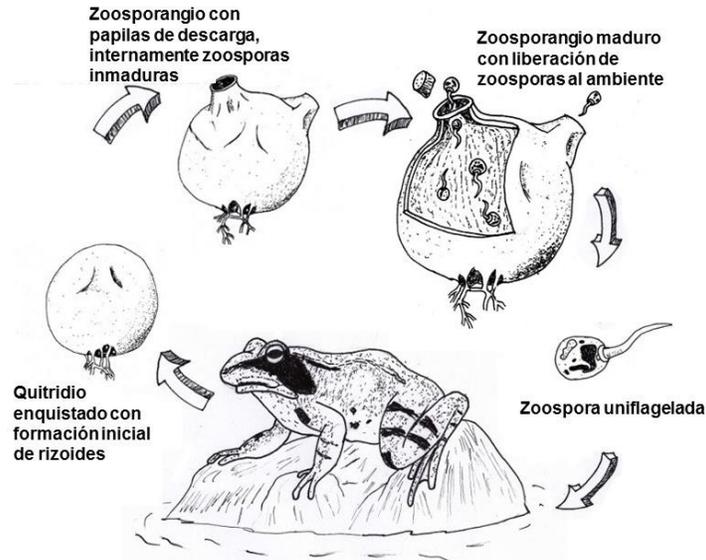


Figura 3. **Ciclo de vida de *Batrachochytrium dendrobatidis* con dos fases: móvil y estacional.** La fase móvil comprende a la zoospora en el medio acuático hasta que encuentra a un hospedero; la fase estacional es el desarrollo del zoosporangio y zoosporas en la epidermis del hospedero. Modificado de: The Herpetological Society of Ireland. (2015).

En el primer estado, que es el móvil, las zoosporas se encuentran en los cuerpos de agua hasta albergarse en la epidermis de un hospedero, posteriormente se desplaza hacia los estratos más profundos y se enquista reabsorbiendo su flagelo y formando una pared celular. En condiciones de cultivo el enquistamiento ocurre después de 24 horas (Piotroski *et al.*, 2004; Berger *et al.*, 2005 b). Posteriormente, en el segundo estado del ciclo de vida, el quitridio enquistado desarrolla una serie de rizoides ramificados que crecerán hacia las células adyacentes en el estrato corneo de la epidermis, conformando el zoosporangio. El zoosporangio será la estructura de reproducción por lo cual presentará internamente división mitótica para la generación de zoosporas que por medio de una papila inoperculada serán liberadas a la superficie de la epidermis o a los espacios intracelulares, continuando con el ciclo de vida y el proceso de infección (Berger *et al.*, 2005 b). La generación de zoosporas en *Bd* es de tipo asexual (Rosenblum *et al.*, 2009).

Durante su ciclo de vida *Bd* genera alteraciones cutáneas en los individuos hospederos como son la sobreproducción de queratina madura conocida como hiperqueratosis del *stratum corneum* y el aumento en el número de células epiteliales que se refiere a la hiperplasia epidermal del *stratum granulosum* (Boyle *et al.*, 2004). En los otros estratos epidérmicos y con menor proporción en el *stratum basale*, el quitridio genera picnosis y necrosis como resultado de la producción de metalopeptidasas, una serie de enzimas que degradan la queratina celular (Rosenblum *et al.*, 2009; Berger *et al.*, 2005 b). Por otra parte, durante la formación del zoosporangio y la liberación de zoosporas, el quitridio ocupa el citoplasma de las células epiteliales por lo que evita el

intercambio del agua y electrolitos, provocando una tumefacción y degeneración hidrónica formándose vacuolas en el citosol y organelos del citoplasma que se conoce como esponjosis y desarreglo de las capas epidermales por el aumento de tamaño de las células o hipertrofia (Berger *et al.*, 2005 b; Figura 4).

En los órganos internos no hay lesiones, pero como la piel en los anfibios mantiene el intercambio osmótico, fisiológicamente desencadena una disminución en los niveles óptimos de sodio, potasio, magnesio y cloro en el plasma sanguíneo, por lo cual genera un desbalance osmótico por la pérdida de electrolitos, deshidratación grave y la muerte (Voyles *et al.*, 2007; 2009).

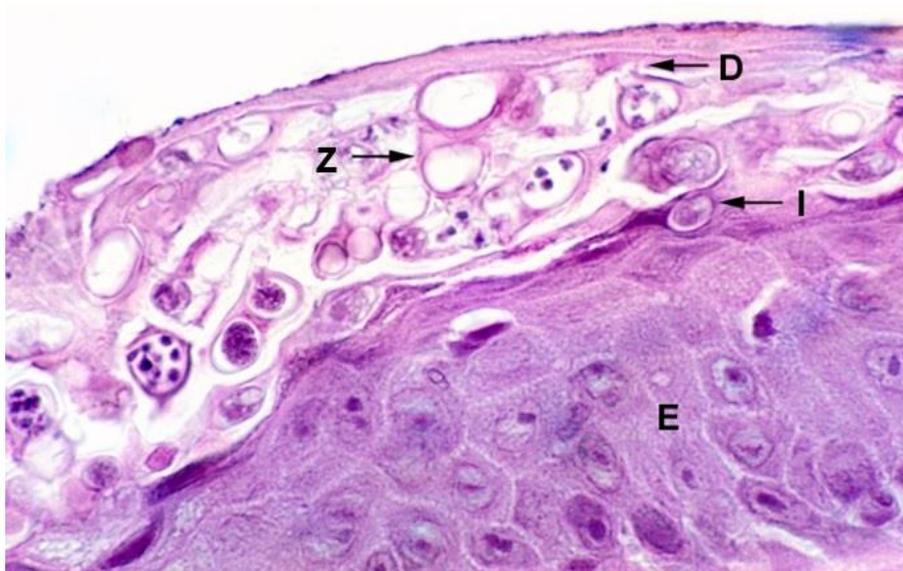


Figura 4. **Corte histopatológico de piel de rana arborícola de White (*Litoria caerulea*) con infección de *Batrachochytrium dendrobatidis* severa.** Se señalan las diferentes fases del ciclo de vida de Bd: quitridio en estado inmaduro (I), zoosporangio en estado maduro con papila de descarga (D), zoosporangio después de la descarga de zoosporas (Z), epidermis (E). Modificado de: Berger, L., Speare, R., Kent, A. (2000).

Cuando la infección es crónica, los individuos enfermos presentan una reducción severa en los electrolitos plasmáticos, que termina por ocasionar signos neuronales anormales y contracción muscular antes de la muerte. La causa por la cual *Bd* provoca estas alteraciones es por su repercusión en el *stratum granulosum*, la cual es la región de la epidermis que posee un mayor número de mitocondrias y se encarga principalmente del balance osmótico de la dermis, las actividades de hidratación y respiración. (Voyles *et al.*, 2007; Voyles *et al.*, 2009). Las características genéticas de *Bd* también repercuten en su patogenicidad en los individuos infectados, por ejemplo en su secuencia presenta familias de genes que se asocian con la síntesis de metalopetidasa y proteasas, y dependiendo de la etapa del ciclo de vida del patógeno la expresión de dichos genes difiere (Rosenblum *et al.*, 2009).

La vulnerabilidad de los anfibios para poder ser colonizados por el agente se debe principalmente a su piel (Alford, 2010). La piel de los anfibios está compuesta por una epidermis que posee múltiples capas de células epiteliales y células especializadas, una de ellas denominada *stratum corneum*, está se caracteriza por poseer queratinocitos, que son células especializadas con un citoesqueleto de queratina, la cual es una fuente nutritiva para *Bd*. Por otra parte, algunas especies de anfibios poseen colonias de microorganismos en la piel, que establecen relaciones simbióticas con el agente patógeno, las glándulas mucosas y serosas generan péptidos antimicrobianos que promueven la humedad y control de temperatura para el óptimo desarrollo del agente patógeno (Rosenblum *et al.*, 2009; Voyles *et al.*, 2011).

2.3.3 Introducción a las poblaciones de anfibios

Existen numerosos estudios que plantean hipótesis sobre el origen del quitridio y como ingresa a las diferentes poblaciones de anfibios. Skerrat *et al.*, (2007) mencionan que existen dos hipótesis que podrían explicar la distribución global del quitridio, una de ellas llamada “Emerging Endemic Hypothesis” (EEH), en la que se propone que por cambios en la temperatura, humedad y lluvia *Bd* incrementó su potencial patógeno para sobrevivir, aunado a ello dichos cambios en el ambiente afectaron de manera directa la fisiología de los anfibios por lo que son más susceptibles al hongo (Rachowicz *et al.*, 2005).

La segunda hipótesis “Novel Pathogen Hypothesis” (NPH) plantea que *Bd* es un hongo nativo de África que estaba en contacto con anfibios del género *Xenopus* sp. sin provocar alguna lesión, pero por el transporte de esta especie de anfibio con fines comerciales y de investigación, logró llegar a diversos países donde un inadecuado manejo en cautiverio favoreció que estuviera en contacto con especies nativas, las cuales al no tener un sistema inmune contra el quitridio fueron susceptibles a ser infectadas (Boyle *et al.*, 2004; Weldon *et al.*, 2004).

Durante algunos años ambas hipótesis fueron cuestionadas, Boyle *et al.*, (2004) al estudiar la variabilidad genética de cepas de *Bd* que hasta el momento se tenían reportadas encontraron que la variabilidad entre estas no era significativa para relacionarlas de manera histórica con los anfibios por lo cual la NPH era la hipótesis más válida. Lips *et al.*, (2008) en un estudio sobre la dispersión del quitridio en centro y sur de América proponen que el patógeno fue introducido en numerosas ocasiones y que el patrón de dispersión poseía una direccionalidad del centro del continente hacia el sur por lo que la hipótesis NPH era más válida para estas poblaciones.

La colecta de más cepas de *Bd* permitió a Rosenblum *et al.*, (2013) estudiar filogenéticamente la variabilidad entre ellas e indagar más sobre la validez de las hipótesis. En su estudio encontraron

que la variabilidad genética de las cepas proviene de diferentes linajes que al ser comparadas a una escala global reflejan una diversidad ancestral que se remonta a millones de años que a pequeñas escalas geográficas no posee una estructura. Con ello proponen que en algunas localidades la diversidad genética entre las cepas es muy baja por lo cual se les considera endémicas de la región, mientras que en otras existen cepas endémicas pero que por razones aún incógnitas interactúan con otras de reciente introducción. Es por ello que dependiendo de la población de estudio y la región cualquiera de las dos hipótesis puede ser válida. Incluso la hipótesis EEH es soportada por estudios, por ejemplo el realizado por Rodríguez *et al.*, (2014) quienes al hacer un diagnóstico molecular con muestras históricas del sureste de Brasil encontraron dos cepas endémicas que indican que *Bd* no fue introducido en la región por el tráfico de fauna.

La permanencia de *Bd* en las poblaciones tiene relación con las características del patógeno y las poblaciones de anfibios, entre estas se encuentran:

- **Patogenicidad.** Su capacidad para producir lesiones es debido a su gran adaptación a las pieles de los anfibios, su sobrevivencia a diferentes temperaturas, nutrientes y la preferencia a sustratos con nutrientes que requiere para su desarrollo (Woodhams *et al.*, 2011).
- **Susceptibilidad.** El quitridio posee la capacidad de infectar a los individuos en cualquier etapa de su ciclo de vida (Skerrat *et al.*, 2007), aunque genere un grado de lesión diferente en cada una.
- **Persistencia.** La independencia en el estado de zoosporas puede persistir en cuerpos de agua por tiempos prolongados y crecer lentamente a temperaturas de 4°C (Piotroski *et al.*, 2004). Además de que al no infectar algún individuo puede generar un gran número de metalopeptidasas y otras familias de proteasas, las cuales le dan la habilidad de degradar las proteínas de su entorno (Rosenblum *et al.*, 2009).
- **Ambiente.** La dinámica de la enfermedad es dependiente del contexto ambiental, una infección grave es comúnmente relacionada con temperaturas bajas por la dependencia de la longevidad de las zoosporas a la temperatura (Woodhams *et al.*, 2011).

Es importante considerar que no solo la quitridiomycosis es el agente causal de las declinaciones de las poblaciones de anfibios, éstas también son provocadas por la interacción de varios factores que actúan de forma sinérgica. La presencia de patógenos y parásitos en una población, además

de afectar directamente el estado físico del individuo, promueven un incremento en la respuesta al estrés, lo que dará lugar a que sean vulnerables a contaminantes y a cambios radicales en su hábitat (Alford, 2010). Algunos organismos pueden tener cualidades adaptativas o bien cambiar su distribución a áreas que sirvan como refugio, sin embargo, para que estas cualidades adaptativas permitan a los organismos sobrevivir, se necesitan periodos de tiempo prolongados comparados con lo rápido que se están presentando las declinaciones (Gardner, 2001).

La estrategia principal que se está empleando contra *Bd* es prevenir la diseminación a poblaciones aún no expuestas mediante el establecimiento de colonias *ex situ* y el desarrollo de tratamientos *in situ*, estas serán exitosas dependiendo de la región considerando los contextos sociales donde se desarrollen los programas de recuperación y las condiciones ambientales que posea (Woodhams *et al.*, 2011). Los tratamientos en cautiverio son antifúngicos y control biológico, entre los cuales se encuentra la bioaumentación, que consistirá en incrementar una comunidad bacteriana en la piel que favorezca la respuesta inmune al quitridio. En ocasiones estos tratamientos se han utilizado en vida libre, como el crustáceo *Daphnia* sp. que es un organismo filtrador que consume algas, bacterias y protozoarios de 1 a 100µm y se ha reportado que puede alimentarse de las zoosporas de *Bd* (Buck *et al.*, 2011).

2.3.4 Diagnóstico

En el diagnóstico de un agente infeccioso es importante su aislamiento e identificación, por ello se recurren a métodos que se clasifican en convencionales, inmunológicos y de biología molecular (Madigan *et al.*, 2004). Los métodos convencionales son de tres tipos: cultivo microbiológico, histopatología u observación directa por microscopía. El cultivo microbiológico consiste en el aislamiento, cultivo e identificación del agente a través de muestras de tejidos afectados que son cultivados en medios enriquecidos para que el agente tenga las condiciones más óptimas para crecer de forma exponencial y ser posteriormente identificado al microscopio con ayuda de técnicas de tinción (Madigan *et al.*, 2004).

En *Bd*, el aislamiento se realiza a partir de muestras cutáneas de anfibios metamorfos y del aparato bucal de renacuajos, empleando un medio de cultivo selectivo de mTGH (medio sólido de triptona). El medio se deja incubar a una temperatura entre 17°C - 23°C de dos a cuatro semanas, si se obtiene crecimiento del hongo se identifica al observar una pequeña muestra al microscopio (Longcore *et al.*, 1999).

Uno de los factores que influye en el crecimiento de *Bd* en los medios de cultivo son los requerimientos nutricionales especialmente aquellos con nitrógeno. Se ha comprobado que el

quitridio crece mejor en medios con triptona al 1%, sin adición de otros nutrientes ya que en el caso de utilizar solución salina, agar asparagina-glucosa o glucosa y tiamina 1% las colonias mueren o bien tienen un crecimiento más lento (Piotroski *et al.*, 2004).

En los estudios histopatológicos al utilizar muestras de piel, que han sido procesadas por diferentes técnicas para su observación en microscopía óptica y de transmisión, se puede observar en las capas epidérmicas las diferentes etapas del ciclo de vida de *Bd*. Las estructuras del agente, su forma, tamaño y el efecto que tiene en las capas dérmicas nos permiten detectar la prevalencia en una población y verificar si su presencia está alterando el estado anatómico, químico y fisiológico, generando la enfermedad (Smith, 2007). En esta técnica de diagnóstico se requiere de un conocimiento previo de la morfología del patógeno, de la histología normal de la piel y la habilidad para diferenciar otras estructuras (Berger *et al.*, 2000).

Los métodos inmunológicos detectan al patógeno y sus productos, entre ellos se encuentran los Ensayos por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), los cuales se basan en la detección de la actividad inmunológica y enzimática de los antígenos o anticuerpos marcados con una enzima (Madigan *et al.*, 2004). El método de ELISA que se emplea para medir la respuesta inmunológica es el método indirecto debido a que detecta los anticuerpos después de una infección (Stice y Briggs, 2010).

Los métodos basados en biología molecular son los más sensibles al basarse en el ADN, considerando: 1) los ácidos nucleicos del agente patógeno pueden cuantificarse en los tejidos infectados; 2) los ácidos nucleicos pueden visualizarse; 3) se puede detectar la secuencia de nucleótidos en una determinada molécula de ADN la cual es específica; y 4) las secuencias pueden amplificarse para incrementar la cantidad necesaria para el análisis. Uno de los métodos más utilizados es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (Madigan *et al.*, 2004).

El diagnóstico de *Bd* por PCR puede realizarse a partir de cualquier tipo de muestra, y tiene como objetivo principal identificar la presencia del patógeno mediante la amplificación del ADN de regiones altamente conservadas, las cuales para *Bd* son 5.8s, 18s y 28s, éstas se encuentran separadas por los espacios de transcripción internos ITS-1 e ITS-2, además de un espacio intergénico de alta variabilidad genética (Boyle *et al.*, 2004).

Los dos tipos de PCR que son utilizadas para la identificación de *Bd* son: 1) PCR-RT (PCR en tiempo real), y 2) PCR-End point (PCR de punto final), la principal diferencia entre estas dos técnicas es que la técnica de PCR-RT permite detectar la presencia o ausencia de *Bd* y cuantificar su número de zoosporas, mientras que la PCR-EP sólo identifica la presencia o ausencia con un

ligero menor grado de sensibilidad (Kriger *et al.*, 2006). Ambas modalidades de la técnica pueden detectar a *Bd* con una pequeña cantidad de 10 zoosporas presentes en las muestras, pero esto no es determinante para indicar que el organismo del que proviene la muestra este enfermo de quitridiomycosis (Garner *et al.*, 2006). Para afirmar que un individuo tiene la enfermedad se requiere de estudios histopatológicos y de la presencia de signos clínicos (Smith, 2007).

Existen diversos protocolos para diagnosticar la presencia de *Bd*, en todos ellos se busca que las muestras que se vayan a procesar sean fáciles de obtener, eficaces para detectar la presencia del patógeno, que se puedan almacenar y sean viables después de lapsos de tiempo prolongados y que no se obtengan lastimando o provocando mucho estrés en los ejemplares a diagnosticar (Hyatt *et al.*, 2007). Las muestras que principalmente cubren estas características son las biopsias de dígito y piel, baños de la dermis y frotis de la superficie ventral del abdomen y miembros posteriores, éstas pueden ser procesadas posteriormente bajo diferentes métodos, mientras sean almacenadas a una temperatura de 4°C para evitar disminuir el número de zoosporas de *Bd* (Tabla 4).

Tabla 4. ***Técnicas diagnósticas de la OIE para Batrachochytrium dendrobatidis***

Método	Diagnosis sospechosa	Diagnóstico confirmatorio
Signos macroscópicos	D	D
Histopatología	C	C
Inmunoperoxidasa	B	B
Microscopia electrónica de transmisión	C	C
Microscopia inmunoelectrónica	C	C
Aislamiento	Na	Na
ELISA de captura de antígeno	Na	Na
ELISA de captura de anticuerpo	Na	Na
TaqMan PCR	A	A
Análisis de producto de PCR	B	A

Métodos para el diagnóstico de *Bd* utilizados por la Organización Internacional por la Salud Animal (OIE, por sus siglas en inglés) para realizar una diagnosis sospechosa y un diagnóstico confirmatorio. Cada método posee diferente validez: método recomendado (A), método estándar (B), método aplicable solo en algunos casos (C), método no recomendado (D), método no aplicable (Na). Modificado de: World Organization for Animal Health (OIE, 2011).

2.3.5 Reportes en México

Las declinaciones de anfibios en Estados Unidos de América, Canadá y América Central han sido bien documentadas en los últimos años (Lips *et al.*, 2004), siendo el principal interés de estos estudios identificar las causas por las cuales las poblaciones de anfibios han sido afectadas. Entre

las causas principales de las declinaciones se ha logrado identificar que la propagación de *Bd* ha repercutido de forma alarmante en las poblaciones de anfibios de Brasil, México y Ecuador (Lips *et al.*, 2005).

En México, hasta el año 2014, se ha reportado la presencia de *Bd* en individuos de vida libre en doce estados, siendo Chiapas, Oaxaca y Veracruz los estados con el mayor número de especies afectadas (Anexo I). A su vez, el quitridio se ha reportado en ejemplares en cautiverio de *Agalychnis dacnicolor*, *Ambystoma mexicanum*, *Bolitoglossa platydactyla*, *Bolitoglossa rufescens*, *Hyla eximia*, *Lithobates catesbeianus*, *Lithobates montezumae*, *Pseudoeurycea belli*, *Pseudoeurycea cephalica*, *Pseudoeurycea leprosa* y *Pseudoeurycea longicauda* (Frías *et al.*, 2008; Van Rooij *et al.*, 2011; Galindo *et al.*, 2014), y se ha propuesto a través de nicho ecológico a la Sierra Madre Occidental, Faja Volcánica Transmexicana, Tierras Altas de Chiapas e Istmo de Tehuantepec, las áreas más propicias para el establecimiento del patógeno (Ron, 2005).

Los estudios de prevalencia del quitridio iniciaron en México al detectarse declinaciones poblacionales de anfibios en zonas montañosas poco perturbadas (Young *et al.*, 2001; Lips *et al.*, 2004). Lips *et al.* (2004) compararon la riqueza de especies registradas al sureste del país durante el año 2000 con la riqueza reportada en las colecciones herpetológicas durante 1970 y 1980, encontrando que para Guerrero y Oaxaca existen especies con baja abundancia o ausentes de sus áreas de distribución nativa en años recientes. Hale *et al.*, (2005), al hacer monitoreos anuales de las poblaciones al norte del país de *Rana tarahumarae*, *Rana magnaocularis* y *Rana pustulosa* entre los años de 1975 a 1999, encontraron disminución de sus poblaciones.

Para indagar en las causas de las declinaciones, Lips *et al.*, (2004) y Hale *et al.*, (2005) consideraron llevar a cabo el diagnóstico del quitridio, reportando en los dos estudios individuos positivos al agente patógeno a través de la observación de los dentículos y pruebas histológicas, respectivamente. Ambos trabajos proponían que la presencia del quitridio podría estar relacionada con poblaciones que se distribuían en altitudes mayores por las condiciones climáticas, las cuales favorecían el ciclo de vida del patógeno, lo que fue motivo de investigación. Familiar (2010), generó un mapa de distribución potencial de *Bd*, con los datos de los estados de Oaxaca y Guerrero, para analizar qué factores climáticos y geográficos favorecían la presencia del quitridio en estas poblaciones, encontrando que el factor que más influía en la prevalencia del agente a altitudes mayores era la temperatura.

Considerando las condiciones climáticas y su relación con los brotes de *Bd*, los trabajos se enfocaron en evaluar la prevalencia de *Bd* en poblaciones que se distribuyeran en zonas montañosas de la república mexicana. Frías *et al.*, (2008) realizaron un diagnóstico en treinta especies de doce estados de la república mexicana de las cuales catorce especies, la mayoría

endémicas con distribución restringida en el Eje Neovolcánico Transversal, resultaron positivas al quitridio. En el estado de Chiapas, Muñoz (2010) tomó muestras de diferentes especies de anfibios y diagnosticó positivos a veinticuatro especies, la mayoría de ellas pertenecientes a la familia Hylidae. Luría *et al.*, (2011) diagnosticaron positivos a individuos de la especie *Plectrohyla arborescandens* en la Sierra Negra de Puebla; Van Rooij *et al.*, (2011) reportaron en Veracruz, Hidalgo y Estado de México catorce especies de salamandras positivas a *Bd* y Cabrera (2012) reportó diez especies infectadas en la Sierra Norte y Sierra Mixe de Oaxaca.

Luja *et al.*, (2012) consideraron que existía una alta probabilidad de que las poblaciones de *Pseudacris hypochondriaca curta* (Cope, 1867) de la península de Baja California estuvieran infectadas, por lo que realizaron la primera evaluación de *Bd* en una población mexicana de zonas áridas y con altitudes de 97 m.snm a 280 m.snm. Los resultados de este estudio fueron positivos a la presencia del quitridio, considerándose el primer reporte en México en altitudes por debajo de los 1000 m.snm. Cortés (2014) también muestra que *Bd* se distribuye en altitudes menores a las propuestas anteriormente en la cuenca hidrológica Cuixmala-Chamela, donde tres individuos de las especies *Smilisca fodiens* (2) y *Leptodactylus melanonotus* (1) fueron positivos a una altitud de 600 m.snm.

Los casos positivos a la presencia de *Bd* fueron reportados en poblaciones que tenían poca perturbación, incluso en Áreas Naturales Protegidas (Luja *et al.*, 2012; Cortés, 2014). Sin embargo, en ninguno de los estudios se corroboró la relación entre el grado de perturbación y la prevalencia de *Bd*. Posteriormente, Murrieta *et al.*, (2014) estudiaron la posible relación entre la presencia de *Bd* y el grado de perturbación en las poblaciones en el estado de Veracruz, tomando muestras de anfibios que se distribuían en zonas poco perturbadas y zonas con algún grado de manejo agrícola, se encontraron casos positivos en las zonas poco perturbadas.

Además de los reportes que se han realizado y las relaciones entre factores abióticos y la prevalencia del quitridio, también los brotes de *Bd* en México han sido estudiados para indagar sobre la propagación del quitridio en América (Lips *et al.*, 2004). Al diagnosticar en especímenes de anfibios de México, Guatemala y Costa Rica depositados en colecciones científicas durante 1964 al 2009 se propone que la diseminación del quitridio a Sudamérica ocurrió a partir de poblaciones de México en 1970 llegando a Costa Rica en 1990, debido a que el registro más antiguo para estos países se encuentra en México en un ejemplar de 1972 (Cheng *et al.*, 2011).

Por otro lado, las cepas provenientes de México presentan un menor grado de virulencia en comparación con las poblaciones centroamericanas probablemente porque el patógeno ha evolucionado más rápido que la respuesta inmune de sus hospederos o porque las poblaciones en

México sobreviven a la infección y persisten, recuperándose en condiciones climáticas favorables para ellas pero no para el quitridio (Phillips *et al.*, 2013).

Otro estudio que apoya dicha hipótesis es el trabajo realizado por Velo *et al.*, (2012) quienes, al hacer una reconstrucción de patrones genéticos de diferentes muestras tomadas de *Bd*, proponen a México como centro de diseminación del patógeno hacia América Central. Se propone que el ingreso del quitridio a México fue por la propagación de especies invasoras y portadoras del patógeno provenientes de Norteamérica, como lo es *Lithobates catesbeianus* en el estado de Baja California desde 1800 (Luja *et al.*, 2012; Huss *et al.*, 2014), así como por la importación de ejemplares como animales de compañía, los cuales en su mayoría se encuentran infectados, como *Agalychnis dacnicolor* (Frías *et al.*, 2008) y posteriormente se fue dispersando, aunque se considera que existen múltiples introducciones del quitridio y no sólo por México (Lips *et al.*, 2008).

El reporte más reciente del quitridio en poblaciones de cautiverio en la Ciudad de México considera que el transporte de especies con fines comerciales y reintroducción, así como el mantenimiento en acuarios y herpetarios son los potenciales dispersadores del quitridio. El rápido movimiento de la enfermedad a través del territorio sin regulaciones sanitarias provoca que no haya un control entre las colonias infectadas y las colonias sanas silvestres, y que las descargas de agua de los acuarios no tengan un tratamiento adecuado y por lo tanto lleguen a los cuerpos de agua donde habitan individuos sanos (Galindo *et al.*, 2014).

Para indagar más en la dinámica de *Bd* en nuestro país se requiere de estudios que identifiquen poblaciones donde se encuentra el patógeno, las que sean susceptibles y aquellas que aún no han sido infectadas, estos estudios además de ser publicados deberán ser reportados ante la Organización Mundial de la Salud Animal y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria en México (SENASICA) para que se establezcan protocolos que favorezcan la sobrevivencia de las poblaciones.

La importancia de un diagnóstico temprano en las poblaciones tendrá que también estar acompañado de una evaluación del riesgo de que el patógeno este presente en el hábitat y las características demográficas de las especies. La información sobre la abundancia de los posibles hospederos y la prevalencia del patógeno es una parte crítica en el manejo de la enfermedad en escala regional.

OBJETIVO

Identificar la prevalencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en la comunidad de anfibios de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) Rancho “El Salado”, Puebla durante la temporada de lluvias.

MÉTODO

4.1 Área de estudio

La Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) “Rancho El Salado” se encuentra dentro de la comunidad del mismo nombre, en el municipio de Jolalpan en el estado de Puebla, entre las coordenadas 18°20′09″N y 98°57′29″W (Figura 5-7). De acuerdo a su ubicación geográfica es parte de la Sierra Mixteca de las regiones fisiográficas Sierra Madre del Sur y Eje Neovolcánico (García *et al.*, 2009). Se caracteriza por un clima cálido subhúmedo con una temperatura promedio anual de 22° a 28°C y una precipitación anual de 800-1000 mm, siendo de junio a febrero la temporada de mayor precipitación (INEGI, 2009). La vegetación predominante es de selva baja caducifolia, seguida por pastizales y palmar (López *et al.*, 2007).

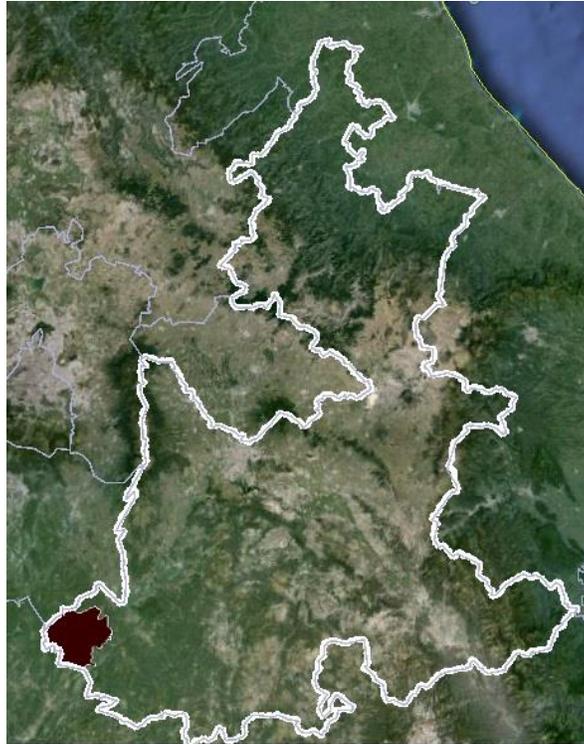


Figura 5. *Ubicación del municipio del Jolalpan en el estado de Puebla.*

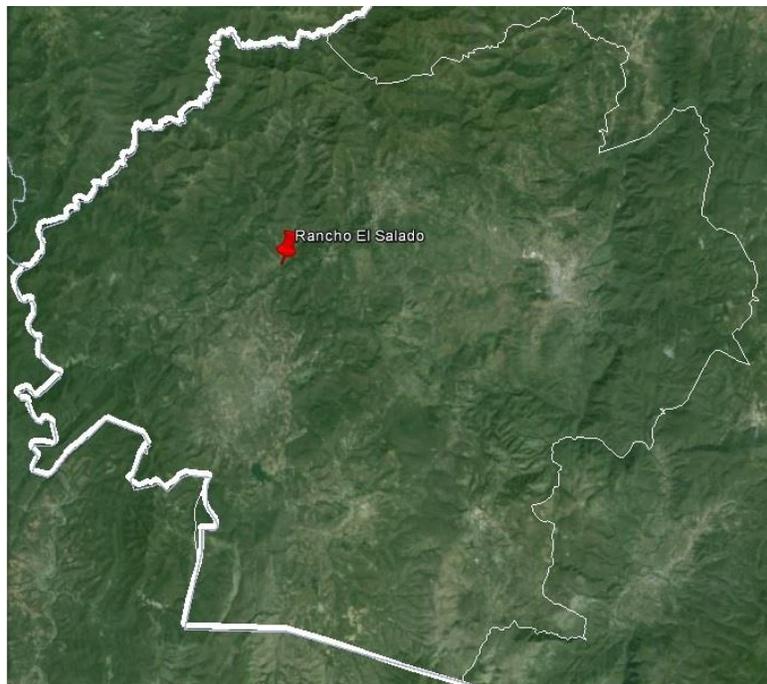


Figura 6. *Ubicación del ejido "Rancho El Salado" en el municipio de Jolalpan, Puebla.*



Figura 7. **Fotografía satelital del ejido “Rancho El Salado” delimitándose la zona urbana, Jolalpan, Puebla.** Tomado de Google earth (2015)

La comunidad de “Rancho El Salado” registró a la UMA ante la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) en el 2001, con el objetivo de llevar a cabo actividades relacionadas con el aprovechamiento extensivo de venado cola blanca. La UMA “Rancho El Salado” posee un área de 3125 hectáreas, del cual el 45% fue destinado para la conservación de las especies nativas, 45% como zonas de amortiguamiento y 10% para las actividades económicas como la agricultura, ganadería y horticultura (López *et al.*, 2006). Debido a su ubicación y grado de conservación se han realizado trabajos sobre diversidad y abundancia de coleópteros (Sánchez *et al.*, 2012), evaluaciones generales de la diversidad de invertebrados y vertebrados (López *et al.*, 2006) y monitoreo poblacional de venado cola blanca con relación a las actividades humanas (López *et al.*, 2007).

Con respecto a la diversidad de anfibios, en estudios previos se evaluaron la riqueza y abundancia durante la temporada de lluvias del 2010 al 2012, registrándose un total de ocho especies, cinco de ellas endémicas de México. Entre las especies más abundantes esta *Hyla arenicolor*, siendo la que presentó la mayor abundancia (45% de los registros), mientras que *Craugastor augusti* sólo tuvo un registro durante el periodo de muestreo (Tabla 5) (Ortiz y Carmona, 2013). Las especies registradas en la UMA corresponden al 21.62% de los anfibios de la Sierra Madre del Sur de

Puebla (García *et al.*, 2009), al 30% de las especies del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Canseco y Gutiérrez, 2010) y al 43.75% de las especies de la Sierra Mixteca de Puebla (García *et al.*, 2006).

Tabla 5. **Especies de anfibios registradas en la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) “Rancho El Salado”**

ANURA

Bufonidae	<i>Incilius occidentalis</i>	Sapo pinero
Craugastoridae	<i>Craugastor augusti</i>	Rana ladradora amarilla
Eleutherodactylidae	<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	Rana fisgona deslumbrante
Hylidae	<i>Agalychnis dacnicolor</i>	Rana verduzca
	<i>Hyla arenicolor</i>	Ranita de cañón
	<i>Smilisca baudinii</i>	Rana trepadora
Ranidae	<i>Lithobates spectabilis</i>	Rana vistosa
	<i>Lithobates zweifeli</i>	Rana de Zweifel

Tomado de: Ortiz y Carmona (2013)

4.2 Muestreo

Se realizaron recorridos diurnos y nocturnos durante tres días en los meses de agosto, septiembre, octubre y noviembre del 2013, y en enero del 2014 desde de las 7:00 am hasta las 12:00 am para registrar avistamientos y capturas de vertebrados terrestres, entre ellos los anfibios, tomando un descanso cada día de 2:00 pm a 3:30 pm. Durante el lapso de búsqueda de vertebrados se encontraron individuos de anfibios a los cuales se les capturó y tomaron los datos de sitio de captura, especie, coordenadas, altitud, hora de captura, vegetación, microhábitat y medidas morfométricas (largo boca-cloaca y largo de la tibia). En la identificación taxonómica de los individuos se utilizó como guía el libro “Anfibios y Reptiles del Valle de Tehuacán-Cuicatlán” (Canseco y Gutiérrez, 2010). Los ejemplares que no fueron identificados en campo se recolectaron para ser depositados en la Colección Nacional de Anfibios y Reptiles del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Posteriormente, se muestrearon los individuos para los diferentes métodos de diagnóstico de *Bd*. Para los estudios convencionales de aislamiento e histopatología se inmovilizaron a la altura de la cintura pélvica utilizando guantes de latex a los primeros cinco individuos encontrados de cada especie. Al inmovilizarlos se procedió a tomar una biopsia de uno de los dígitos de los miembros posteriores, a cada biopsia se le hizo una incisión longitudinal para obtener dos fragmentos de cada dígito. Un fragmento del dígito fue fijado al inyectarle formalina al 10% y colocado en una

capsula que posteriormente fue sumergida en un frasco con formalina al 10%, este método se ha empleado previamente para el estudio histopatológico de *Bd* (Berger *et al.*, 2000). El segundo fragmento se colocó en un tubo falcon con 10 ml de medio líquido de triptona 1% con antibióticos y antimicóticos (Anexo 2) y se almacenó a 4°C para el método de aislamiento.

Para el estudio molecular, a los mismo cinco individuos se les tomó un frotis de los miembros posteriores y vientre realizando un ligero raspado 30 veces sobre la piel con un hisopo de rayón estéril, el cual fue colocado en un tubo eppendorf estéril y se almacenó a 4°C. A continuación se le tomaron muestras a por lo menos otros cinco individuos de cada especie, para complementar 10 muestras por especie. En la Tabla 6 se resumen los medios de conservación, tipos de muestras y condiciones de conservación de las muestras dependiendo del estudio.

Finalmente, las muestras se transportaron a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las muestras para la prueba de PCR y el aislamiento se depositaron en el Laboratorio de Micología del Departamento de Microbiología e Inmunología, y las muestras para el examen histopatológico se remitieron al Departamento de Patología.

Tabla 6. ***Formas de conservación de las muestras para la detección de Batrachochytrium dendrobatidis***

TIPO DE MUESTRA	MEDIO DE CONSERVACIÓN	CONDICIONES DE CONSERVACIÓN	Estudio
Dígito	Triptona 1% con antibiótico	Contenedor: Tubo falcon 25ml Temperatura: 4°C Particularidades: Procesamiento inmediato	Aislamiento y caracterización
Dígito	Formalina 10%	Contenedor: Frasco hermético Temperatura: Ambiente Particularidades: El medio de conservación es toxico.	Histopatología
Hisopo	Ninguno	Contenedor: Tubo tipo <i>eppendorf</i> Temperatura: 4°C	PCR-EP

4.3 Riqueza específica y abundancia observada en la comunidad de anfibios

Los datos registrados de los individuos fueron utilizados para describir la estructura de la comunidad de anfibios y su relación con la prevalencia de *Batrachochytrium dendrobatidis*. Se calculó la riqueza específica, abundancia observada e índice de diversidad de Shannon ($H' = -\sum p_i \ln p_i$; donde p_i es la abundancia relativa de la especie i) (Hill, 1973).

El índice de Shannon mide el grado de incertidumbre que se tiene al seleccionar aleatoriamente a un individuo y que pertenezca a cierta especie, basándose en el número de especies y la abundancia de los individuos de cada especie (Pla, 2006). El resultado refleja la heterogeneidad de la comunidad, cuando $H' = 0$ es por una baja heterogeneidad como resultado de una baja riqueza o una baja distribución equitativa y H' es máximo (intervalo de 3 a 4) cuando todas las especies tienen una alta distribución equitativa de la abundancia para cada evento de muestreo (Daniel, 1998).

Los resultados se compararon con datos de monitoreos previos (Ortiz y Carmona, 2013) y se evaluó el esfuerzo de muestreo con una curva de especies observadas contra una de especies calculadas por el índice de Chao 2 utilizando el programa EstimateS ver. 8.0.0 (Colwell, 2006) que considera el número de avistamientos de las especies en uno o más periodos de muestreo.

4.4 Aislamiento y caracterización micológica

El aislamiento y caracterización de *Batrachochytrium dendrobatidis* estuvo basado en el protocolo propuesto por Longcore (1999), con el objetivo de evitar el crecimiento y contaminación de otros agentes que influyeran en el crecimiento de *Bd* se procesaron al regresar de cada muestreo. A cada uno de los cortes de dígito se le retiró la piel y se seccionó en fragmentos de 3mm que se observaron al microscopio óptico a 10x en la búsqueda de estructuras micóticas. A continuación para eliminar posibles crecimientos contaminantes se limpiaron los fragmentos por la técnica de estriado en un medio mTGH (Anexo 2), en donde el tejido se toma con un asa bacteriológica y se frota por el medio de cultivo en forma estriada. Después se les colocó en otro medio mTGH con la técnica de punto aislado, conteniendo en cada caja los tejidos de un mismo individuo (Figura 8).

Cada caja de cultivo se le selló con parafilm y se incubó a una temperatura de 23°C, colocando las cajas de forma invertida para evitar contaminación. Se revisaron los cultivos diariamente, al detectarse algún crecimiento fúngico se tomaron muestras y se tiñeron con azul de algodón, se observaron en el microscopio óptico a 10X y 40X, luego se identificaron a nivel de género

utilizando la guía ilustrada de Barnett y Hunter (1972). Las cajas que no tuvieron crecimiento posterior a un mes se desecharon.

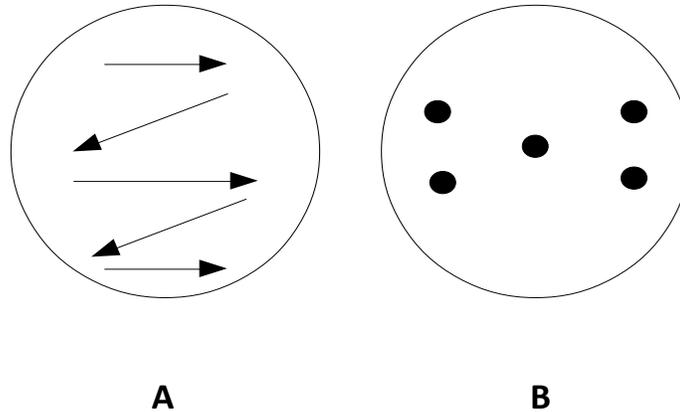


Figura 8. **Técnicas de inoculación para el aislamiento y cultivo de *Batrachochytrium dendrobatidis*** A) Técnica por estriado; B) Técnica por punto aislado

4.5 Histopatología

En el examen histopatológico, las capsulas que almacenaban las biopsias tomadas y fijadas con formalina al 10% fueron colocadas en los contenedores del histokinette para ser deshidratadas con alcohol etílico a concentraciones de 70%, 90%, 96% y 100% y xilol. Posteriormente, se incluyeron en parafina caliente y al solidificarse se cortaron con micrótopo para obtener tejidos de 3mm, se desparafinaron y las laminillas se tiñeron con la tinción de rutina de Hematoxilina-Eosina (Anexo 3). Las lamillas se observaron al microscopio óptico a 40x buscando lesiones sugerentes a *Bd*. En caso de detectar estructuras compatibles con *Bd* se empleó la tinción especial de Gomori-Grocott (Anexo 3). Los dos protocolos de tinción empleados han sido reportados con anterioridad para determinar la presencia del quitridio en la piel y lesiones asociadas (Berger *et al.*, 2000; Padgett y Hopkinks II, 2009).

Las lesiones observadas fueron fotografiadas con un fotomicroscopio (Leica microsystems) así como una laminilla correspondiente a cada especie que no presentara lesiones para ser consideradas controles negativos.

4.6 Diagnóstico molecular

Para el diagnóstico molecular se decidió realizar una prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa Punto Final (PCR-EP) en el Laboratorio de Micología de la FMVZ, UNAM; por lo que fue necesario la obtención de un control positivo, la extracción de material genético de frotis realizados en campo a los individuos capturados y la amplificación por la técnica antes mencionada.

4.6.1 Obtención de control positivo

De la cepa en medio TGH_L, JEL 423 se transfirieron tres colonias a tres tubos falcon de 50 ml con 25ml medio triptona 1% y se incubaron a 20°C por 15 días (Anexo 2). Al observar crecimiento micótico se tomó una muestra de 100µl y por la técnica de gota suspendida, se observó al microscopio para corroborar estructuras específicas de *Bd*. A su vez se tiñeron otras muestras con azul de algodón-fenol y mediante la tinción de Gram se verificó que fuera un cultivo puro sin presencia de otros microorganismos contaminantes (Anexo 4). La cepa JEL 423 fue proporcionada por la doctora Joyce Longcore, quien aisló a *Bd* de la especie de rana *Phyllomedusa lemur* de El Cope, Panamá (Schloegel *et al.*, 2012).

Cuando se obtuvo un cultivo líquido puro se tomaron 1000 µl del medio con zoosporas en un tubo eppendorf de 1.5 ml se centrifugó a 14000 r.p.m por 5 minutos con el objetivo de que las zoosporas formaran un botón en el fondo del tubo eppendorf y se retiró el sobrenadante. Con el botón formado se realizó la extracción de ADN utilizando el producto de lisis Prepman Ultra (Applied Biosystems), el cual se emplea en la prueba de PCR en tiempo real (PCR-RT); el método utilizado fue el indicado por el fabricante del juego de reactivos (Anexo 5) y el propuesto por Boyle *et al.*, (2004) adaptado para el uso del vortex en lugar del equipo BeadBeater. Del producto de la extracción se tomó una muestra de 5µl y se visualizó en un gel de agarosa al 1% adicionado con bromuro de etidio con las condiciones de electroforesis de 80v 40mA por 40 minutos, y 1µl para la cuantificación de ADN en un biofotómetro (Eppendorf D-5000-3000), utilizando una dilución del ADN 1:100 en agua grado inyectable, la lectura se llevó a cabo a una absorbancia de 260/280 nm.

De 2ul de extracción de ADN se amplificó el fragmento ITS1 – ITS2 mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa Punto Final (PCR-EP) con los iniciadores específicos para *Bd* diseñados por Annis *et al.*, (2004) para productos de extracción de ADN a partir de una lisis con el método estándar de bromuro de hexadeciltrimetilamonio adicionado con RNAsa. Las concentraciones finales de los reactivos son para una reacción en 25 µl donde 2 µl son producto de la extracción de

ADN. Los reactivos fueron parte del juego de reactivos comercial INVITROGEN, a excepción de los primers, los cuales se sintetizaron por la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biología, UNAM (Tabla 7).

Tabla 7. **Reactivos y concentraciones de PCR-EP para la detección de *Batrachochytrium dendrobatidis***

Nombre	Abreviatura	Concentración final
Cloruro de Magnesio	MgCl ₂	0.9 Mm
Taq Buffer	Taq	1X
Deoxynucleotidos	dNTP 's (dATP, dCTP, dTTP y dGTP)	0.2 mM cada uno ()
Taq Polimerasa	Taq	0.8 u
Iniciadores o primers	Bd1a (5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3') Bd2a (5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3')	1MM

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Techne TC-412 (Barloworld Scientific), con *heated lid* de 105°C. La desnaturalización inicial fue de 93°C durante 10 minutos, posteriormente fueron treinta ciclos en una segunda de desnaturalización de 93°C por 45 segundos repitiéndose 30 veces, una alineación a 60°C por 45 segundos y una etapa de extensión a 72°C por 2 minutos. Para finalizar se programó una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR se conservaron a 4°C hasta su visualización en gel de agarosa 1%, con las condiciones de 45V y 45mA por 60 minutos, teniendo como referencia un marcador de peso molecular de 1kb y un control negativo de agua inyectable.

4.6.2 Muestras de la comunidad

Se agregó a cada tubo eppendorf 50 ml de solución Prepman Ultra más 40 mg de perlas de zirconia. Al igual que en el control positivo se utilizó el protocolo de extracción para *Bd* de Boyle *et al.*, (2004), sustituyéndose el uso del equipo BeadBeater por vortex.

De los productos de extracción se seleccionó el 10% de las muestras para verificar que el método fuera correcto por medio la cuantificación de ADN en un biofotómetro (Eppendorf D-5000-3000), utilizando una dilución del ADN 1:100 en agua grado inyectable, la lectura se llevó a cabo a una absorbancia de 260/280 nm y su visualización en un gel de agarosa 1% adicionado con bromuro de etidio.

Al verificar la extracción de ADN, se realizó la amplificación por PCR-EP bajo el mismo método empleado para el control positivo y se visualizó en el gel de agarosa 1% adicionado con bromuro

de etidio. En los casos de individuos a los que se les identificó alguna lesión durante el examen histopatológico se les realizó adicionalmente una PCR anidada de dos ciclos utilizando los marcadores Bd1a y Bd2a, utilizando 2 µl del primer producto de PCR para ser sometido a un segundo ciclo. Los resultados fueron visualizados en el gel de agarosa 1% adicionado con bromuro de etidio.

RESULTADOS

5.1 Riqueza específica y abundancia observada en la comunidad de anfibios

En la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) “Rancho El Salado” se registraron, a partir de 18 noches de muestreo, 106 individuos clasificados en doce especies pertenecientes a seis familias del orden Anura, siendo la familia Hylidae la mejor representada (Tabla 8; Anexo 6). De las especies registradas con anterioridad, *Craugastor augusti* no fue observada durante los muestreos, mientras que *Rhinella marina*, *Craugastor mexicanus*, *Plectrohyla cyclada*, *Tlalocohyla smithii* e *Hypopachus ustus* fueron nuevos registros en la localidad.

Ocho de las doce especies son endémicas de México y de acuerdo a las categorías de riesgo dos se encuentran clasificadas: *Hypopachus ustus* en la NOM 059-2010 SEMARNAT en la categoría de sujeta a protección especial y *Plectrohyla cyclada* en la lista roja de la IUCN (2016) en la categoría de especie vulnerable.

La mayor riqueza se presentó en septiembre con el registro de ocho de las especies (66.66%), agosto y noviembre fueron los meses donde se obtuvo el menor valor (Figura 9). Con respecto a la abundancia, está fue mayor en el mes de octubre, seguida por septiembre, juntos poseen el 42.45% de los registros de los individuos observados (Figura 10). Las especies más abundantes fueron *Lithobates zweifeli*, *Incilius occidentalis* y *Tlalocohyla smithii*, mientras que de *Craugastor mexicanus* sólo se obtuvo un individuo registrado en el mes de agosto (Figura 11).

La abundancia observada de algunas especies estuvo relacionada con los datos obtenidos de la precipitación y la temperatura (Figura 12). *Tlalocohyla smithii* presentó una mayor abundancia en el mes de septiembre, el cual corresponde al mes con mayor precipitación (Figura 13). *Incilius occidentalis*, *Eleutherodactylus nitidus* y *Plectrohyla cyclada* obtuvieron una mayor abundancia en el primer muestreo del mes de octubre, después del mes con alta precipitación (Figura 14, 15, 16).

Smilisca baudinii y *Agalychnis dacnicolor* tuvieron una mayor abundancia en los meses donde la precipitación era menor y que de acuerdo a la bibliografía corresponden a los meses donde la temporada de lluvia termina en la localidad (Figura 17, 18). Para *Lithobates spectabilis* y *Lithobates zweifeli* se observó una alternancia en los periodos donde se encontraron, *Lithobates spectabilis* se registró en meses con precipitación, mientras que *Lithobates zweifeli* se le registra al inicio de la temporada de lluvias y al final (Figura 19, 20).

De acuerdo al índice de diversidad Shannon, el valor calculado fue $H' = 2.30$, el cuál es el más alto en comparación con los monitoreos previos citados (Figura 25). En la evaluación con Chao 2, se observa que la curva de especies observadas inicia a tener una asíntota a partir de las 13 especies, sin embargo de acuerdo a las especies calculadas la asíntota se ubica por arriba de las 14 especies. De acuerdo a la comparación de las curvas, el muestreo representa el 89.84% de las especies calculadas, por lo cual se considera un adecuado esfuerzo de muestreo (Figura 26).

Para corroborar la identificación taxonómica de algunas especies se colectaron y depositaron en la Colección Nacional de Anfibios y Reptiles (CNAR) del Instituto de Biología-UNAM, un individuo de *Craugastor mexicanus* (CNAR-IBH 27340), un individuo de *Agalychnis dacnicolor* (CNAR-IBH 28004) y tres de *Lithobates spectabilis* (CNAR-IBH 28003, CNAR-IBH28005, CNAR-IBH 28006), a su vez también se observaron individuos no metamorfos de *Lithobates zweifeli* de los cuales se recolectaron tres individuos para su identificación en la CNAR y se procesaron completos para histopatología, estos individuos fueron eutanasiados con una inyección de .2ml de xilacina. La identificación de las especies estuvo bajo la supervisión del personal de la CNAR.

Para el diagnóstico de *Bd* la abundancia observada determinó el número de muestras que fueron procesadas en cada método (Tabla 9). A ninguno de los individuos se le observaron lesiones macroscópicas asociadas con *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Tabla 8. *Especies de anfibios de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) “Rancho El Salado” (2013)*

ANURA		NOM 059	IUCN	Endémica de México
Bufonidae	<i>Incilius occidentalis</i>	-	LC	X
	<i>Rhinella marina</i> *	-	LC	-
Craugastoridae	<i>Craugastor mexicanus</i> *	-	LC	X
Eleutherodactylidae	<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	-	LC	X
Hylidae	<i>Agalychnis dacnicolor</i>	-	LC	X
	<i>Hyla arenicolor</i>	-	LC	-
	<i>Plectrohyla cyclada</i> *	-	VU	X
	<i>Smilisca baudinii</i>	-	LC	-
	<i>Tlalocohyla smithii</i> *		LC	X
Microhylidae	<i>Hypopachus ustus</i> *	Pr	LC	-
Ranidae	<i>Lithobates spectabilis</i>	-	LC	X
	<i>Lithobates zweifeli</i>	-	LC	X

Lista de especies de anfibios registradas durante el monitoreo en temporada de lluvias de agosto 2013 a enero 2014 en la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) “Rancho El Salado”, Jolalpan, Puebla, con su categoría de riesgo de acuerdo a la NOM 059 (Norma Oficial Mexicana NOM 059-SEMARNAT 2010) e IUCN (International Union for Conservation of Nature - Red List). Pr: Protección especial; LC: Preocupación menor (Least concern); VU: Vulnerable. X: Especie endémica para México; * Especies con primer registro en la localidad.

Tabla 9. **Número de muestras tomadas de cada especie para el diagnóstico de *Batrachochytrium dendrobatidis* en la comunidad de anfibios de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) "Rancho El Salado" (2013)**

	Muestras tomadas			Total de individuos
	Aislamiento y cultivo	Histopatología	PCR	
<i>Incilius occidentalis</i>	7	9	12	12
<i>Rhinella marina</i>	5	4	8	8
<i>Craugastor mexicanus</i>	1	1	1	1
<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	7	8	11	12
<i>Agalychnis dacnicolor</i>	5	5	10	10
<i>Hyla arenicolor</i>	8	7	10	10
<i>Plectrohyla cyclada</i>	1	1	3	3
<i>Smilisca baudinii</i>	5	5	6	6
<i>Tlalocohyla smithii</i>	6	6	13	13
<i>Hypopachus ustus</i>	2	2	2	2
<i>Lithobates spectabilis</i>	5	5	10	10
<i>Lithobates zweifeli</i>	5	8	17	19
Total:	57	61	103	106

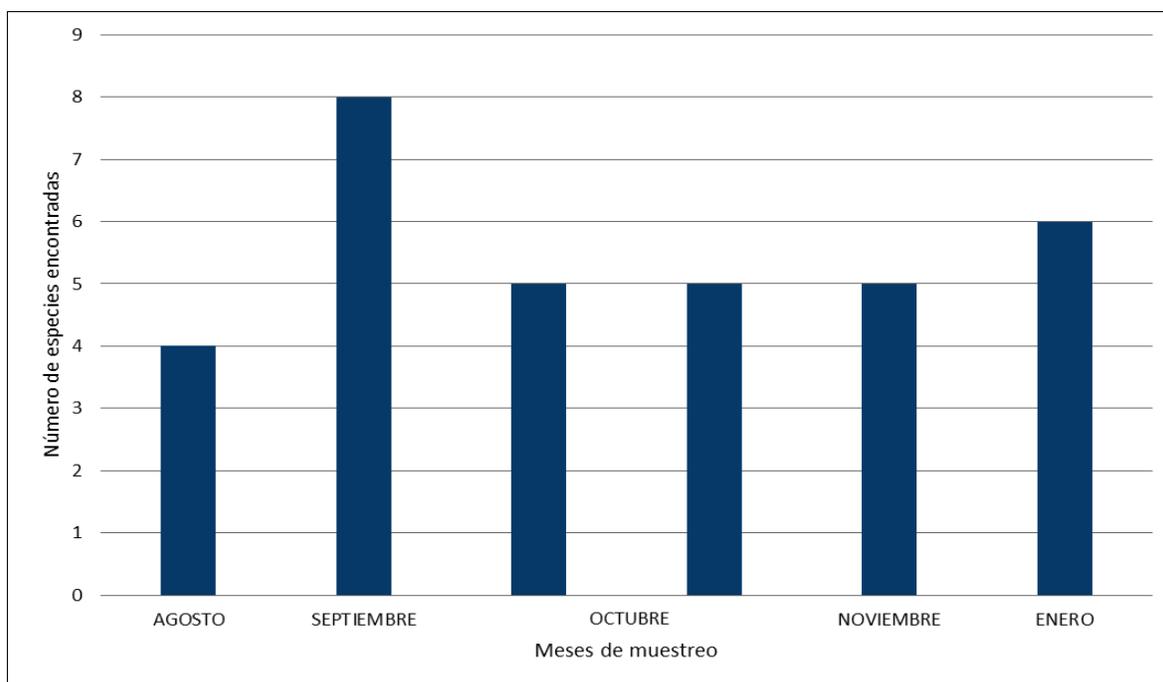


Figura 9. **Riqueza de especies durante el monitoreo en temporada de lluvias de agosto 2013 a enero 2014 en la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) "Rancho El Salado"**. En octubre se realizaron dos muestreos, uno al inicio y el otro a la mitad del mes, en diciembre no se realizó muestreo.

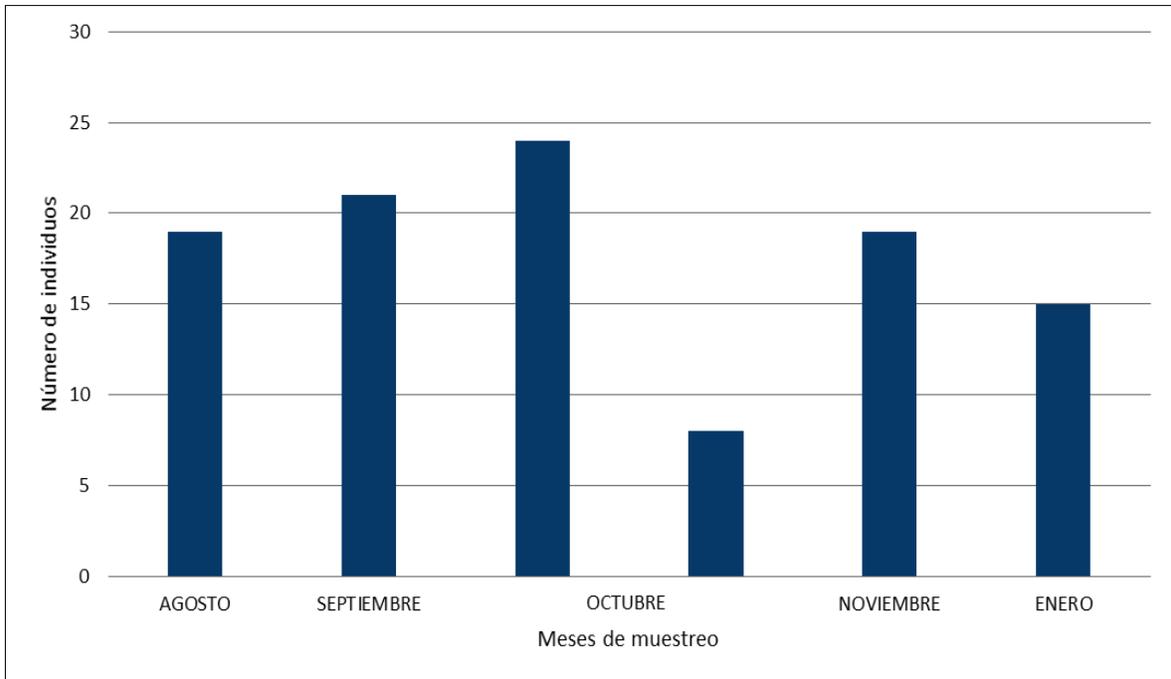


Figura 10. **Abundancia observada de anfibios durante el monitoreo en temporada de lluvias de agosto 2013 a enero 2014 en la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) "Rancho El Salado"**. En octubre se realizaron dos muestreos, uno al inicio y el otro a la mitad del mes, en diciembre no se realizó muestreo.

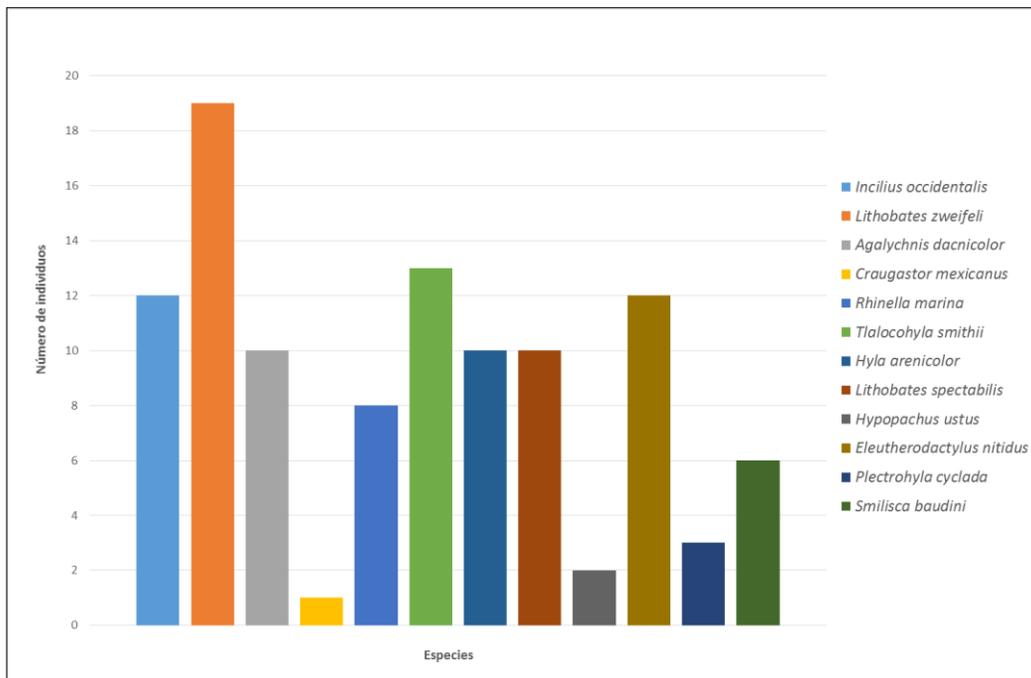


Figura 11. **Abundancia observada de individuos por especie durante el monitoreo en temporada de lluvias de agosto 2013 a enero 2014 en la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) "Rancho El Salado"**. En octubre se realizaron dos muestreos, uno al inicio y el otro a la mitad del mes, en diciembre no se realizó muestreo.

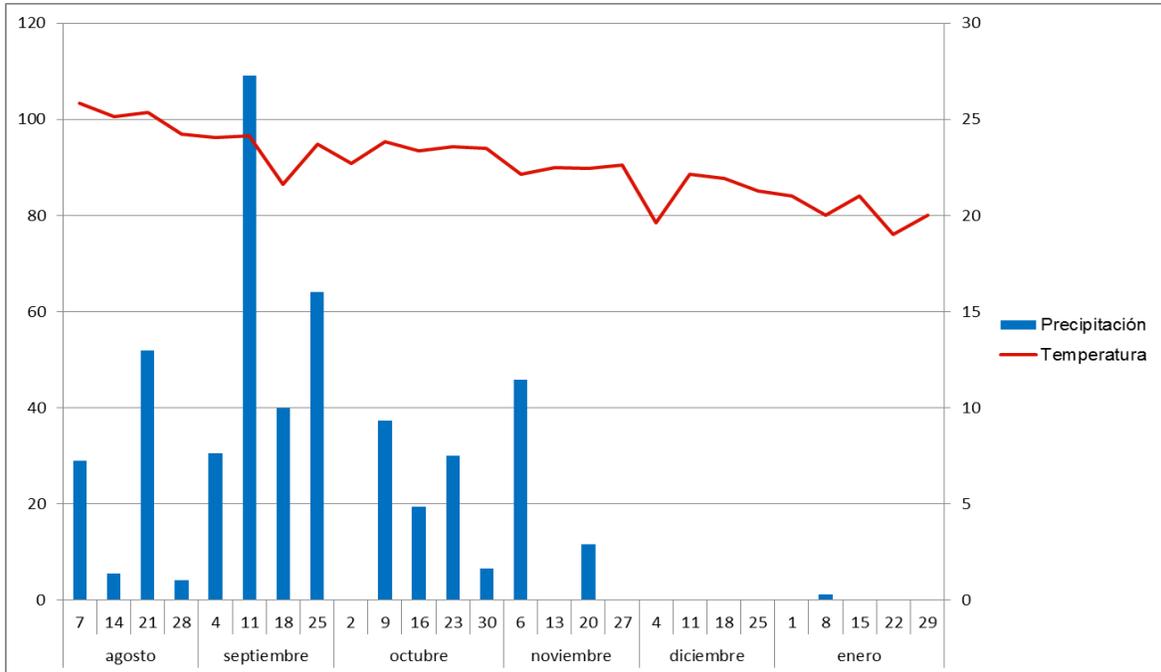


Figura 12. **Climograma de agosto 2013 a enero 2014 de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) “Rancho El Salado”.** Los datos reflejan los promedios de la temperatura y precipitación semanales. Fuente de datos: Estación climatológica “Chila de la Sal”, Puebla a 99.2 km del municipio de Jolalpan, Puebla. Sistema Meteorológico Nacional, turno: 057-SMN-325.

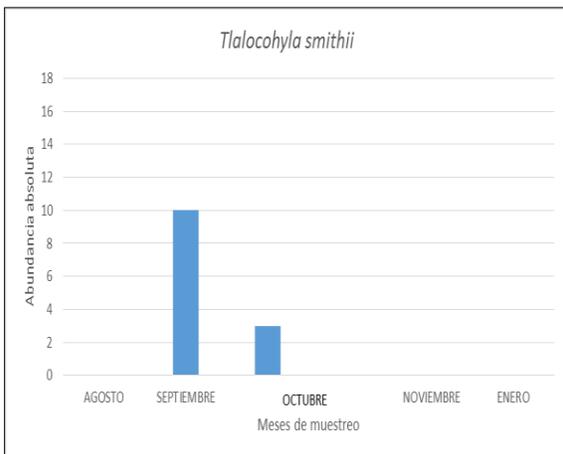


Figura 13. **Abundancia absoluta observada de *Tlalocohyla smithii* durante el muestreo.**

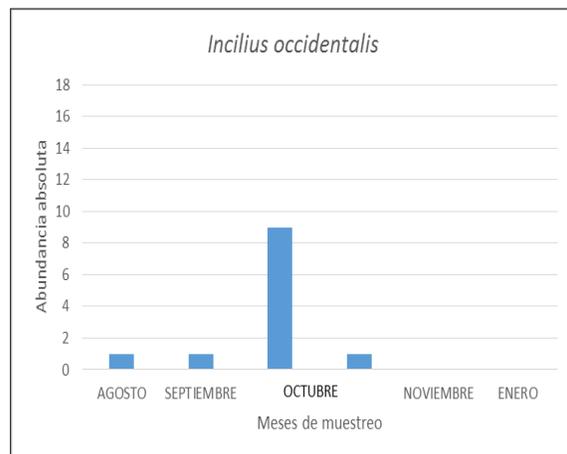


Figura 14. **Abundancia absoluta observada de *Incilius occidentalis* durante el muestreo.**

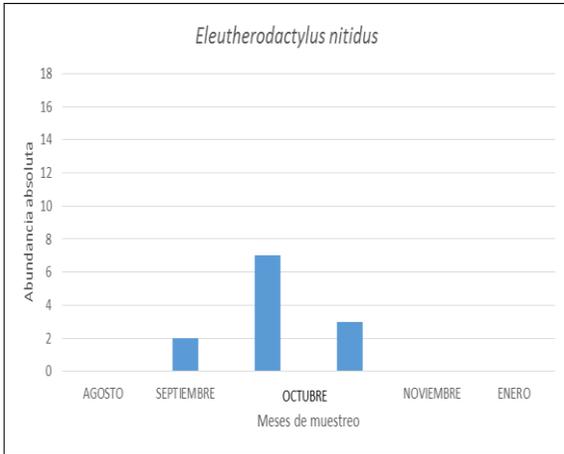


Figura 15. **Abundancia absoluta observada de *Eleutherodactylus nitidus* durante el muestreo.**

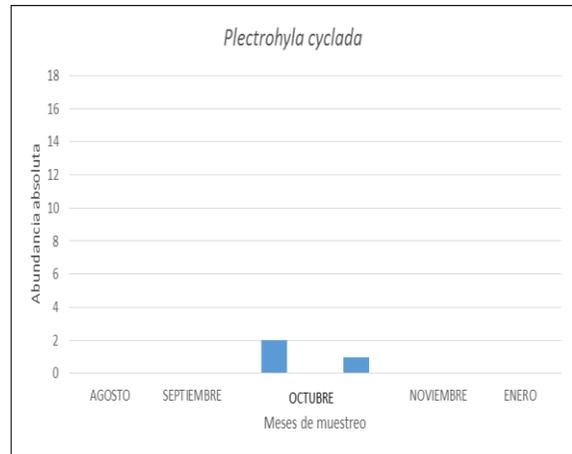


Figura 16. **Abundancia absoluta observada de *Plectrohyla cyclada* durante el muestreo.**

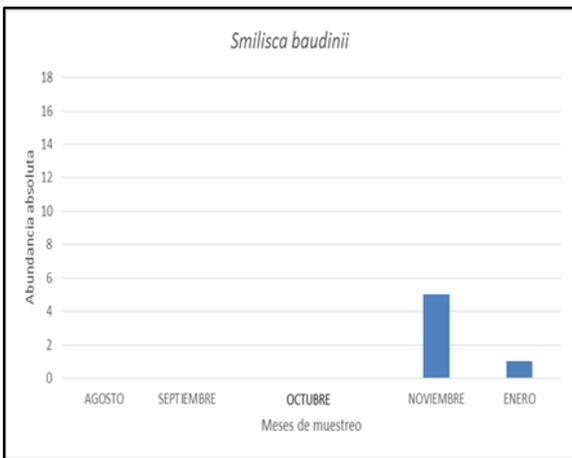


Figura 17. **Abundancia absoluta observada de *Smilisca baudinii* durante el muestreo.**

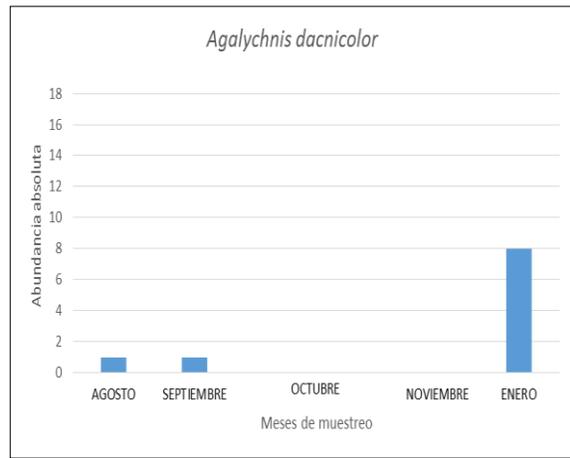


Figura 18. **Abundancia absoluta observada de *Agalychnis dacnicolor* durante el muestreo.**

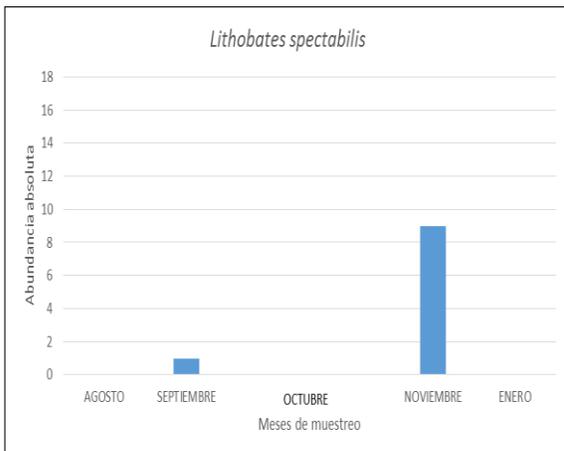


Figura 19. **Abundancia absoluta observada de *Lithobates spectabilis* durante el muestreo.**

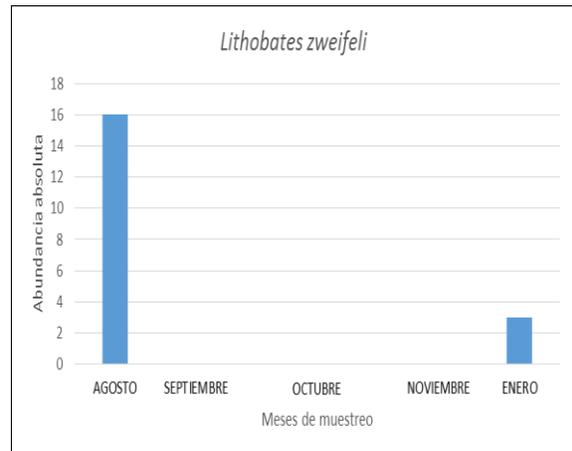


Figura 20. **Abundancia absoluta observada de *Lithobates zweifeli* durante el muestreo.**

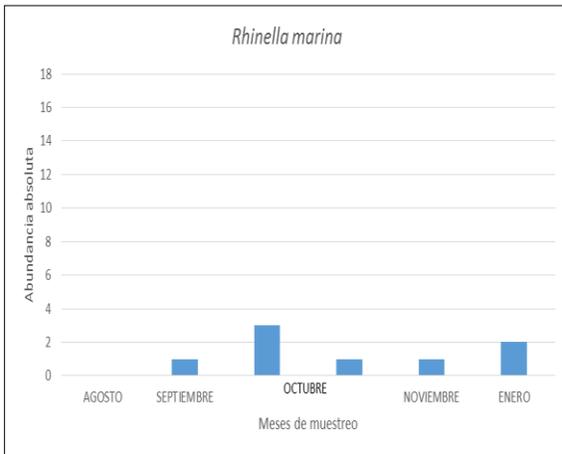


Figura 22. **Abundancia absoluta observada de Rhinella marina durante el muestreo.**

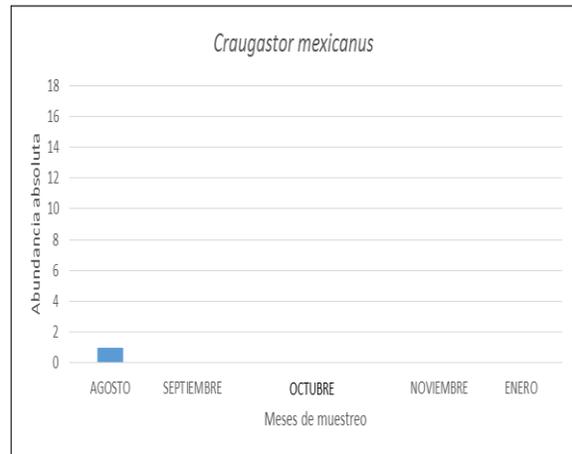


Figura 21. **Abundancia absoluta observada de Craugastor mexicanus durante el muestreo.**

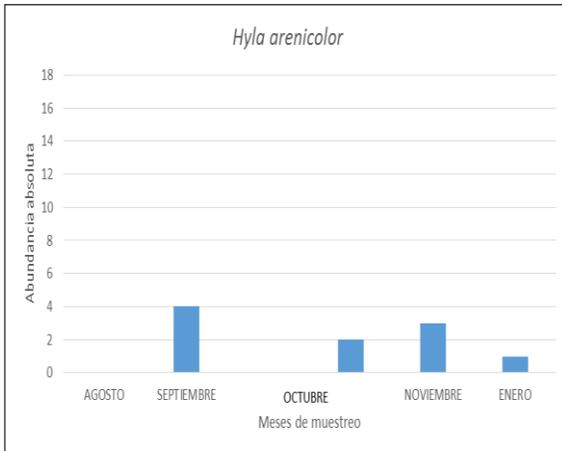


Figura 23. **Abundancia absoluta observada de Hyla arenicolor durante el muestreo.**

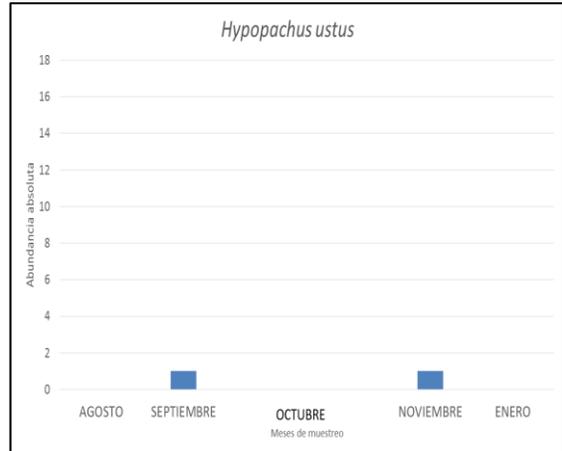


Figura 24. **Abundancia absoluta observada de Hypopachus ustus durante el muestreo.**

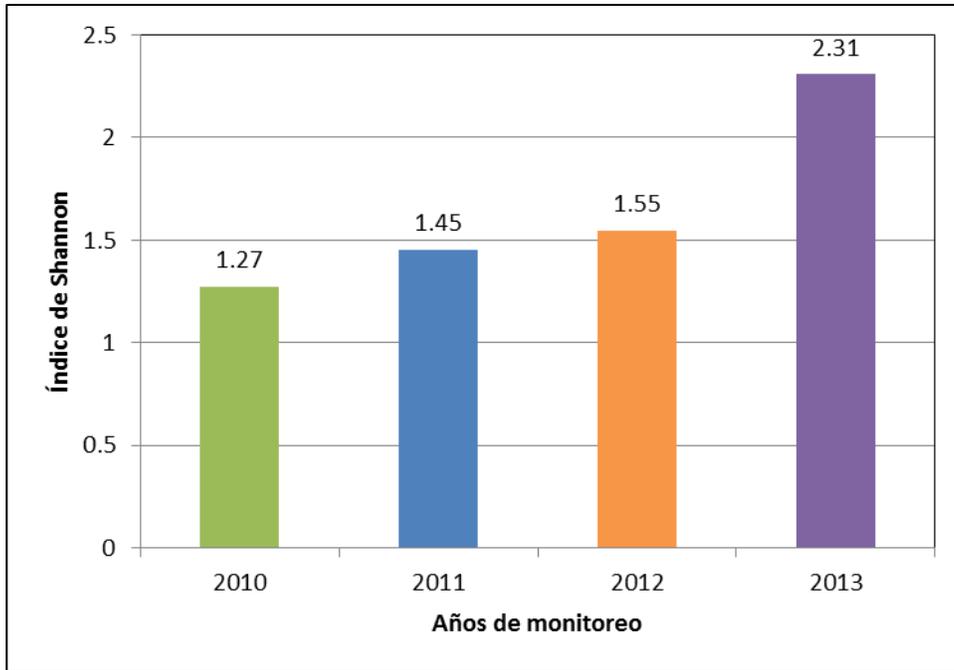


Figura 25. **Índices de Shannon de la comunidad de anfibios de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) "Rancho El Salado" durante la temporada de lluvias en cuatro años de monitoreo.** Se consideran los resultados de Ortiz y Carmona, 2013 quienes reportan los monitoreos del 2010 al 2012.

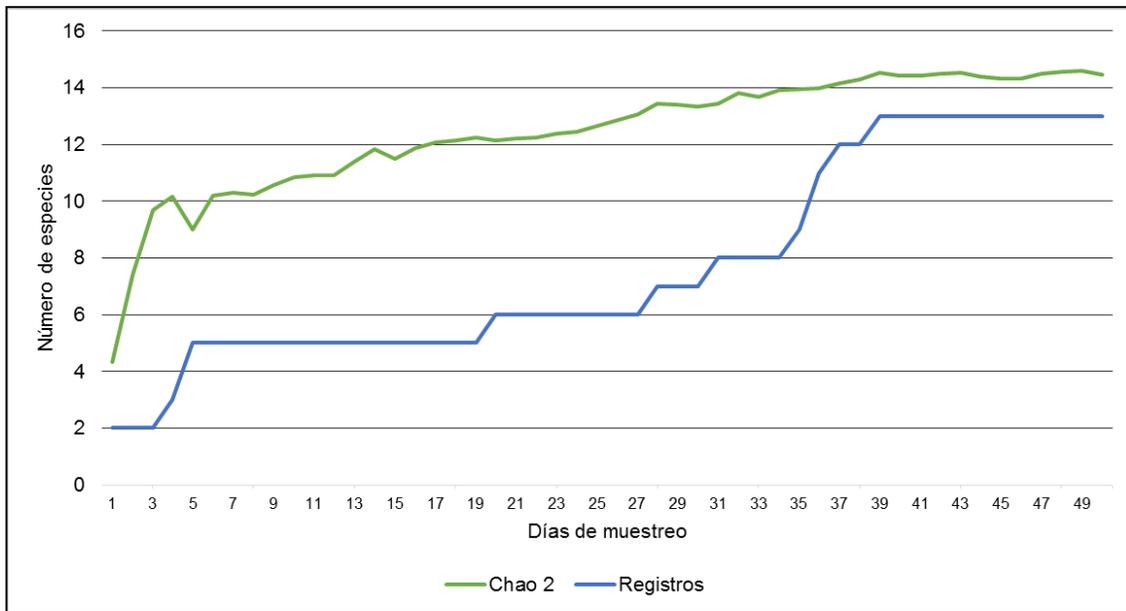


Figura 26. **Curva de acumulación de especies de anfibios en la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre "Rancho El Salado" durante cincuenta días de muestreo en cuatro temporadas de lluvia de agosto 2010 a enero 2014.** Del día número 32 al 50 corresponde al muestreo del presente estudio. Se consideran los resultados de Ortiz y Carmona, 2013 quienes reportan los monitoreos del 2010 al 2012.

5.2 Aislamiento y caracterización micológica

Para el método de aislamiento y cultivo de los 106 individuos se muestrearon 57 individuos debido a que no en todas las especies se obtuvieron 5 individuos mínimo para tomar muestras y de otros existió la oportunidad de observar más individuos que el número mínimo (Tabla 10). Las especies con mayor número de individuos para el aislamiento y cultivo fueron *Hyla arenicolor* (14.03%), *Eleutherodactylus nitidus* (12.28%) e *Incilius occidentalis* (12.28%). De *Craugastor mexicanus* y *Plectrohyla cyclada* sólo se obtuvo un individuo de cada especie.

Los tejidos que se obtuvieron para el aislamiento y cultivo fueron principalmente de dígitos de miembros posteriores, sólo en dos individuos de *Lithobates zweifeli* (3.5%) se tomaron tejidos de dígitos del parche pélvico y piel de un miembro posterior; en dos casos se tomaron tejidos solamente de parche pélvico debido al tamaño pequeño de los individuos de *Craugastor mexicanus* (1.75%) y *Plectrohyla cyclada* (1.75%).

Del total de 68 tejidos en 40 de estos (58.82%) hubo crecimiento de hongos de los géneros *Rhizopus* sp. (Figura 27), *Chrysosporium* sp., *Geothricum* sp., *Microsporium* sp. y *Fusarium* sp. (Figura 28) y en 28 tejidos (41.17%) no se obtuvieron crecimientos durante un mes que permanecieron a 23°C; en ninguno de los casos se obtuvo aislamiento de *Batrachochytrium dendrobatidis*.

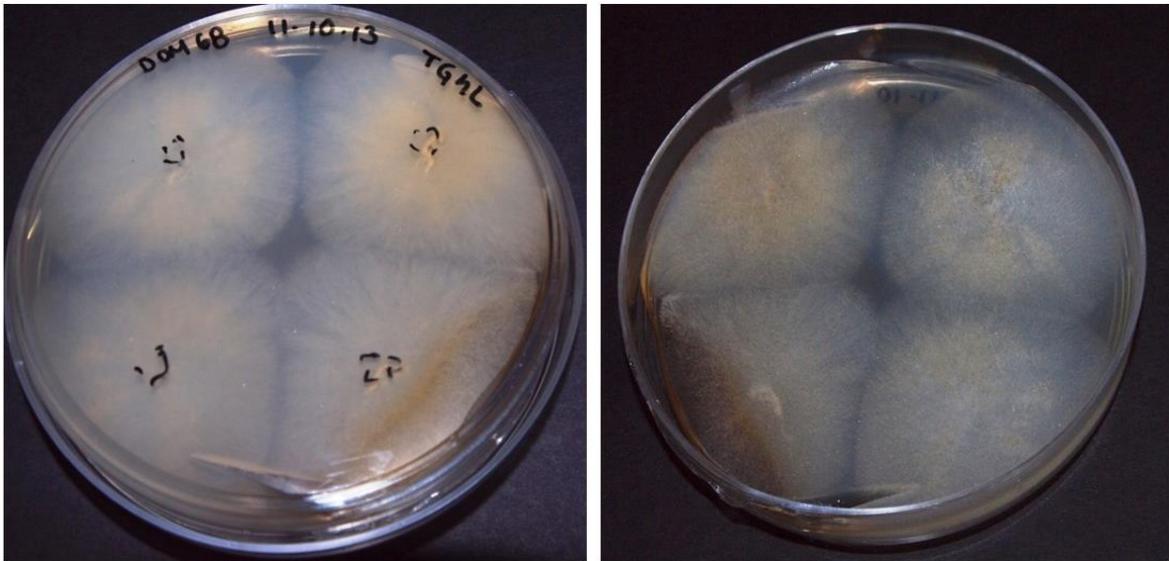
Con respecto al número de individuos muestreados, 29 (50.87%) de los individuos tuvieron crecimiento en los tejidos obtenidos, 11 (19.29%) tuvieron tejidos con y sin crecimiento (Figura 29) y 17 (29.81%) no presentaron ningún crecimiento (Figura 30). Con respecto a las especies, considerando el número de individuos muestreados y los que presentaron crecimiento en sus tejidos, *Lithobates zweifeli* con el 100% (5/5), seguido por *Eleutherodactylus nitidus* con el 85.71% (6/7) e *Hyla arenicolor* con el 62.5% (5/8) fueron las especies con más individuos con crecimiento fúngico.

Las especies que obtuvieron más individuos sin crecimiento en los tejidos fueron *Lithobates spectabilis* y *Smilisca baudinii*, la primera sin crecimiento en el 60% (3/5) de los individuos muestreados y la segunda sin crecimiento en el 40% (2/5). En los casos de los individuos donde solo se obtuvo un individuo para muestreo, todos sus tejidos desarrollaron crecimiento, mientras que para *Plectrohyla cyclada* ninguno de sus tejidos desarrolló crecimiento durante un mes.

Tabla 10. **Muestras tomadas para el diagnóstico de *Batrachochytrium dendrobatidis* por aislamiento y cultivo en la comunidad de anfibios de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) "Rancho El Salado"**

Especie	No. de individuos muestreados para histopatología	No. de individuos que tuvieron tejidos con crecimiento	No. de individuos que se le tomaron tejidos de dígitos	Tejidos de otra zona corporal *
<i>Incilius occidentalis</i>	7	3	7	0
<i>Rhinella marina</i>	5	1	5	0
<i>Craugastor mexicanus</i>	1	1	0	1 ^a
<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	7	6	7	0
<i>Agalychnis dacnicolor</i>	5	2	5	0
<i>Hyla arenicolor</i>	8	5	8	0
<i>Plectrohyla cyclada</i>	1	0	0	1 ^a
<i>Smilisca baudinii</i>	5	2	5	0
<i>Tlalocohyla smithii</i>	6	3	6	0
<i>Hypopachus ustus</i>	2	1	2	0
<i>Lithobates spectabilis</i>	5	2	5	0
<i>Lithobates zweifeli</i>	5	5	5	2 ^a ; 2 ^b

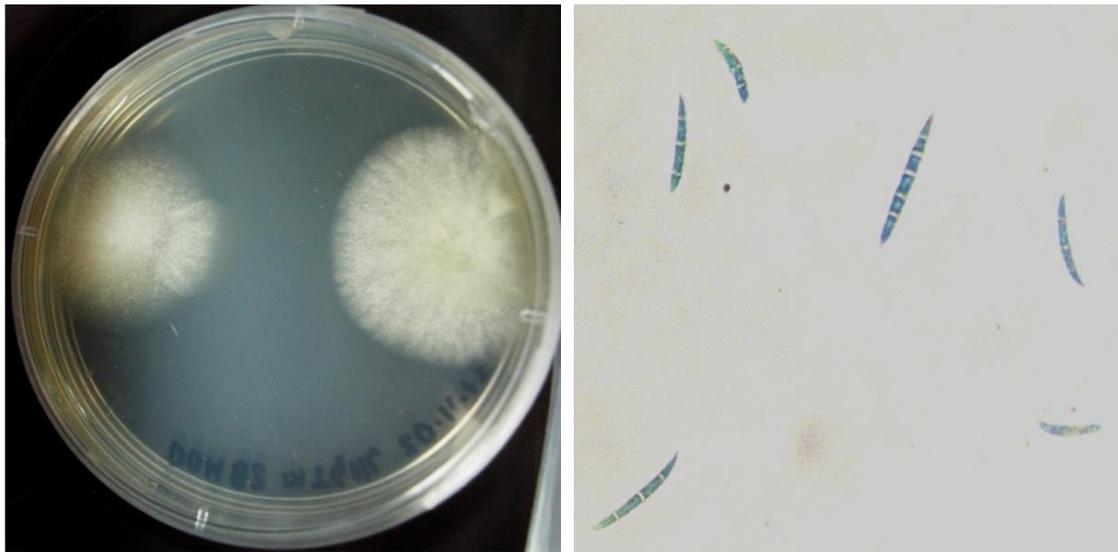
*Los tejidos provenientes de otras zonas corporales corresponden a los mismos individuos de los cuales se obtuvo tejidos en los dígitos; a) tejidos del parche pélvico; b) tejidos de la parte ventral de la pata.



I

II

Figura 27. **Crecimiento de *Rhizopus* sp. en primocultivo de medio mTGhL a 22°C obtenido después de 3 días de las muestras de miembro posterior de *Eleutherodactylus nitidus*.** I) Reverso de caja. II) Anverso de caja



I

II

Figura 28. **Crecimiento de *Fusarium* sp en dígito de miembro posterior de *Smilisca baudinii* después de 5 días.** I) Primocultivo en medio mTGhL a 22°C; II) Macroconidios teñidos con azul-algodón lactofenol.

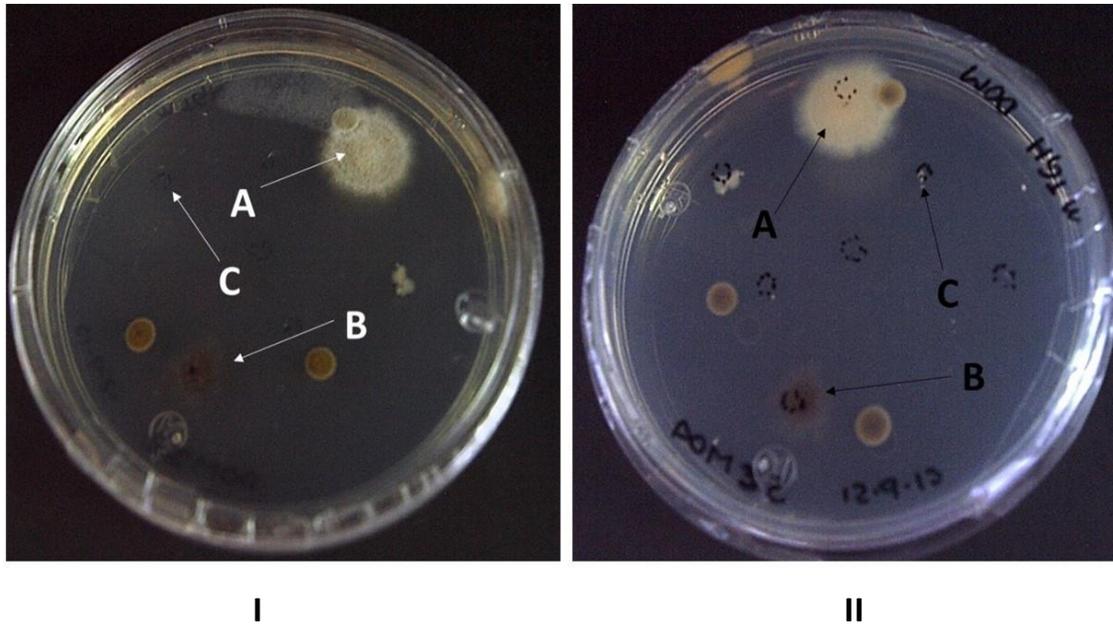


Figura 29. **Primocultivo de la muestra de biopsia de dígito de miembro posterior de *Agalychnis dacnicolor* en medio mTGH a 22°C, después de 4 días en dos de los siete fragmentos del tejido obtenido.** Los crecimientos correspondieron a *Chrysosporium* sp. (A) y *Microsporium* sp. (B), los fragmentos sin crecimiento (C) se transfirieron a un medio nuevo mTGH, al cabo de 30 días no se observó crecimiento. I) Anverso de caja. II) Reverso de caja

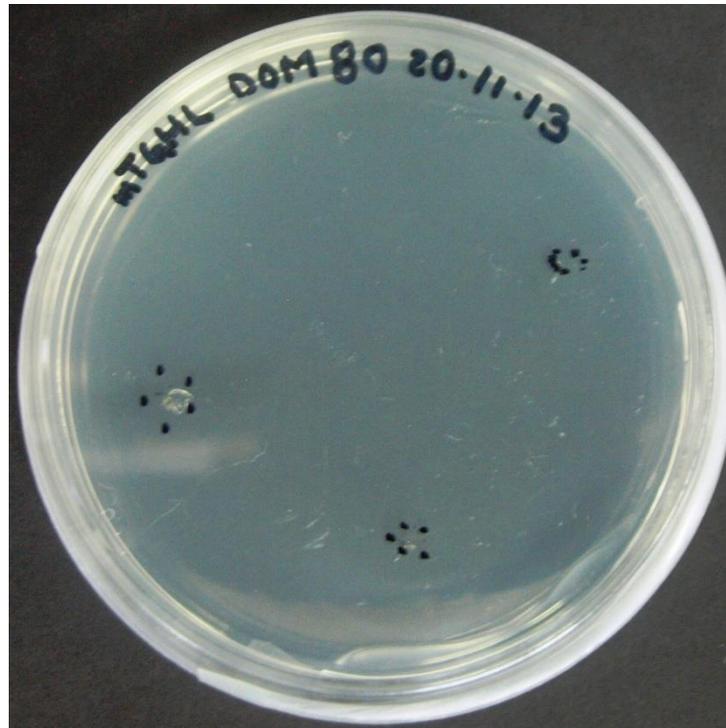


Figura 30. **Primocultivo de tejido de dígito de miembro posterior de *Lithobates spectabilis* en medio mTGH a 22°C sin crecimiento después de 30 días en incubación.**

5.3 Histopatología

Para el método de histopatología de los 106 individuos colectados se muestrearon 61, esto fue porque no de todas las especies se encontraron 5 individuos para tomar las muestras y de otros si se obtuvieron las 5 ranas de cada una de las especies identificadas. Por otro lado, para esta prueba también se procesaron los 8 renacuajos de *Lithobates zweifeli* (Tabla 11). Las especies con mayor número de individuos muestreados fueron *Incilius occidentalis* (14.75%), *Lithobates zweifeli* (13.11%) y *Eleutherodactylus nitidus* (13.11%); *Craugastor mexicanus* y *Plectrohyla cyclada* sólo tuvieron un individuo cada uno.

Tabla 11. **Muestras tomadas para el diagnóstico de *Batrachochytrium dendrobatidis* por histopatología en la comunidad de anfibios de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) "Rancho El Salado"**

Espece	No. de individuos muestreados
<i>Incilius occidentalis</i>	9
<i>Rhinella marina</i>	4
<i>Craugastor mexicanus</i>	1
<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	8
<i>Agalychnis dacnicolor</i>	5
<i>Hyla arenicolor</i>	7
<i>Plectrohyla cyclada</i>	1
<i>Smilisca baudinii</i>	5
<i>Tlalocohyla smithii</i>	6
<i>Hypopachus ustus</i>	2
<i>Lithobates spectabilis</i>	5
<i>Lithobates zweifeli</i>	8

Las muestras para histopatología fueron de los dígitos de miembros posteriores, sin embargo en los individuos que fueron recolectados y eutanasiados para la identificación taxonómica se tomaron biopsias de otras regiones corporales, como el parche pélvico y el miembro posterior. (Figura 31).

En el caso de los renacuajos estos fueron sacrificados con .2 ml de xilacina, fijados en formalina al 10% y después fueron cortados longitudinalmente. Por otro lado, a un ejemplar de *Incilius*

occidentalis se le encontró mudando por lo que sólo se tomó la muda como muestra, pero durante su procesamiento se perdió el tejido.

En los tejidos obtenidos se logró observar las características de la piel de anuros post-metamorfos; en 8 individuos (13.11 %) de los 61 pertenecientes al estudio histopatológico presentaron lesiones no relacionadas con el agente patógeno. En un individuo (1.63 %) se observó una estructura sugerente a *Batrachochytrium dendrobatidis* (Tabla 12. Lesiones **presentes en los anfibios de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) "Rancho El Salado"**

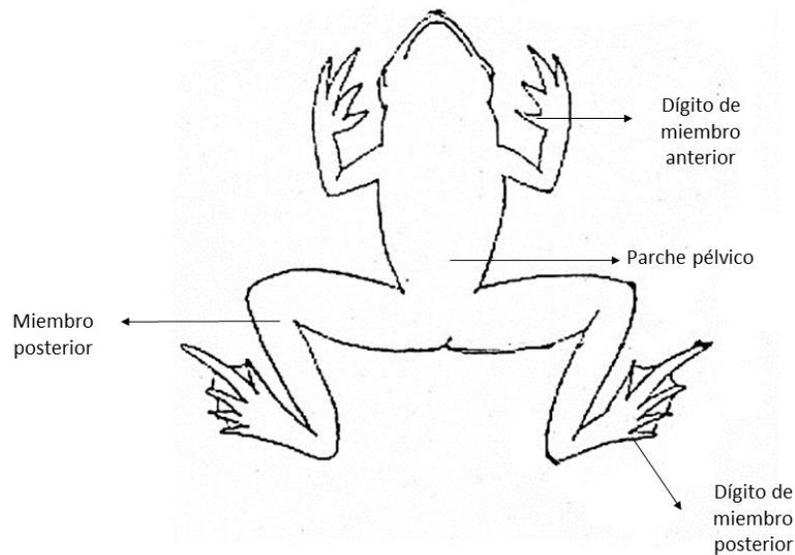


Figura 31. **Regiones corporales de donde se obtuvieron tejidos para el diagnóstico histopatológico de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anuros.**

Tabla 12. **Lesiones presentes en los anfibios de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) "Rancho El Salado"**

Lesión	Especies	Número de individuos por especie con la lesión
Pseudoinclusiones	<i>Tlalocohyla smithii</i>	2
	<i>Agalychnis dacnicolor</i>	1
Necrosis	<i>Lithobates spectabilis</i> *	2
Degeneración de queratinocitos	<i>Lithobates zweifeli</i>	1
Reacción inflamatoria	<i>Incilius occidentalis</i>	1
Degeneración balonoide	<i>Hyla arenicolor</i>	1
Hiperqueratosis	<i>Rhinella marina</i>	1

En total nueve individuos mostraron lesiones en la epidermis y dermis, de acuerdo al examen histopatológico. La frecuencia de las lesiones es mayor en individuos arborícolas y terrestres, un individuo semiacuático (*) se considera como un caso sugerente a *Batrachochytrium dendrobatidis*.

En los individuos sin lesiones, considerados como controles negativos, la piel se conformó por dos capas: epidermis y dermis. En la epidermis se lograron identificar los estratos: *stratum germinativum*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* y *stratum corneum*, constituidos por queratinocitos con diferentes estados de maduración. En la dermis se encontraron numerosas fibras de colágeno, glándulas productoras de moco multicelulares con más de cinco unidades secretoras y melanóforos (Figura 32).

Los estratos epidérmicos y la organización de las glándulas en la dermis superficial presentaron particularidades de acuerdo al hábitat de cada individuo. Las glándulas de mucosa son más numerosas en especies arborícolas (Figura 33) y terrestres (Figura 34), pero el número de capas celulares del *stratum spinosum* y *stratum granulosum* es menor al compararlas con las especies semiacuáticas (*Lithobates spectabilis* y *Lithobates zweifeli*), quienes presentaron una menor cantidad de glándulas y un mayor número de capas de queratinocitos en cada uno de los estratos de la epidermis (Figura 35).

Las características generales y particulares de la piel de los diferentes individuos se tomaron en cuenta para determinar las lesiones que se observaron en algunos. En total seis tipos de lesiones fueron encontrados, siendo las pseudoinclusiones y necrosis las más frecuentes (Tabla 12).

Las pseudoinclusiones se identificaron como cuerpos esféricos eosinófilicos ubicados en el citoplasma de algunos queratinocitos del *stratum granulosum* y *stratum spinosum* con un tamaño menor a 10µm, no se les relacionó con agentes patógenos ni respuesta inflamatoria por parte de los individuos muestreados, los individuos de *Tlalocohyla smithii* que tuvieron estas lesiones fueron recolectados consecutivamente (Figura 36).

La segunda lesión presente fue la necrosis observada a nivel de la dermis superficial de dos individuos post-metamorfos de *Lithobates spectabilis*. Las células dérmicas poseían alteraciones en la conformación de sus citoplasmas y núcleos. Los núcleos mostraban picnosis, sugerente con un agente bacteriano (Figura 37, 38)

El individuo de *Lithobates spectabilis* (Caso IP14-044) que presenta estructuras sugerentes a *Bd* fue capturado en un arroyo estacional en el periodo de muestreo de noviembre, durante su revisión no se observaron lesiones macroscópicas ni alteración en su conducta que fuera indicativo a quitridiomycosis. En el análisis histopatológico del dígito de miembro posterior presentó necrosis de las fibras de colágena con picnosis en el núcleo, células hipertrofiadas y delimitación intercelular poco definida entre las membranas citoplasmáticas. En los citoplasmas de los queratinocitos de la epidermis se observaron estructuras compatibles con los zoosporangios del quitridio,

restringiéndose al *stratum corneum* sin hiperqueratosis, pero con desprendimiento de queratinocitos (Figura 39).

La estructura compatible con el zoosporangio se comparó con el banco de imágenes para el diagnóstico de *Batrachochytrium dendrobatidis* de la James Cook University en Australia (Berger *et al.*, 1999), utilizando las características de la pared celular, afinidad tintorial y contenido. La estructura observada, de acuerdo con el banco de imágenes, se asemejaba al zoosporangio en el estado terminal del ciclo de vida del quitridio, caracterizado por la liberación de las zoosporas hacia los queratinocitos. La característica que se observó en la estructura que sugiere *Bd* fue la presencia de un septo que divide a la estructura, siendo notorio al emplear la tinción de Gomori-Grocott. La imagen de referencia corresponde a un individuo de la especie *Mixophyes fasciolatus* (Berger *et al.*, 1999) (Figura 40).

Para el diagnóstico histopatológico de los renacuajos de *Lithobates zweifeli* se revisaron los denticulos del aparato bucal, que es una región altamente queratinizada, pero no se identificaron estructuras sugerentes con *Bd* (Figura 41, 42).

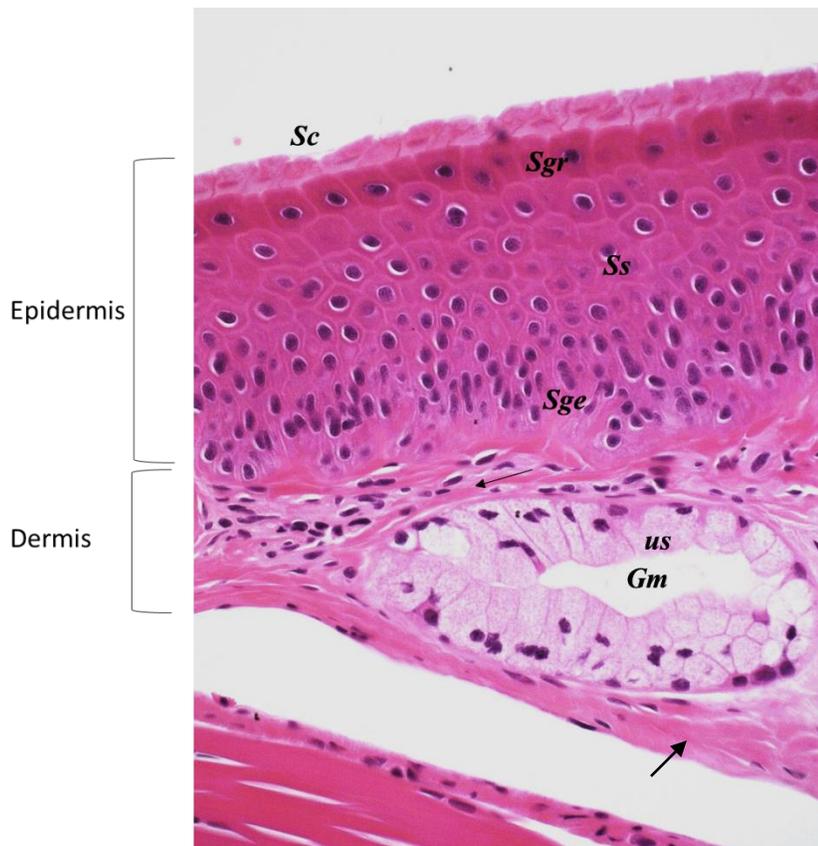


Figura 32. **Fotomicrografía de un corte transversal de dígito de miembro posterior de *Hypopachus ustus* con tinción de rutina Hematoxilina-Eosina 40X, sin lesiones.**

La epidermis (E) está constituida por queratinocitos en diferentes estados de maduración, se logra identificar el *stratum germinativum* (Sge) con una serie de queratinocitos organizados en una capa celular; el siguiente estrato, el *stratum spinosum* (Ss), se conforma de dos a cuatro capas celulares de queratinocitos con forma poliédrica sin organización entre sí; el tercer estrato, el *stratum granulosum* (Sgr) posee queratinocitos aplanados con numerosos gránulos de queratohialina y núcleos con apoptosis; por último, el *stratum corneum* (Sc) fue el estrato más superficial observado se caracteriza por una capa de corneocitos aplanados con degradación total del núcleo. En la dermis se observa las *glándulas productoras de moco* (Gm) con más de una unidad secretora (us), tejido de sostén de colágeno (→) y en la parte inferior musculo esquelético.

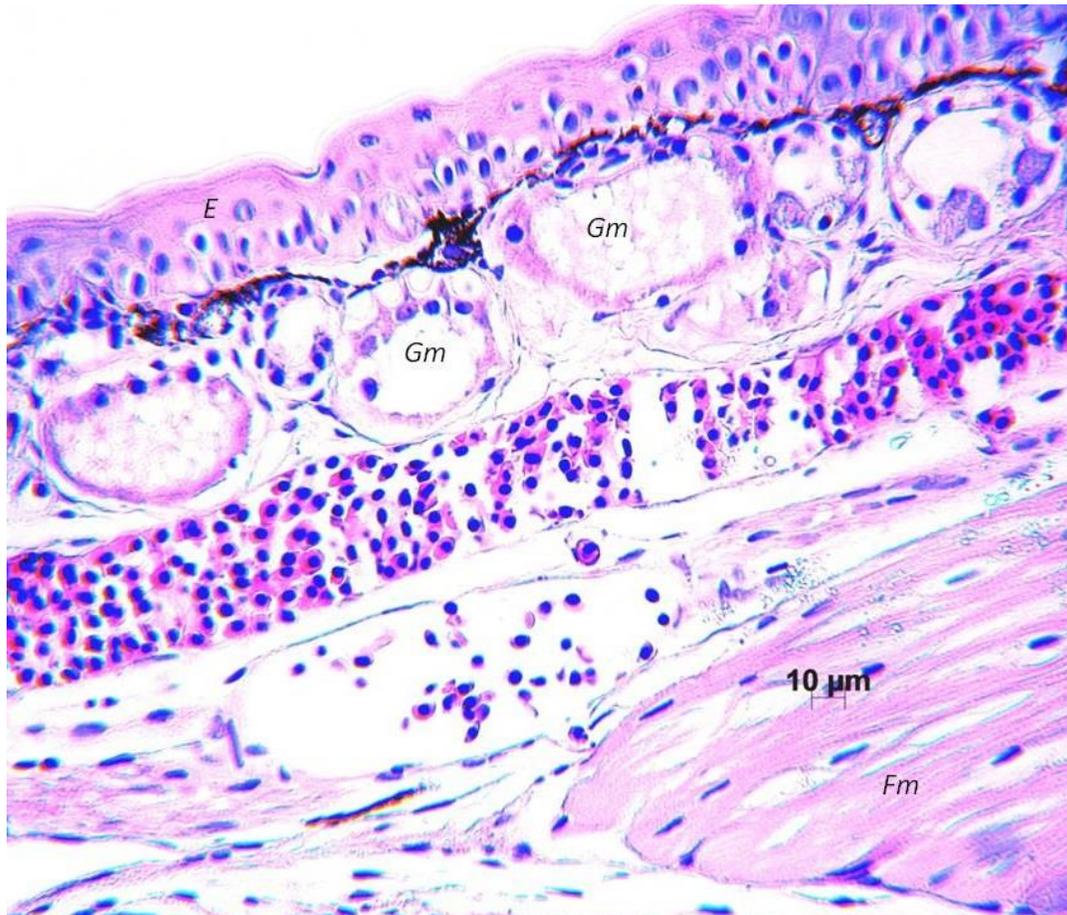


Figura 33. **Fotomicrografía de un corte transversal de dígito de miembro posterior de *Plectrohyla cyclada*, especie arborícola, con tinción de rutina Hematoxilina-Eosina 40X, sin lesiones.** Se observa numerosas glándulas productoras de moco (Gm) en la dermis y estratos epidérmicos con un menor número de capas celulares (E); Fibras musculares (Fm).

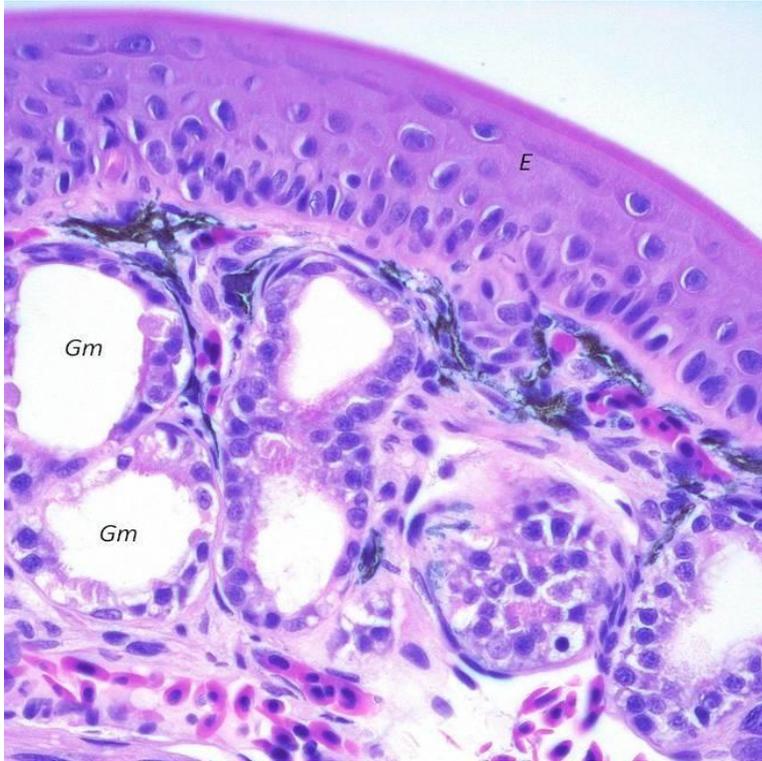


Figura 34. **Fotomicrografía de un corte transversal de dígito de miembro posterior de *Eleutherodactylus nitidus*, especie terrestre, con tinción de rutina Hematoxilina-Eosina 40X, sin lesiones.** Se observa numerosas glándulas productoras de moco (Gm) en la dermis, organizados en dos capas, y estratos epidérmicos con un menor número de capas celulares (E).

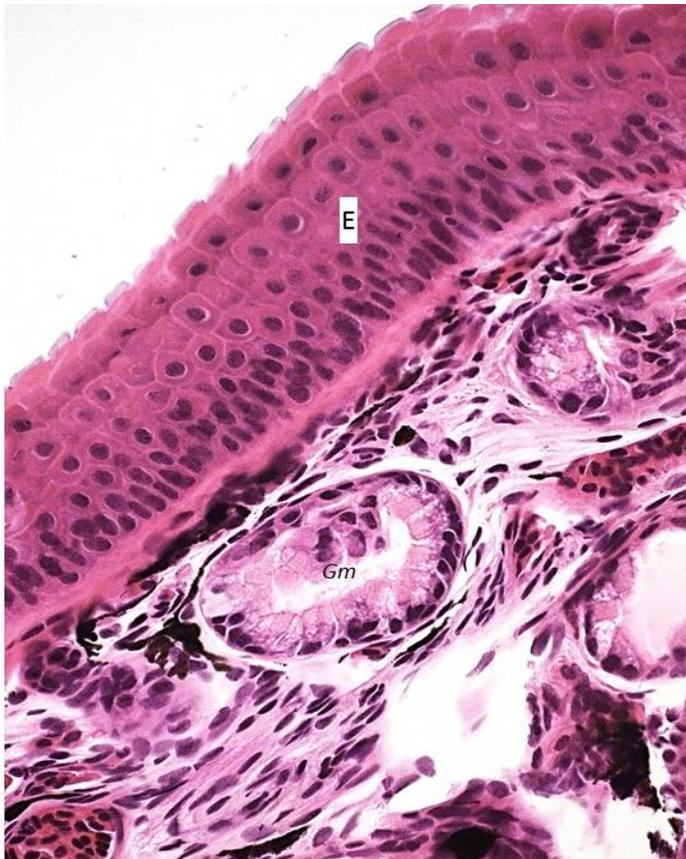


Figura 35. **Fotomicrografía de corte transversal de dígito de miembro posterior de *Lithobates spectabilis*, especie semiacuática con tinción de rutina Hematoxilina-Eosina 40X, sin lesiones.** En la dermis hay un menor número de glándulas productoras de moco (Gm). En la epidermis (E) las capas celulares de los estratos son más numerosos, se observa células picnoicas en el estrato corneo.



Figura 36. **Corte transversal de dígito de miembro posterior de *Tlalocohyla smithii*, especie arborícola, con tinción de rutina Hematoxilina-Eosina 40X, con lesiones.** En el *stratum spinosum* de la epidermis (E) se observan una serie de pseudoinclusiones (→), con un tamaño menor a 10μm. Se identifica un desprendimiento de corneocitos en el *stratum corneum* y necrosis en las queratinocitos de la epidermis.

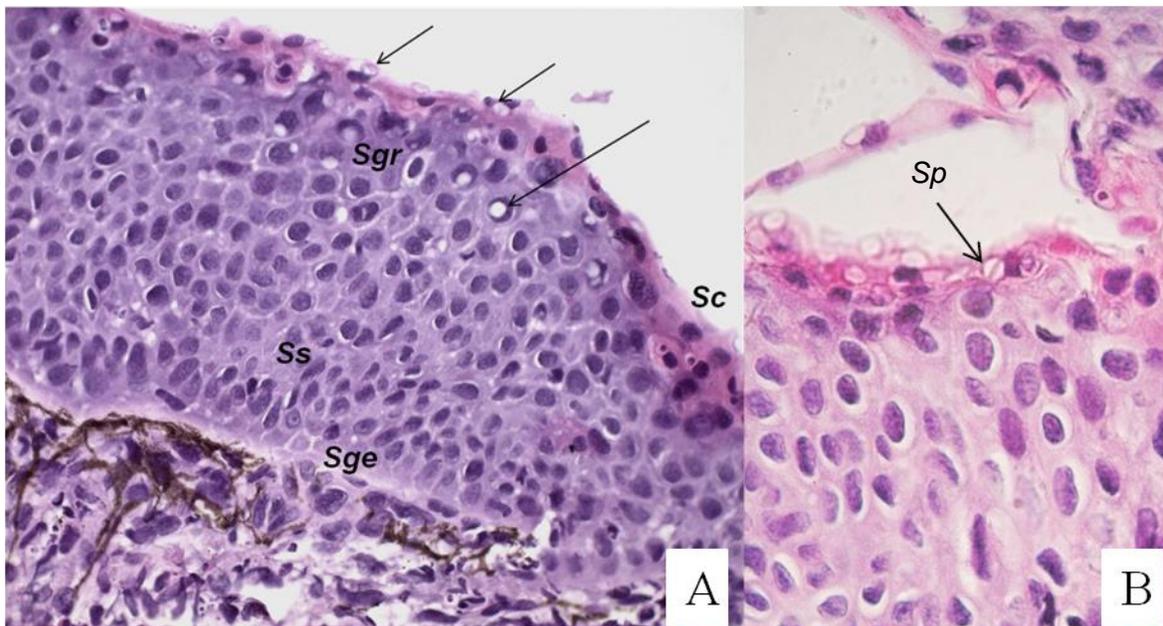


Figura 37. **Fotomicrografías de un corte transversal de dígito de miembro posterior de *Lithobates spectabilis* (Caso IP14-044) especie semiacuática con lesiones, teñido con la tinción de rutina Hematoxilina-Eosina.** En el *stratum corneum* y *stratum granulosum* de la epidermis (E) hay estructuras esféricas de 4 a 7 mm en el citoplasma y núcleos de los queratinocitos (→), se logra observar en algunas un septo (Sp) como una pared que las divide por la mitad. A) 40X B) 100X.

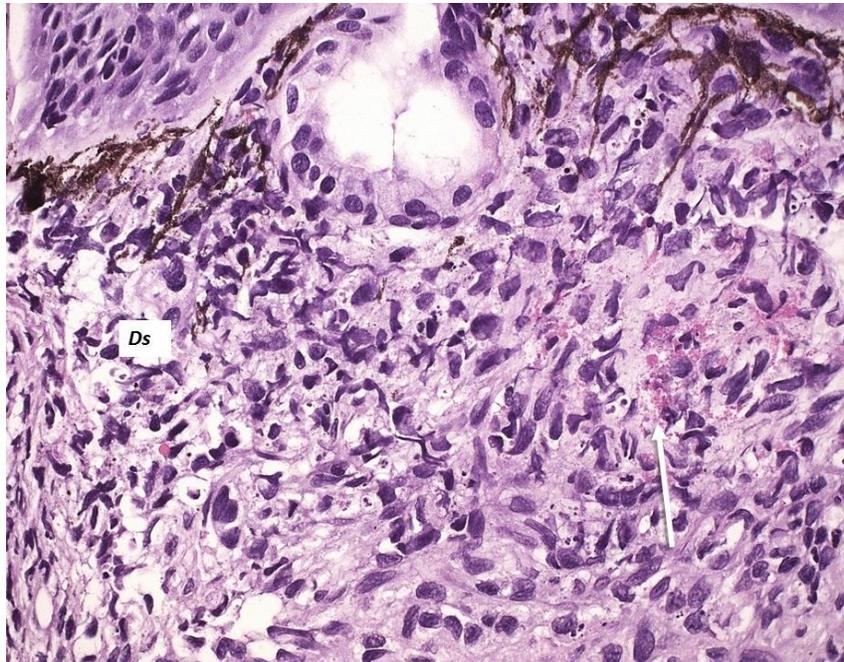


Figura 38. **Fotomicrografía de corte transversal de dígito de miembro posterior de *Lithobates spectabilis* (Caso IP14-044), especie semiacuática, con tinción de rutina Hematoxilina-Eosina 40X, con lesiones.** En la dermis (Ds) se aprecia necrosis extensa y numerosos heterofilos (→).

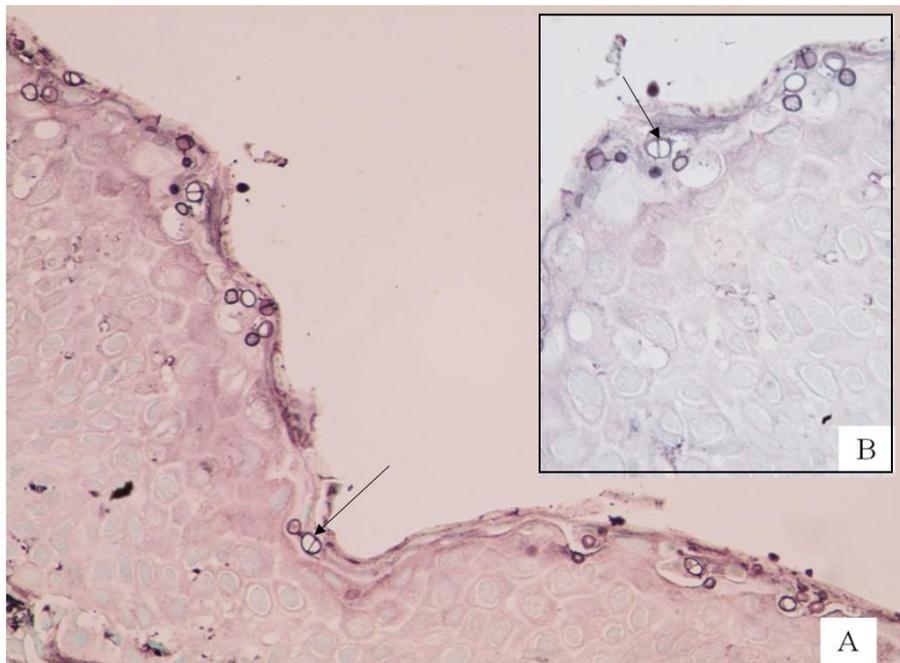


Figura 39. **Fotomicrografía de corte transversal de dígito de miembro posterior de *Lithobates spectabilis* (Caso IP14-044), especie semiacuática, con tinción especial Gomori-Grocott, con lesiones.** En el *stratum corneum* se observan hongos esféricos semejantes a zoosporangios inmaduros de *Batrachochytrium dendrobatidis*, la presencia de septo en el zoosporangio (→) es una característica distintiva. A) 40X B) 100X

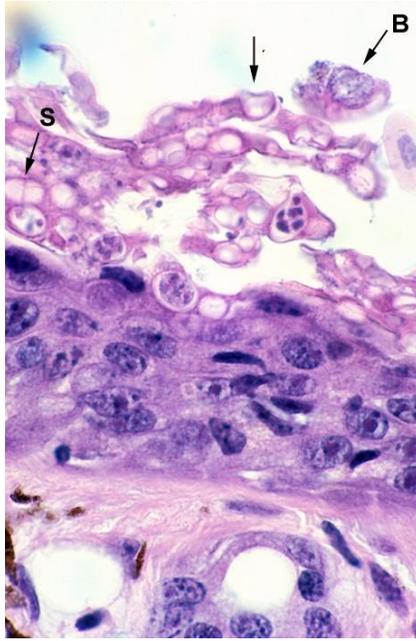


Figura 40. **Fotomicrografía de corte de dígito de *Mixophyes fasciolatus*, especie australiana terrestre, positiva a Bd con presencia de un esporangio colapsado (→) y la presencia de bacterias cocoides (B).** Tomado de: Berger *et al.*, (2000).

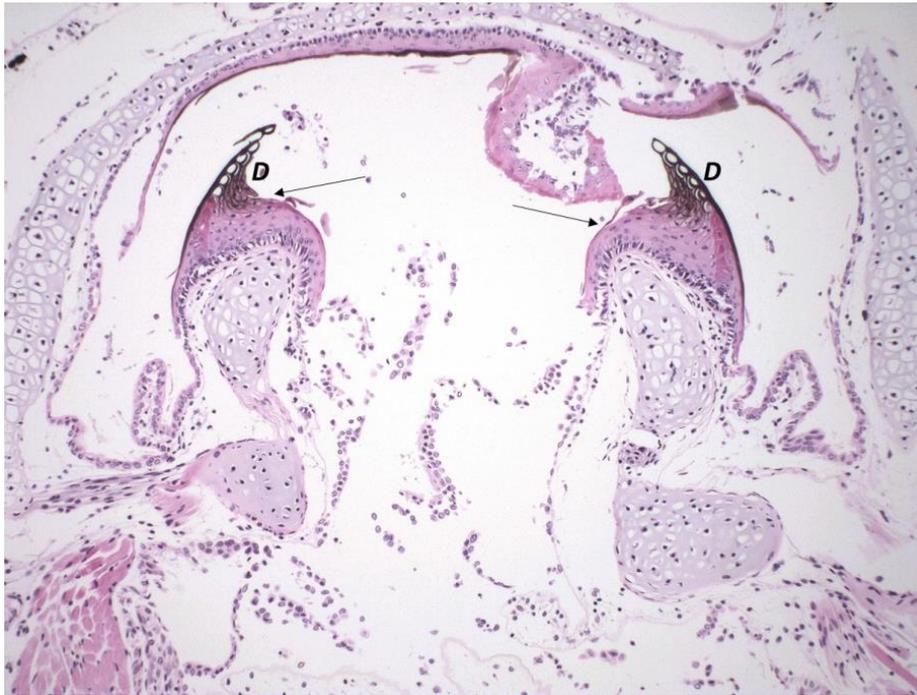


Figura 41. **Microfotografía de corte longitudinal de denticulos de renacuajos de *Lithobates zweifeli*, especie semiacuática, con tinción de rutina Hematoxilina-Eosina10X, sin lesiones.** Se observan los denticulos (D) sin alteraciones en la región queratinizada (→).

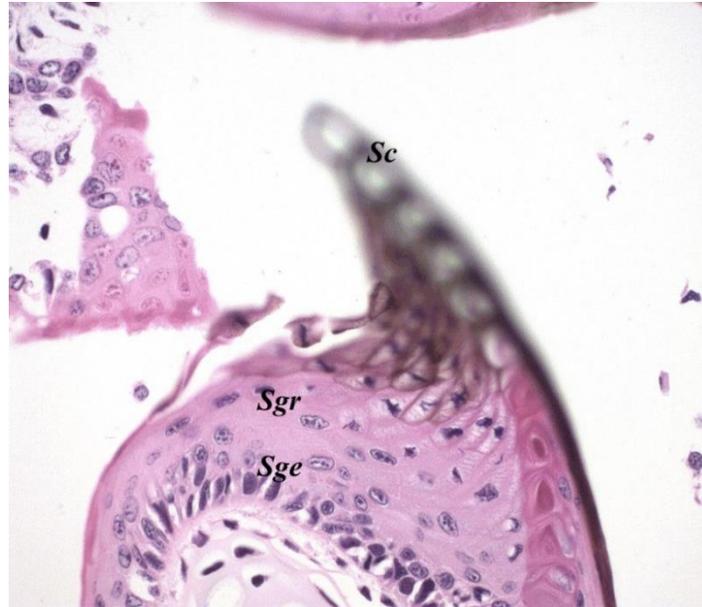


Figura 42. **Fotomicrografía de corte longitudinal de aparato bucal de renacuajos de *Lithobates zweifeli*, especie semiacuática, con tinción de rutina Hematoxilina-Eosina 40X, sin lesiones.** Se observan los estratos queratinizados del dentículo sin alteraciones. El estrato más basal corresponde a un *stratum germinativum* con células alargadas de forma apical, posteriormente un estrato con células con formas poliédricas y presencia de granulos de queratohialina, el *stratum granulosum*, y de forma más externa corneocitos en el *stratum corneum*.

5. 4 Diagnóstico molecular

5.4.1 Obtención de control positivo

De las tres colonias del medio solido JEL423 transferidas a tubos falcon de 50 ml con 25µl de medio de triptona al 1% se obtuvo un crecimiento en uno de los tres tubos (33.33%), corroborando con la tinción de azul de algodón fenol que el crecimiento correspondía a *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) (Figura 43). Posteriormente se realizó una tinción de gram y se verificó que el crecimiento fuera puro, sin la presencia de otros microorganismos (Figura 44). Después se realizó el procedimiento de extracción descrito en los métodos, en el cual se obtuvo de 1000 µl de medio líquido 20 µl de ADN, que no fueron observados en la electroforesis. Sin embargo, en la lectura con el biofotómetro en un factor de disolución de 1:10 (1 µl de ADN más 99 µl de Agua Milli-Q) se cuantificó una concentración de 350 ng de ADN.

La muestra se procesó con el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final (PCR-EP) y se amplificó una banda a 300pb que corresponde a un resultado positivo a *Bd* en una electroforesis en el gel de agarosa de 1% con las condiciones de 45V 40mA por 60 minutos bajo el protocolo de Annis (2004). También se observaron bandas inespecíficas, por lo cual se realizó una

modificación a las concentraciones de MgCl₂ y primers, obteniéndose la banda de 300 pb sin bandas inespecíficas a una concentración de 1uM de MgCl₂ y 0.7uM de cada primer (Figura 45). Este resultado corresponde al primer reporte de extracción por el Prepman Ultra sin utilización de BeadBeater, así como obtención de ADN para su uso en el PCR-EP.

Del crecimiento de la primera generación además de obtener el control positivo para la PCR-EP, se realizó la producción de la cepa para tener constantemente ADN de buena calidad de cultivos jóvenes. Se transfirieron 1000 µl de medio líquido con crecimiento a cinco cajas Petri, se dejaron secar en condiciones estériles por una hora y posteriormente fueron incubadas. Después de un mes de estar conservadas a 20°C se observaron crecimientos característicos de *Bd* en las cinco cajas (100%), obteniéndose una segunda generación en medio sólido. Finalmente, para acelerar el crecimiento de los controles positivos se transfirieron dos colonias de la segunda generación a dos tubos falcon de 50 ml con 25 ml de medio líquido H broth con un ph 6.8 (Anexo 2). Las dos colonias se colocaron en medio triptona 1% e incubados a 15°C. En esta última generación no se reportó crecimiento en los medios de triptona al 1% (0/2; 0%), pero si se observó un crecimiento considerable en los medios líquidos de H broth (2/2; 100%) después de un mes.

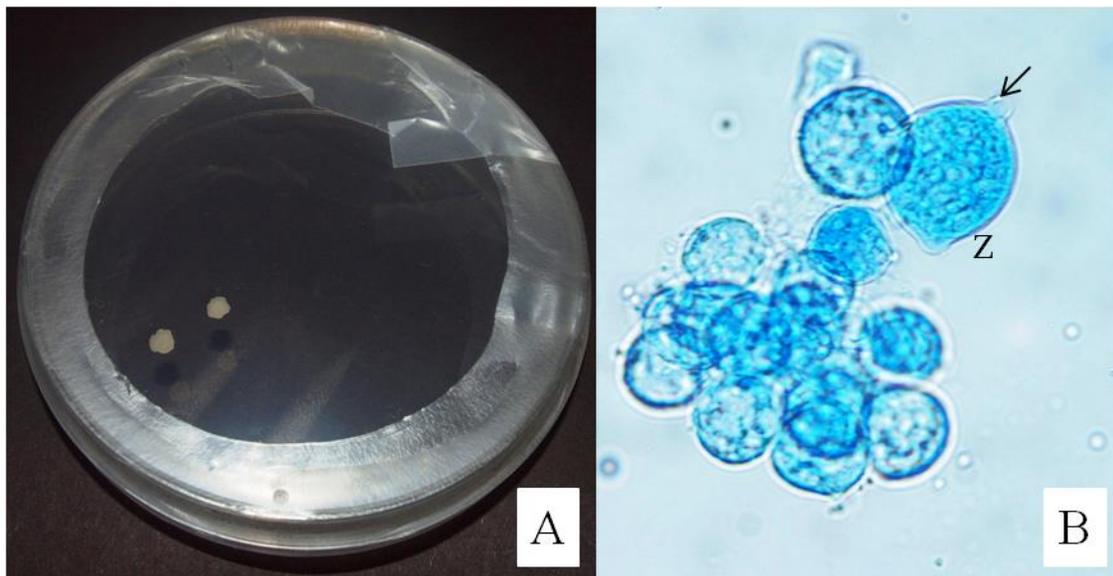


Figura 43. ***Batrachochytrium dendrobatidis***. A) Cultivo en medio solido mTGhL a 22°C durante un mes, se observan dos colonias de coloración blanquecina. B) Preparación húmeda con tinción de azul de algodón-lactofenol 100x, se observan los zoosporangios (Z) y papilas de descarga (→).

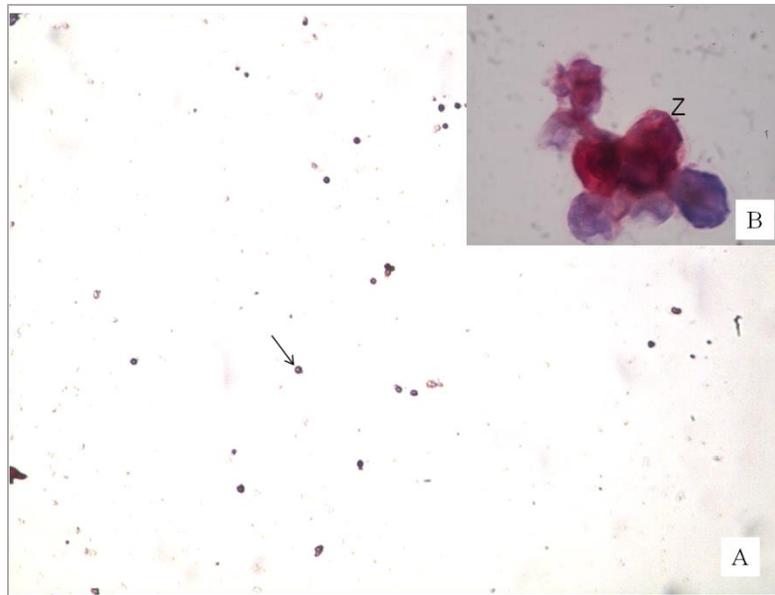


Figura 44. **Preparación húmeda con tinción de Gram de un crecimiento de *Batrachochytrium dendrobatidis* en medio mTGH.** Se observan zoosporangios (Z). A) 10x B) 40X

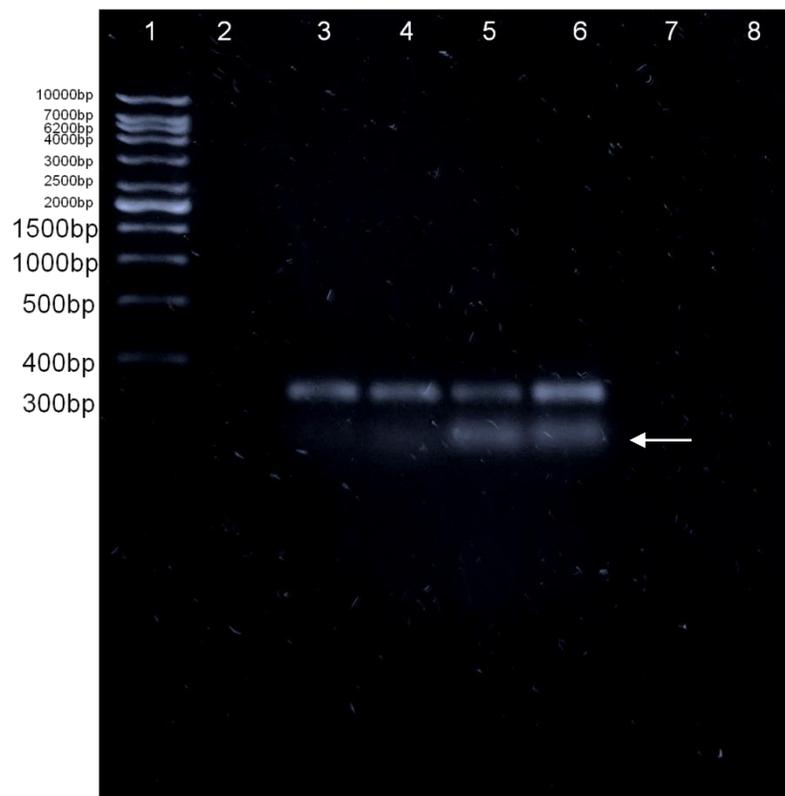


Figura 45. **Electroforesis de productos de PCR-EP de control positivo de *Batrachochytrium dendrobatidis* utilizando los iniciadores Bd1a y Bd2a, amplificación a 300pb de la cepa JEL423.** (→) Bandas inespecíficas. 1) Marcador 1 Kb; 2) Control negativo (Agua MilliQ); 3) Muestra *Bd*, PCR-EP protocolo modificado, concentración de sdDNA de 350ng; 4) Muestra *Bd*, PCR-EP protocolo modificado concentración de sdDNA de 350ng, concentración de la muestra 350ng; 5) Muestra *Bd*, PCR-EP

protocolo de Annis *et al.*, (2004); 6) Muestra *Bd*, PCR-EP con concentraciones protocolo de Annis *et al.*, (2004); 7) Agua MilliQ; 8) Agua MilliQ.

5.4.2 Muestras de la comunidad

De los 106 individuos capturados para la toma de muestras para los tres métodos, a 103 (97.16%) se les realizó un frotis de los miembros posteriores y región ventral para el diagnóstico por Reacción en Cadena de la Polimerasa Punto Final (PCR-EP), sin embargo dos (1.94%) de las muestras correspondientes a las especies *Lithobates zweifeli* e *Incilius occidentalis* tuvieron que ser descartadas por contaminación bacteriana.

Para las pruebas moleculares se procuró obtener 10 muestras por especie. En *Lithobates zweifeli*, *Tlalocohyla smithii* e *Incilius occidentalis* se obtuvieron más de 10 muestras, en *Agalychnis dacnicolor*, *Hyla arenicolor* y *Lithobates spectabilis* se obtuvieron las muestras exactas mientras que en el resto de las especies se obtuvieron menos muestras debido a su baja abundancia durante el muestreo del presente estudio (Tabla 13).

Tabla 13. **Muestras tomadas para el diagnóstico de *Batrachochytrium dendrobatidis* por PCR en la comunidad de anfibios de la Unidad de Manejo para Conservación de la Vida Silvestre (UMA) "Rancho El Salado"**

Espece	No. de individuos muestreados
<i>Incilius occidentalis</i>	12
<i>Rhinella marina</i>	8
<i>Craugastor mexicanus</i>	1
<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	11
<i>Agalychnis dacnicolor</i>	10
<i>Hyla arenicolor</i>	10
<i>Plectrohyla cyclada</i>	3
<i>Smilisca baudinii</i>	6
<i>Tlalocohyla smithii</i>	13
<i>Hypopachus ustus</i>	2
<i>Lithobates spectabilis</i>	10
<i>Lithobates zweifeli</i>	17

Utilizando el control positivo de *Bd* de la cepa JEL 423 primera generación en el laboratorio de micología, ninguna de las muestras amplificó para los marcadores Bd1a y Bd2a a 300pb. El método de extracción y amplificación utilizados fueron iguales a los establecidos para el control positivo.

Para verificar que el método de extracción fuese el correcto se seleccionó una muestra al azar de cada especie, en total 12 individuos (11.65%) para realizar una cuantificación de ADN por biofotómetro (Tabla 14), así como en los individuos que presentaron lesiones de acuerdo al examen histopatológico (Tabla 15). Los resultados indican la presencia de ADN en todas las extracciones.

En los casos de individuos con lesiones detectadas en el examen histopatológico se realizó una segunda ronda de PCR con el producto inicial de extracción, resultando negativas. Posteriormente, se realizó un PCR anidado de dos ciclos utilizando los marcadores Bd1a y Bd2a, donde 2 µl de un primer producto de PCR fue sometido a un segundo ciclo. Los resultados para las muestras obtenidas de individuos con lesiones fueron negativas nuevamente a *Bd* (Figura 46).

Tabla 14. **Lecturas en biofotómetro de extracciones de ADN de la comunidad de anfibios de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) "Rancho El Salado"**

Registro DOM	Especie	Lectura sdDNA (µg/mL)	Concentración ng (1:100)
4	<i>Lithobates zweifeli</i>	5.6	560.0
8	<i>Lithobates zweifeli</i>	7.2	720.0
11	<i>Lithobates zweifeli</i>	3.3	330.0
13	<i>Lithobates zweifeli</i>	5.2	520.0
17	<i>Lithobates zweifeli</i>	14.5	1450.0
24	<i>Tlalocohyla smithii</i>	4.3	430.0
33	<i>Lithobates spectabilis</i>	6.5	650.0
34	<i>Hypopachus ustus</i>	3.6	360.0
49	<i>Rhinella marina</i>	14.6	1460.0
52	<i>Incilius occidentalis</i>	7.3	730.0
72	<i>Eleutherodactylus nitidus</i>	1.9	190.0
92	<i>Smilisca baudini</i>	1.6	160.0

Tabla 15. **Lecturas en biofotómetro de extracciones de ADN de anfibios con lesiones de la comunidad de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre “Rancho El Salado”**

Registro		Especie	Lectura sdDNA (µg/mL)	Concentración ng (1:100)
DOM	Caso			
3	IP13-822C	<i>Lithobates zweifeli</i>	0.8	80.0
10	IP14-005	<i>Tlalocohyla smithii</i>	6.5	650.0
26	IP14-006	<i>Tlalocohyla smithii</i>	0.1	10.0
28	IP14-027	<i>Incilius occidentalis</i>	0.3	30.0
48	IP14-033	<i>Hyla arenicolor</i>	0.5	50.0
62	IP14-042	<i>Rhinella marina</i>	2.8	280.0
76	IP14-043	<i>Lithobates spectabilis</i>	1.0	100.0
81	IP14-044	<i>Lithobates spectabilis</i>	1.1	110.0
109	IP14-219	<i>Agalychnis dacnicolor</i>	2.3	230.0

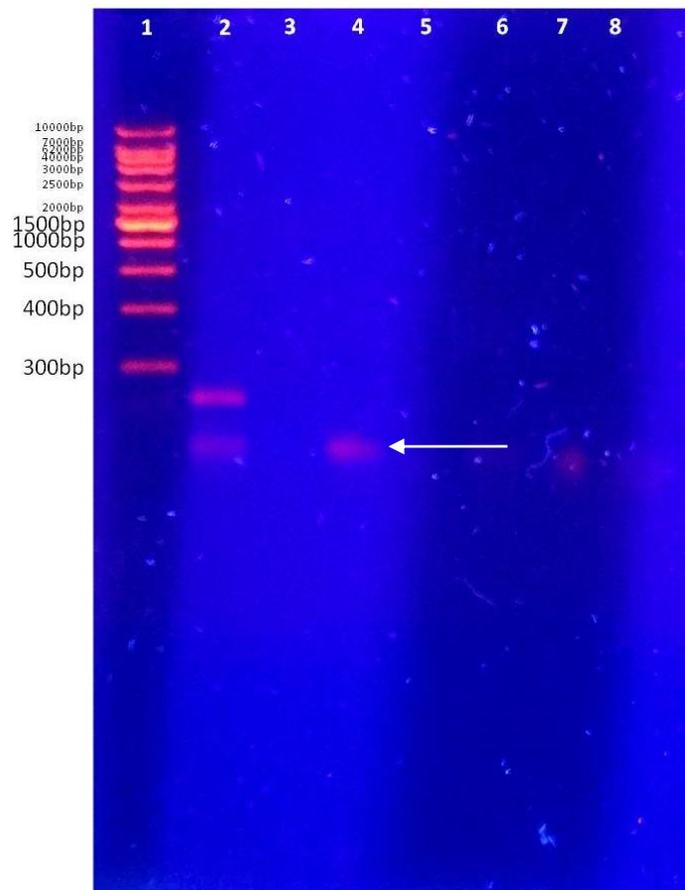


Figura 46. **Electroforesis de productos de PCR-EP anidado de muestras de anfibios de la UMA “Rancho El Salado” con lesiones histopatológicas, utilizando los iniciadores Bd1a y**

Bd2a, amplificación a 300pb. 1) Marcador 1 Kb; 2) Control positivo (*Bd*); 3) Control negativo Agua MilliQ; 4) IP13-822C; 5) IP14-005; 6) IP14-006; 7) IP14-027; 8) IP14-033. (→) Banda inespecífica.

DISCUSIÓN

La vigilancia y monitoreo de las poblaciones de anfibios es primordial para indagar sobre la dinámica poblacional que poseen y su estado de salud ante diferentes enfermedades emergentes (Mörner y Beasley, 2012). Daszak *et al.*, (1999) recopilaron información acerca de las declinaciones poblacionales ocurridas en América y Australia, así como los factores que afectaron a las especies principalmente en la década de 1980, encontrando que la enfermedad denominada quitridiomycosis, causada por el agente patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis*, fue una de las principales causantes.

En México, las actividades de monitoreo por parte de Lips *et al.*, (2004) y Hale *et al.*, (2005) permitieron identificar por primera vez poblaciones con declinaciones ocasionadas por el agente patógeno *Bd*. A partir de estos monitoreos se comenzó la búsqueda de la relación entre las declinaciones de poblaciones distribuidas en zonas con altitudes por arriba de los 1000 m.snm y la presencia del agente patógeno quitridio.

En el presente estudio se realizó un monitorio a la comunidad de anfibios de la Unidad de Manejo para la Conservación de la vida silvestre “Rancho El Salado” del estado de Puebla con el objetivo de identificar si el agente patógeno *Bd* se encontraba en los individuos que se registraban al inicio, durante y al final del periodo de lluvias.

Las características de la localidad como son la temperatura, la altitud y el tipo de vegetación, de acuerdo a Ron (2005), Frías *et al.*, (2008) y Alford (2010) no son propicios para que el agente patógeno pueda llevar a cabo su ciclo de vida. Sin embargo, en años recientes los monitoreos realizados por Luja *et al.*, (2012) y Cortés (20014) en poblaciones distribuidas en localidades con altitudes menores y en el límite de tolerancia de la temperatura de crecimiento de *Bd* han registrado individuos positivos al quitridio, relacionando dichos resultados a la presencia de especies invasoras y con fenómenos climatológicos.

En la localidad, Ortiz y Carmona (2013) no registraron especies invasoras de anfibios que pudieran ser un vector del agente patógeno, pero si registraron especies que en otras localidades han sido positivas a *Bd*, por lo cual la búsqueda del quitridio en la comunidad permite indagar más sobre su

epidemiología en zonas con bajas altitudes y conservadas de México, y que método de diagnóstico podría ser el más óptimo para estas poblaciones.

En la primera parte de este estudio se observaron fluctuaciones de riqueza y abundancia de las especies durante la temporada de lluvias del 2013 y se comparó con monitoreos de la misma realizados en años anteriores para identificar la dinámica poblacional y su relación con la presencia de casos positivos si se diagnosticaban, debido a que Hudson *et al.*, (2002) proponen que la probabilidad de una infección de un agente patógeno en una población es el resultado de la dinámica poblacional, las características de las especies y del hábitat.

A continuación se diagnosticaron a los individuos para la presencia de *Bd* bajo tres métodos: aislamiento y caracterización micológica, histopatología y biología molecular. Hyatt *et al.*, (2011) y Smith (2007) mencionan que la eficiencia de los métodos es diferente por lo cual aplicar los tres permite obtener mejores resultados y que no son excluyentes unos de otros, si no deben complementarse.

Prevalencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en la comunidad de anfibios de la UMA "Rancho El Salado"

Con el uso de los tres métodos aplicados en el diagnóstico de *Bd* se encontró que la comunidad de anfibios de la UMA "Rancho El Salado" durante la temporada de lluvias del 2013 no tuvo casos positivos. Este resultado se puede interpretar considerando los factores que proponen Hudson *et al.*, (2002).

Desde la dinámica poblacional, el resultado del presente estudio se puede deber al efecto de disolución propuesto por Searle *et al.*, (2011), el cual es un patrón inversamente proporcional entre el número de especies presentes en una localidad y la probabilidad de que exista contagio del agente patógeno. En la localidad durante la temporada de lluvias del 2013, se registró el 37.5% de las especies de anfibios para la Mixteca Poblana que reportaron García *et al.*, (2006), el 14.81% de las especies del estado del listado elaborado por García *et al.*, (2009) y el índice de diversidad de Shannon más alto con respecto a los previos de Ortiz y Carmona (2013), por lo que se propone que *Bd* no estuvo presente en esta comunidad por su alta riqueza de especies y que en caso de que este estuviera presente posee una baja probabilidad de contagio. La riqueza en la localidad se debe principalmente al tipo de vegetación presente, la selva baja caducifolia. Boyás (1994) señala a esta vegetación como la segunda con mayor riqueza florística y faunística en México, lo que corroboran Castro *et al.*, (2006) y García *et al.*, (2009) al reportarla como una de las más ricas en herpetofauna para el estado de Morelos y Puebla, respectivamente.

El patrón que propone el efecto de disolución se contrapone con los estudios realizados en centroamerica por Lips *et al.*, (2003), debido a que en las zonas de su estudio, que son localidades de Panamá y Costa Rica, la riqueza de especies es alta y existe una alta prevalencia de *Bd*, por lo tanto el efecto no sería valido. La prevalencia alta de *Bd* en el estudio de Lips *et al.*, se atribuye a que la mayoría de los individuos son acuáticos por lo cual su probabilidad de ser infectados es mayor a comparación de los individuos que son terrestres. El efecto de disolución de Searle *et al.*, (2011) deberá ser interpretado considerando las características de las especies.

En cuanto a las características de las especies, la prevalencia cero de *Bd* en la comunidad puede tener relación con las particularidades epidérmicas y reproductivas de cada especie. Harris *et al.*, (2006) y Woodhams *et al.*, (2007) relacionan la probabilidad de que un individuo este infectado con *Bd* por la presencia de bacterias que viven en la piel de los anfibios y que inhiben el crecimiento del patógeno, así como por la generación de péptidos con agentes antimicóticos y antimicrobianos en las glándulas de la piel. Por otro lado, Kriger y Hero (2007) encontraron que hay una diferencia significativa en la prevalencia de *Bd* en especies de anfibios de Australia que poseen diferentes formas de poner sus huevos con relación a los cuerpos de agua y Longo *et al.*, (2010) sugieren que el aumento de casos positivos de *Bd* se puede deber a que los individuos salen de sus refugios en búsqueda de alimento durante la temporada de lluvias.

En las características epidérmicas, las especies dependiendo de su conducta terrestre, arborícola o acuática, presentaron en este estudio un número diferente de capas de queratinocitos y glándulas secretoras, que tienen como funciones prevenir la deshidratación y generar sustancia contra agentes patógenos. Voyles *et al.*, (2011) considera que la conformación de la piel es una de las características principales en la susceptibilidad de los individuos, especialmente por la presencia de glándulas secretoras que generan péptidos con propiedades antibacterianas y antimicóticas, las cuales Rolling (2009) observó que poseían la capacidad de provocar la lisis celular de las zoosporas y zoosporangios (Rolling, 2009).

En las familias de anfibios Bufonidae, Hylidae y Ranidae hay individuos que secretan péptidos que afectan el ciclo de vida del quitridio, Berger *et al.*, (2005), Woodhams *et al.*, (2006, 2007), Rolling (2009), Conlon (2010) y Holden *et al.*, (2015) consideran que estas sustancias podrían ser una de las causas de que algunas especies sean menos susceptibles al quitridio. De las especies encontradas en el presente estudio, *Rhinella marina* genera sustancias antibacterianas, Medina y Espinoza (1995) describen que al agregar un liofilizado de las secreciones de la piel de hembras de esta especie a medios de crecimiento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* las colonias se pueden inhibir. En *Agalychnis dacnicolor* observaron Romero de Pérez y Ruiz (1996) diferentes tipos de glándulas en machos como una adaptación morfofisiológica para la secreción de sustancias que puedan atraer a las hembras durante la época

reproductiva, a su vez Wechselberger (1998) identificó dermaseptina, un péptido con actividad antibiótica y que Conlon *et al.*, (2007) encontraron su efecto inhibitor en las infecciones por *Bd* en la especie *Hylomantis lemur*.

Con respecto a las puestas de huevo y su relación a la susceptibilidad a *Bd*, Kriger y Hero (2007) encontraron que las especies que poseían baja prevalencia de *Bd* eran aquellas que tenían sus puestas en cuerpos de agua y arroyos efímeros, y en el suelo. El presente estudio sugiere que *Tlalocohyla smithii*, *Incilius occidentalis*, *Plectrohyla cyclada* y *Eleutherodactylus nitidus* al ser especies que llevan a cabo las puestas de sus huevos en cuerpos de agua efímeros y en la tierra tienen menor probabilidad de presentar *Bd*. Caldwell (1986) describe que los renacuajos de *Tlalocohyla smithii* son encontrados en cuerpos de agua efímeros y Mendelson III *et al.*, (2007) atribuyen a *Incilius occidentalis* las puestas de sus huevos en cuerpos de agua efímeros durante el inicio de la temporada de lluvias. Canseco y Gutiérrez (2010) indican que en *Plectrohyla cyclada* las puestas se hacen entre la hojarasca cerca de arroyos y en *Eleutherodactylus nitidus* los huevos son ubicados en lugares húmedos y en ocasiones, de acuerdo a Wollrich *et al.*, (2005), pueden presentar desarrollo directo, teniendo por lo tanto poca relación con los cuerpos de agua. Aunado a los estudios de Kriger y Hero (2007), Bancroft *et al.*, (2011) al realizar estudios estadísticos de casos de *Bd* en los Estados Unidos de Norteamérica, indican que las especies que están más relacionados a cuerpos de agua pueden ser más susceptibles al quitridio, lo cual también permite interpretar porque en la comunidad no se detectó *Bd*, al solo registrarse sólo dos con hábitos acuáticos.

Finalmente, de la presencia de los individuos durante la época de lluvias y la prevalencia del quitridio, Longo *et al.*, (2010) mencionan que durante la temporada de lluvias la temperatura disminuye siendo una condición ambiental favorable para el quitridio, además de que la probabilidad de infección aumenta por que los individuos interactúan más por los eventos reproductivos y búsqueda de alimento, como también lo menciona Wells (2007). Por ello en este estudio se consideró muestrear durante el periodo de lluvias ya que las especies son más abundantes en la localidad y la probabilidad de encontrar un individuo infectado aumenta, sin embargo algunas de las especies registradas no presentan una continuidad en la comunidad durante la temporada de lluvias por lo que disminuye la probabilidad de infección interespecífica.

Considerando las características de los individuos antes descritas, las especies podrían presentar baja probabilidad de estar infectadas por el quitridio pero *Smilisca baudinii*, *Eleutherodactylus nitidus*, *Lithobates spectabilis*, *Craugastor mexicanus* y *Plectrohyla cyclada* han sido reportadas como positivas a *Bd* en diferentes localidades de México, lo que cual es indicativo que la prevalencia cero o baja de *Bd* en la comunidad de anfibios de la UMA "Rancho El Salado" no se puede interpretar solamente por los individuos, sino también por las condiciones climáticas

derivadas del tipo de vegetación de la localidad que influyen en la prevalencia del agente patógeno, retomando a Hudson *et al.*, (2002), la probabilidad de las infecciones en los individuos se ve influenciado también por el hábitat el cuál en este estudio posee condiciones climáticas adversas para el establecimiento de *Bd* y no posee registro de especies invasoras.

Existen numerosos casos reportados de baja prevalencia o aparente ausencia de *Bd*, y se atribuyen a las condiciones climáticas (Rowley *et al.*, 2013) y altitudinales (Gandola y Hendry, 2013) de las localidades, así como a las características de los individuos (Gratwicke *et al.*, 2011). Por ejemplo, Australia es uno de los continentes con mayor número de reportes de *Bd* y se podría suponer que por las condiciones altitudinales y climáticas que presenta puede que en varias de sus localidades se encuentre presente el quitridio, sin embargo Murray *et al.*, (2009), al realizar un estudio epidemiológico de *Bd* en poblaciones de *Litoria pearsoniana* registraron localidades con ausencia del patógeno, atribuyendo dichos resultados a las temperaturas de las localidades que eran cercanas a los 27°C en verano. Hossack *et al.*, (2010) relacionan la baja prevalencia del quitridio en anfibios que habitan arroyos en Estados Unidos a los microclimas que se generan a consecuencia de la baja temperatura de la localidad y la vegetación.

Actualmente se propone a la Selva Baja Caducifolia como un refugio climático para la prevalencia de *Bd* en anuros. Zumbando *et al.*, (2014) sugieren que en la península de Santa Elena en Costa Rica, la baja prevalencia de *Bd* (<0.1%) se debe a que las condiciones ambientales de dicha vegetación restringen el crecimiento de *Bd*.

Métodos de diagnóstico empleados en la búsqueda de la prevalencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en la comunidad de anfibios de la UMA "Rancho El Salado"

En el presente estudio se emplearon tres métodos para el diagnóstico de *Bd*: aislamiento y caracterización micológica, histopatología y biología molecular. Los resultados de los tres métodos permiten corroborar si hay o no la presencia del agente patógeno, aunque Hyatt *et al.*, 2007 encontraron que los métodos tienen diferente eficacia, recomiendan que se empleen ya que son complementarios.

El método de aislamiento y caracterización del agente no es reconocido por la OIE (2011) pero se incluyó ya que para relacionar a un microorganismo determinado con un proceso de infección, el microorganismo debe ser aislado en un cultivo, esto con base en los postulados de Koch para demostrar que un microorganismo causa una enfermedad específica (Madigan *et al.*, 2004; Riddell, 1950).

De las muestras tomadas no se logró aislar al agente patógeno, uno de los primeros requerimientos que establecen Longcore *et al.*, (1999) para el aislamiento de *Bd* es obtener tejidos con lesiones macroscópicas de individuos muertos relacionadas con el agente patógeno, esto con el objetivo de poder tener un número considerable de zoosporangios. Durante el muestreo no se encontraron individuos con lesiones macroscópicas sugerentes al quitridio, sin embargo se tomaron tejidos que de acuerdo Berger *et al.*, (2005) y Puschendorf y Bolaños (2006) poseían un mayor número de zoosporangios, a diferencia de que en el presente estudio no se consideró tomar muestras de los dígitos de los miembros anteriores por involucrarse de manera importante en el amplexo durante la época reproductiva.

En los medios de aislamiento y caracterización crecieron otros microorganismos identificados como hongos ambientales, Berger *et al.*, (1998) reportaron que en los intentos de aislamiento del quitridio pueden crecer hongos y bacterias ambientales como *Aeromonas hydrophila* y *Falvobacterium indolegenes* y Longcore *et al.*, (1999) observaron también en medios con tejidos para aislamiento el crecimiento de oomycetes. El crecimiento de estos hongos y bacterias ambientales se puede deber según Cuenca *et al.*, (2006) a que las muestras no se sembraron inmediatamente antes de dos horas y por lo tanto hongos y bacterias ambientales se establecieron sobre los tejidos. Los tejidos colectados de la comunidad de anfibios de la UMA "Rancho El Salado" se transportaron en un medio adicionado con estreptomycin y penicilina a una temperatura de 4°C sin embargo presentaron los crecimientos y aunque al llegar al laboratorio se les colocó en un medio sólido adicionado con los mismos antibióticos que recomendó de manera personal la doctora Joyce Longcore, se desarrollaron crecimientos. Después de la primera salida no se decidió incrementar los antibióticos porque Johnson y Speare (2003) señalan que los medios con penicilina, estreptomycin y ciprofloxacina podrían inhibir el crecimiento de *Bd*, por ser en algunas ocasiones el quitridio más susceptible a los antimicóticos.

De los hongos ambientales aislados, se decidió buscar si estaban relacionados con alguna patología presente en anfibios, se encontró que sólo *Fusarium* spp. al ser un hongo filamentoso oportunista genera dermatitis. Perpiñán *et al.*, (2010) revisaron un ejemplar de *Bufo baxteri* que presentaba en la piel hiperplasia, costras y úlceras características de una dermatitis que a simple vista podría confundirse con *Bd*, pero al realizar el análisis histopatológico observaron las hifas de *Fusarium* spp. necrosando las células de la epidermis. Se considera este caso como resultado del cautiverio, debido a que los anfibios pueden presentar una supresión del sistema inmune y por lo tanto los hongos al tener condiciones de alta humedad pueden provocar micosis. En el presente estudio los individuos provienen de vida libre y están en contacto constante con estos agentes sin desarrollar alguna patología, lo que se corrobora al no observar lesiones histopatológicas en los tejidos.

El segundo método empleado fue el estudio histopatológico que se incluyó en el presente estudio porque permite de acuerdo a Smith (2007) observar la presencia del agente patógeno, así como el desarrollo de la enfermedad en caso de que esta se hubiera presentado como una alteración morfológica o lesiones de los tejidos. Aunado a ello, también opina que los casos positivos de *Bd* no sólo se deben identificar e interpretar con estudios moleculares, que verifican la presencia del agente patógeno, pero no de la enfermedad quitridiomycosis, ya que si no se considera la revisión histológica de las lesiones no se sabe el grado de lesión que provoca el patógeno en cada fase de su ciclo de vida y a qué grado los estratos epidérmicos se ven en mayor o menor medida afectados.

Utilizando en el presente estudio el método de histopatología se encontraron nueve lesiones. Ocho de las lesiones no se les relacionó con la presencia de *Bd*. La lesión más frecuente fue las pseudoinclusiones o inclusiones citoplasmáticas, Hargis y Ginn (2005) indican que este tipo de corpúsculos se encuentran al interior de células anormales con infecciones víricas y para corroborarlo se recomienda procesos histoquímicos que identifiquen ADN y ARN. También la presencia de estos cuerpos de inclusión se pueden observar en formas aberrantes de fibras y son particularmente frecuentes. Kumbar *et al.*, (2005) mencionan que los cuerpos de inclusión no son sólo de origen vírico sino que pueden ser acumulaciones de diversas sustancias que se pueden agrupar en tres categorías: 1) acumulaciones normales de material celular que se encuentra en exceso; 2) sustancias anormales de origen exógeno a la célula, como minerales o productos de agentes infecciosos, o de origen endógeno, como productos de una síntesis anormal o metabólica; y 3) pigmentos.

En los individuos de *Tlalocohyla smithii* y *Agalychnis dacnicolor* donde se observaron la presencia de cuerpos de inclusión en el citoplasma de las células epidérmicas, se sugiere que pueden ser sustancias anormales producto de agentes infeccioso diferentes a *Bd* o por problemas metabólicos. Para corroborarlo se recomienda hacer tinciones específicas que ayuden a indagar si las inclusiones son el resultado de infecciones víricas o bacterianas o de otro origen (Cheville, 1980) y el uso de pruebas moleculares.

En el caso de las necrosis de dos individuos de *Lithobates spectabilis* se identificó esta alteración en la muerte celular al observarse en los tejidos células muertas de forma excesiva. Runnells *et al.*, (1967) definen a la necrosis como la muerte local de un tejido en individuos vivos que puede ser ocasionado por diferentes agentes etiológicos en la mayoría de las veces por irritantes. Dentro de las causas de la necrosis se encuentran los compuestos tóxicos y alteraciones en la circulación por déficit de nutrientes, lesiones mecánicas, cambios de temperatura, isquemia, anemia o agentes biológicos.

En el presente estudio se sugiere que en uno de los individuos de *Lithobates spectabilis* que presentó necrosis por lesiones mecánicas e infección bacteriana secundaria, ya que es un individuo que fue muestreado en un cuerpo de agua poco profundo y al final de la temporada de lluvias por lo cual al desplazarse tuvo las lesiones que a simple vista son menores, pero en el examen histopatológico son más notorias, sobre todo por el origen de los tejidos, que fueron los dedos de las patas traseras.

El segundo individuo que presentó necrosis se le relaciona con un agente infeccioso que fue observado durante el examen histopatológico. El agente presenta estructuras sugerentes a *Bd*, Longcore *et al.*, (1999) al describir al hongo en tejidos de *Dendrobates tinctorius* identificaron el talo de forma esférica con un tamaño de 7 a 15 μm , las estructuras que se encontraron en el examen histopatológico del dígito de *Lithobates spectabilis* tenían de 4 a 7 μm y presentaban un septo similar al que Berger *et al.*, (2000) encontraron en esporangios inmaduros de *Bd* en un individuo de *Mixophyes fasciolatus*.

La muestra obtenida del individuo de *Lithobates spectabilis* fue procesada tres veces por el método de biología molecular y resultó negativo. En el presente estudio se recomienda que en este tipo de casos donde hay estructuras sugerentes a *Bd* y el método molecular indica un resultado negativo, se realice una extracción de ADN a los tejidos y sea secuenciada, lo cual no se realizó en el presente estudio, para que sea comparado con el material genético de cepas conocidas de *Bd* u otros agentes patógenos.

De las otras lesiones, la hiperqueratosis en un individuo de *Rhinella marina* no se relacionó con un agente patógeno ya que no fue observado durante las revisiones histopatológicas. Hargis y Ginn (2007) explican que la hiperqueratosis es una respuesta de la epidermis a lesiones donde se incrementan las capas celulares del *stratum corneum* al estar la piel en contacto con un estímulo crónico como puede ser un trauma superficial, inflamación y exposición al sol, o también por deficiencia de vitaminas. Es por ello que se considera en este estudio que el individuo, al ser muestreado al final de la temporada de lluvias, presentó la lesión de hiperqueratosis como consecuencia a la fricción entre su piel y el sustrato de su hábitat.

La reacción inflamatoria de *Incilius occidentalis* pudo ser causada por un irritante. Runnells *et al.*, (1965) indican que las alteraciones de los tejidos en la inflamación pueden ser a consecuencia de lesiones o de agentes patógenos y Millard (1990) indica que la reacción inflamatoria es una respuesta del cuerpo para protegerse ante un estímulo externo.

Finalmente, la degeneración de queratinocitos en un individuo de *Lithobates zweifeli* y la degeneración balonoide en un individuo de *Hyla arenicolor* no se observaron agentes patógenos

que pudieran estar relacionados con esta alteración epidérmica. Hargis y Ginn (2007) explican que las alteraciones en el crecimiento o diferenciación celular en la epidermis es un tipo de respuesta a factores intrínsecos y extrínsecos, por lo que la degeneración de los queratinocitos puede ser resultado de una reacción alérgica, inflamación, desorden metabólico o nutricional, golpes o contaminantes ambientales.

El diagnóstico por histopatología en la comunidad de anfibios de la comunidad UMA “Rancho El Salado” permitió identificar lesiones que a nivel macroscópico no fueron visibles y que por el método molecular no se hubieran detectado, además se pudo observar diferencias morfológicas en las capas epidérmicas y dérmicas que presentan los individuos dependiendo del hábitat terrestre, arborícola o semiacuático que habitan. Elias y Shapiro (1957), Fox (1986) y Duellman y Trueb (1994), encontraron incremento en el número de glándulas dérmicas en especies terrestre y arborícolas, como se observan en los individuos del presente estudio, y proponen que es debido a una estrategia para prevenir la pérdida de agua.

Es importante considerar que para un diagnóstico con mayor veracidad se recomienda realizar estudios histopatológicos acompañados de métodos moleculares de detección de patógenos como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), el cual permite tener un diagnóstico temprano de *Bd* por tener la capacidad de detectarlo a partir del día siete de la infección, mientras que las pruebas histopatológicas requieren de que el individuo haya sido infectado catorce días antes de la toma de muestra (Hyatt *et al.*, 2007).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es la técnica más recomendada para el diagnóstico de *Bd* ya que logra identificar la presencia del patógeno en tejidos o muestras de individuos que tienen pocos días de infección por su mayor sensibilidad (Hyatt *et al.*, 2007). Para que los resultados de esta prueba sean válidos se deben de cumplir tres criterios:

- 1) Controles positivos
- 2) Presencia de material genético (ADN)
- 3) Ausencia de inhibidores

Durante el presente estudio se obtuvo como control positivo la cepa JEL 423, la cual fue reproducida exitosamente y sin la presencia de otros microorganismos en los crecimientos en medio líquido, a su vez resultó positiva bajo el protocolo de Annis *et al.*, (2004), debido a que amplificó a 300pb.

El control positivo fue utilizado en todas las PCR realizadas con las muestras de campo. Para una mejor calidad de este se extrajo ADN de los crecimientos líquidos cada vez que se hacía una

nueva reacción. Aunado a ello, se tuvo que acelerar el crecimiento en medios líquidos, siendo el medio H broth (pH 6.8) en donde se obtuvo en menor tiempo un mayor crecimiento del quitridio. De acuerdo a Pitrowski *et al.*, (2004) *Bd* crece mejor en un intervalo de pH de 4 a 8, teniendo un pico de crecimiento a un intervalo de 6 a 7. Con respecto al adición de glucosa, menciona que una concentración alta de glucosa (2%) puede inhibir el crecimiento de *Bd*, la concentración que se utilizó en la elaboración del medio fue de 0.3%, por lo que ayudo a crecer al quitridio.

Con respecto a la presencia de material genético en las muestras, se siguió el protocolo de Boyle *et al.*, (2004), donde se establece que para la obtención óptima de material genético de *Bd* se deben realizar con el hisopo 30 veces el raspado en la parte ventral del cuerpo. Durante la toma de hisopados de igual manera se tomaron los individuos y se realizó el hisopado 30 veces pero considerando no solo la parte ventral del cuerpo, sino también la piel ventral del miembro posterior y de los dígitos, ya que Puschendorf y Bolaños (2006) indican que para detectar al quitridio existe una diferencia significativa entre las partes del cuerpo de donde se tome la muestra, y que los dígitos delanteros, el parche pélvico y la piel ventral del miembro posterior son los mejores lugares para tomar las muestras.

Posteriormente, los hisopos fueron almacenados en tubos eppendorf estériles para evitar la contaminación a 4°C sin alcohol. Hyatt *et al.*, (2007) mencionan que es más favorable guardar las muestras sin alcohol si se van a procesar en un lapso menor de 18 meses, porque al almacenarse en etanol se deben realizar lavados con agua DS y el número de zoosporas que se recupera es menor. En relación con la temperatura de almacenamiento, Van Sluys *et al.*, (2008) analizaron la influencia en la detección por PCR de *Bd*, registrando una ligera degradación del material genético si las muestras no se conservaban a temperaturas bajas. Ambos trabajos nos permiten indicar que el manejo de la muestra fue óptimo para conservar el material genético sin degradarse.

En el protocolo de extracción se obtuvo ADN, tanto del control positivo como de las muestras, lo cual se corroboró al obtenerse lecturas en el Biofotómetro. La lisis utilizada Prepman ultra está reportada para PCR-RT por Boyle *et al.*, (2004) y se ha utilizado en numerosos estudios para el diagnóstico de *Bd*. Para evitar la degradación y la contaminación se siguieron las indicaciones de la ficha técnica del producto (Applied Biosystems, 2010). Recientemente Bletz *et al.*, (2015) indican que Prepman ultra en comparación con otros juegos de reactivos comerciales para la extracción de ADN de *Bd* es menos eficiente a una menor concentración de zoosporas, para términos de PCR-EP puede ser factible su uso.

Con respecto a la inhibición de la PCR, en el protocolo de Annis *et al.*, (2004) al utilizar un método de extracción diferente al utilizado en las muestras, emplearon RNAsa así como un juego de reactivos de purificación de ADN (Qiaex II Gel Extraction Kit – Qiagen) previo a la amplificación de

las regiones de interés. En el presente estudio, al utilizar el protocolo propuesto por Boyle *et al.*, (2004) no se empleó algún juego de reactivos para la purificación de la extracción, debido a que el reactivo Prepman ultra utilizado de acuerdo a la bibliografía permitía tener una menor probabilidad de inhibición durante la reacción de PCR. Considerando que se pudo obtener la amplificación de los controles positivos y se siguió el mismo método para la amplificación de las muestras, la inhibición de la PCR es poco probable, como lo mencionan Hyatt *et al.*, (2007). En los estudios de Kosch y Summers (2013) y Bletz *et al.*, (2015) al comparar los mejores métodos de extracción de ADN de *Bd*, discuten la efectividad del reactivo Prepman ultra y su efecto en la inhibición de la PCR, por lo cual su uso debe ser analizado.

Por último, en los casos de individuos con lesiones detectadas en el examen histopatológico, en las PCR realizadas los resultados fueron negativos. Para verificar que no fueran falsos negativos se realizó una segunda PCR. Hyatt *et al.*, (2007) consideran que se pueden obtener falsos negativos por una baja concentración de *Bd* al tomarse las muestras en etapas muy tempranas de la infección o por la presencia de inhibidores, ambas posibilidades se pueden descartar si se considera: 1) la observación de lesiones en la epidermis relacionadas con quitridio se presentan 14 días después de la infección donde la cantidad de zoosporas es mayor a la mínima que detecta la PCR, y 2) la obtención de amplificación de controles positivos sin inhibidores; por lo que, la lesiones que se observan podrían ser producto de otra alteración en la epidermis no relacionada con la presencia de *Bd*. Hossack *et al.*, (2010) por ejemplo observaron en individuos en metamorfosis la ausencia de los dentículos, lo cual podría ser una manifestación de la enfermedad, pero no fueron positivos en PCR-RT.

Con base en los trabajos de Olsen *et al.*, (2004), Berger *et al.*, (2000; 2005b) y Kriger *et al.*, (2006) el método de histopatología, utilizando la tinción de hematoxilina-eosina, puede generar controversias al identificar al quitridio, por lo que en el presente estudio se sugiere que si solo se empleara el método de histopatología para identificar la prevalencia de *Bd* deberá utilizarse otras tinciones especiales como Grocott y Ácido peryodico de Shiff que permitan observar estructuras micóticas, el incremento de queratina y que el origen de las muestras sea de más de un lugar anatómico.

Por otro lado, sí en las muestras se llegarán a emplear otras técnicas histológicas y estas nuevamente dieran resultados compatibles con casos positivos de *Bd* se debería revisar el diagnóstico molecular. Annis *et al.*, (2004) al diseñar los primers Bd1a y Bd2a utilizaron cepas provenientes de Norteamérica y Centroamérica, pero el autor hace la aclaración que debido a los nuevos descubrimientos en las variedades genéticas de las cepas de *Bd* los primers no pueden detectar todas las cepas. Rosenblum *et al.*, (2013) reportaron que existe variabilidad significativa entre la secuencia del genoma de las cepas de *Bd* y que incluso los protocolos de PCR-RT pueden

subestimar la concentración de zoosporas por esta misma razón, de acuerdo a lo encontrado por Longo *et al.*, (2013) y Mendoza *et al.*, (2015).

CONCLUSIONES

En el presente estudio de la prevalencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en la comunidad de anfibios de la UMA “Rancho El Salado”, Jolalpan, Puebla, realizando un censo en los resultados obtenidos bajo los métodos empleados de aislamiento, histopatología y PCR, no se encontraron casos positivos. Por lo cual se recomienda:

- Un monitoreo de *Bd* a largo plazo en la comunidad de anfibios de la UMA “Rancho El Salado” como parte de las estrategias para el mantenimiento de las poblaciones de vida libre y control de quitridiomycosis.
- Monitoreos de la comunidad de anfibios de la UMA “Rancho El Salado” que consideren muestreos en la temporada de lluvias y secas debido a que el presente estudio sólo presenta resultados correspondientes a la temporada de lluvias y las condiciones climáticas pueden influir en la composición e interacciones ante la susceptibilidad y grado de dispersión del agente patógeno.
- En el diagnóstico por métodos moleculares por PCR emplear más de un control positivo, pues se sabe que existen diferencias en las cepas de *Bd* que pueden estar asociadas a condiciones ambientales y una selección por parte del hospedero.
- Realizar la histopatología de los tejidos, pues con ello se podrá saber si *Bd* se encuentra afectando la epidermis de los hospederos, así como si no se llega a detectar con los métodos moleculares por las diferencias en las cepas con los controles positivos.
- Estudiar la prevalencia de *Bd* en otras comunidades de anfibios de México que se distribuyan en la Selva Baja Caducifolia para indagar más sobre si este tipo de vegetación puede ser un refugio a la dispersión del agente patógeno.
- Aislar cepas mexicanas de localidades similares para entender más sobre la epidemiología de *Bd* en las cepas mexicanas y obtener un control positivo de condiciones climáticas similares a las de la comunidad.

ANEXO 1. Reportes de *Batrachochytrium dendrobatidis* en especies de anfibios en México hasta el 2014

* Especies que tienen registros positivos en más de un estado de la república mexicana.

ESTADO	ESPECIES	REPORTE
Baja California	<i>Lithobates catesbeianus</i>	Huss et al, 2014
	<i>Pseudacris hypochondriaca curta</i>	Luja et al, 2012
Chiapas	<i>Agalychnis moreletii</i> *	Muñoz, 2010
	<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Muñoz, 2010
	<i>Bolitoglossa rufescens</i> *	Muñoz, 2010
	<i>Craugastor</i> sp	Muñoz, 2010
	<i>Dendropsophus ebraccatus</i>	Muñoz, 2010
	<i>Dendrotriton megarhinus</i>	Muñoz, 2010
	<i>Dendrotriton xolocallae</i>	Velo-Antón et al, 2012; Muñoz, 2010
	<i>Duellmanohyla schmidtorum</i>	Muñoz, 2010
	<i>Hyla walkeri</i>	Muñoz, 2010
	<i>Hypopachus barberi</i>	Muñoz, 2010
	<i>Incilius macrocristatus</i> *	Muñoz, 2010
	<i>Incilius valliceps</i>	Muñoz, 2010
	<i>Plectrohyla ixil</i>	Muñoz, 2010
	<i>Plectrohyla lacertosa</i>	Muñoz, 2010
	<i>Plectrohyla matudai</i> *	Cheng et al, 2011; Muñoz, 2010; Lips et al, 2004
	<i>Plectrohyla sagorum</i>	Muñoz, 2010; Lips et al, 2004
	<i>Plectrohyla</i> sp1	Muñoz, 2010
	<i>Plectrohyla</i> sp2	Muñoz, 2010
	<i>Plectrohyla</i> sp3	Muñoz, 2010
	<i>Plectrohyla</i> sp4	Muñoz, 2010
	<i>Ptychohyla euthysanota</i>	Muñoz, 2010
	<i>Rana berlandieri</i> *	Muñoz, 2010
	<i>Rana maculata</i>	Muñoz, 2010
	<i>Smilisca baudinii</i> *(1)	Muñoz, 2010
	<i>Tlalocohyla loquax</i>	Muñoz, 2010
Distrito Federal	<i>Rana montezumae</i>	Frías-Álvarez, P et al 2008
Edo. de México	<i>Ambystoma altamirani</i>	Frías-Álvarez, P et al 2008
	<i>Ambystoma granulosum</i>	Frías-Álvarez, P et al 2008
	<i>Hyla eximia</i>	Frías-Álvarez, P et al 2008

	<i>Pseudoeurycea cephalica</i> *	Van Rooij et al, 2011
	<i>Pseudoeurycea leprosa</i> *	Van Rooij et al, 2011
	<i>Rana megapoda</i>	Frías-Álvarez, P et al 2008
	<i>Rana neovolcanica</i> *	Frías-Álvarez, P et al 2008
Guerrero	<i>Agalychnis moreletii</i> *	Frías-Álvarez, P et al 2008
	<i>Bufo</i> sp	Familiar, 2010
	<i>Craugastor pygmaeus</i>	Familiar, 2010
	<i>Craugastor</i> sp	Familiar, 2010
	<i>Eleutherodactylus nitidus</i> ⁽¹⁾	Familiar, 2010
	<i>Eleutherodactylus pipilans</i>	Familiar, 2010
	<i>Eleutherodactylus saltator</i>	Lips, et al 2004
	<i>Exerodonta melanoma</i>	Frías-Álvarez, P et al 2008
	<i>Exerodonta sumichastri</i>	Familiar, 2010
	<i>Hyla</i> sp	Lips, et al 2004
	<i>Lithobates forreri</i>	Familiar, 2010
	<i>Lithobates</i> sp1	Familiar, 2010
	<i>Lithobates</i> sp2	Familiar, 2010
	<i>Plectrohyla pentheter</i>	Familiar, 2010
	<i>Ptychohyla erythromma</i>	Lips, et al 2004
	<i>Ptychohyla leonhardschultzei</i> *	Familiar, 2010
	<i>Rana sierramadrensis</i>	Familiar, 2010; Lips, et al 2004
	<i>Smilisca baudinii</i> * ⁽¹⁾	Familiar, 2010
Hidalgo	No identificada	Phillips et al, 2014
Jalisco	<i>Leptodactylus melanonotus</i>	García, 2014
	<i>Smilisca fodiens</i>	García, 2014
Michoacán	<i>Ambystoma granulosum</i>	Frías-Álvarez, P et al 2008
	<i>Ambystoma rivulare</i>	Frías-Álvarez, P et al 2008
	<i>Rana neovolcanica</i> *	Frías-Álvarez, P et al 2008
Morelos	<i>Rana spectabilis</i> * ⁽¹⁾	Frías-Álvarez, P et al 2008
Oaxaca	<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Cabrera, 2012
	<i>Craugastor mexicanus</i> * ⁽¹⁾	Velo-Antón et al, 2012
	<i>Craugastor</i> sp	Cabrera, 2012
	<i>Duellmanohyla ignicolor</i>	Lips, et al 2004
	<i>Hyla cyclada</i>	Lips, et al 2004
	<i>Hyla euphorbiaceae</i>	Frías-Álvarez, P et al 2008

	<i>Hyla nephila</i>	Lips, et al 2004
	<i>Hyla Sabrina</i>	Lips, et al 2004
	<i>Incillus macrocristatus*</i>	Cabrera, 2012
	<i>Incillus valliceps*</i>	Cabrera, 2012; Muñoz, 2010
	<i>Lithobates berlandieri*</i>	Cabrera, 2012
	<i>Plectrohyla matudai*</i>	Cabrera, 2012
	<i>Plectrohyla</i> sp	Cabrera, 2012
	<i>Ptychohyla ecthysanota</i>	Cabrera, 2012
	<i>Ptychohyla leonhardschultzei*</i>	Lips, et al 2004
	<i>Smilisca baudinii</i> * ⁽¹⁾	Cabrera, 2012
	No identificada	Phillips et al, 2014
Puebla	<i>Ambystoma velasci</i>	Frías-Álvarez, P et al 2008
	<i>Pseudoeurycea leprosa*</i>	Cheng et al, 2011
	<i>Rana berlandieri*</i>	Santos, 2004
Sonora	<i>Rana tarahumarae</i>	Hale et al, 2005; Hale et al, 2001
	<i>Rana yavapaiensis</i>	Hale et al, 2001
Tlaxcala	<i>Pseudoeurycea leprosa*</i>	López, 2014
Veracruz	<i>Bolitoglossa rufescens*</i>	Van Rooij et al, 2011
	<i>Charadrahyla taeniopus</i>	Murrieta-Galindo et al, 2014
	<i>Craugastor berkenbuschii</i>	Murrieta-Galindo et al, 2014
	<i>Craugastor loki</i>	Murrieta-Galindo et al, 2014
	<i>Craugastor mexicanus</i> * ⁽¹⁾	Murrieta-Galindo et al, 2014
	<i>Craugastor</i> sp	Murrieta-Galindo et al, 2014
	<i>Ecnomiohyla miotympanum</i>	Murrieta-Galindo et al, 2014
	<i>Pseudoeurycea cephalica*</i>	Van Rooij et al, 2011
	No identificada	Phillips et al, 2014; 2013

ANEXO 2. Medios para aislamiento y caracterización micológica de *Batrachochytrium dendrobatidis*

Medio de Triptona 1% con antibiótico

1000 ml Agua destilada
10 g Bacto-Triptona
100 mg Penicilina
100 mg Estreptomicina
0.5 mg Ciprofloxacilina

Medio mTGhL

1000 ml Agua destilada
8 g Bacto-Triptona
4 g Lactosa
200 mg Penicilina
500 mg Estreptomicina
10 g Agar purificado

Medio TGhL

1000 ml Agua destilada
8 g Bacto-Triptona
2 g Lactosa
4 g Gelatina hidrolizada
10 g Agar

Medio líquido H broth

1000 ml Agua destilada
10 g Bacto-Triptona
3.2 g Glucosa

Nota: Los antibióticos se deben agregar al medio posteriormente a la esterilización en autoclave.

ANEXO 3. Protocolos de tinción para la identificación de *Batrachochytrium dendrobatidis* por histopatología.

Tinción Hematoxilina-Eosina

- 1.- Hidratar los portaobjetos con los cortes:
 - 1.1 Sumergirlos en etanol 100% durante 3 minutos.
 - 1.2 Sumergirlos en etanol 95% durante 3 minutos.
 - 1.3 Sumergirlos en etanol 95% durante 3 minutos.
 - 1.4 Sumergirlos en etanol 70% durante 5 minutos.
 - 1.5 Sumergirlos en agua corriente durante 5 minutos
- 2.- Lavarlos con agua destilada durante un minuto dos veces.
- 3.- Sumergirlos en la solución hematoxilina alumínica de Harris de 3 a 5 minutos.
- 4.- Lavarlos con agua destilada durante un minuto dos veces.
- 5.- Sumergirlos en alcohol ácido durante 20 segundos.
- 6.- Lavarlos en agua corriente durante 2 minutos.
- 7.- Sumergirlos en carbonato de litio al 1% durante 20 segundos.
- 8.- Lavarlos en agua corriente durante 5 minutos.
- 9.- Lavarlos en agua destilada durante 1 minuto dos veces.
- 10.- Sumergirlos en solución de eosina de 3 a 5 minutos.
- 11.- Deshidratar los portaobjetos con los cortes:
 - 11.1 Sumergirlos en etanol 70% durante un minuto.
 - 11.2 Sumergirlos en etanol 95% durante un minuto.
 - 11.3 Sumergirlos en etanol 95% durante un minuto.
 - 11.4. Sumergirlos en etanol 100% durante un minuto.
 - 11.5. Sumergirlos en etanol 100% durante 2 minutos.
 - 11.5 Sumergirlos en agua corriente durante 5 minutos
- 12.- Sumergirlos en xilol por un minuto y posteriormente 2 minutos en otra solución de xilol diferente.

Tinción de Gomori-Grocott

- 1.- Deshidratar los portaobjetos con los cortes:
 - 1.1 Etanol 100% durante 5 minutos.
 - 1.2 Etanol 96% durante 5 minutos.
 - 1.3 Etanol 70% durante 5 minutos.
- 4.- Lavarlos en agua destilada.

- 5.- Sumergirlos en solución de ácido crómico al 5% durante 10 minutos.
- 6.- Lavarlos con agua destilada durante 10 minutos.
- 7.- Sumergirlos en bisulfito sódico al 1% durante un minuto.
- 8.- Lavarlos con agua destilada de 3 a 4 veces.
- 9.- Introducirlos en un recipiente con la solución de metanamina-nitrato de plata a 60°C por dos minutos.
- 10.- Sacar los portaobjetos y lavarlos con agua destilada.
- 11.- Sumergirlos en una solución de cloruro de oro al 1% por 5 minutos, inmediatamente después lavarlos con agua destilada.
- 12.- Cubrirlos con una solución de trisulfato sódico al 2% durante un minuto, inmediatamente después lavarlos con agua destilada.
- 13.- Cubrirlos con una solución al 0.2% de verde brillante en ácido acético glacial durante un minuto, posteriormente lavarlos con agua destilada y dejar secar.

ANEXO 4. Protocolo de tinción para la identificación de *Batrachochytrium dendrobatidis* de medio de cultivo.

Tinción de azul de algodón-lactofenol

- 1.- Colocar una gota de azul de algodón-lactofenol en un portaobjetos
- 2.- Tomar una muestra de una colonia con un asa micológica.
- 3.- Poner la muestra sobre la gota de azul de algodón del portaobjeto
- 4.- Poner un cubreobjetos sobre la preparación.
- 5.- Observar al microscopio

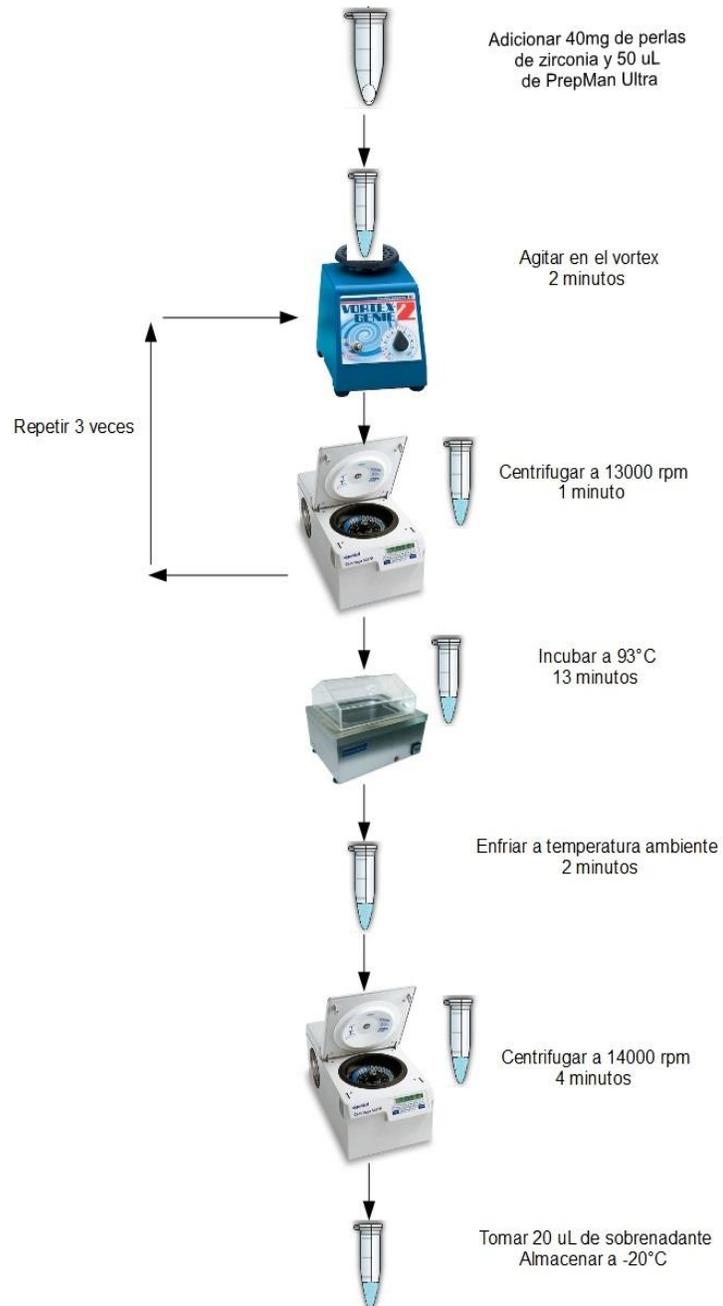
Azul de algodón-lactofenol

20 ml	Agua destilada
20 g	Cristales de fenol
20 ml	Ácido láctico
20 ml	Glicerina
0.05 g	Azul de algodón

Tinción de Gram

- 1.- Colocar una gota de azul de agua destilada en un portaobjetos.
- 2.- Tomar una muestra de una colonia con un asa micológica.
- 3.- Poner la muestra sobre la gota de agua destilada del portaobjeto.
- 4.- Fijar la muestra al calor flameándola en el mechero sin quemar la muestra.
- 5.- Cubrir la muestra con solución de cristal violeta por 1 minuto.
- 6.- Retirar la solución de cristal violeta y lavar con agua destilada.
- 7.- Cubrir la muestra con solución de lugol por 1 minuto.
- 8.- Retirar la solución de lugol y lavar con agua destilada.
- 9.- Cubrir la muestra con solución alcohol-acetona por 15 segundos.
- 10.- Retirar la solución de alcohol-acetona y lavar con agua destilada.
- 11.- Cubrir la muestra con solución de safranina por 1 minuto.
- 12.- Retirar la solución de safranina y lavar con agua destilada.
- 13.- Dejar secar la muestra y observarla al microscopio.

ANEXO 5. Protocolo para la extracción de ADN de *Batrachochytrium dendrobatidis* modificado de Boyle et al., (2004)



ANEXO 6. Especies de anfibios de la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) “Rancho El Salado”, Puebla, México

Familia: Bufonidae



Incilius occidentalis
Foto F. H. Carmona Torres



Rhinella marina
Foto D. Ortiz Millán

Familia: Craugastoridae



Craugastor mexicanus
Foto D. Ortiz Millán



Craugastor mexicanus
Foto D. Ortiz Millán

Familia: Eleutherodactylidae



Eleutherodactylus nitidus
Foto F. H. Carmona Torres



Eleutherodactylus nitidus
Foto F. H. Carmona Torres

Familia: Hylidae



Agalychnis dacnicolor
Foto D. Ortiz Millán



Hyla arenicolor
Foto D. Ortiz Millán



Plectrohyla cyclada
Foto D. Ortiz Millán



Plectrohyla cyclada
Foto D. Ortiz Millán



Smilisca baudinii
Foto D. Ortiz Millán



Smilisca baudinii
Foto D. Ortiz Millán



Tlalocohyla smithii
Foto F. H. Carmona Torres



Tlalocohyla smithii
Foto D. Ortiz Millán

Familia: Microhylidae



Hypopachus ustus
Foto D. Ortiz Millán



Hypopachus ustus
Foto F. H. Carmona Torres

Familia: Ranidae



Lithobates spectabilis
Foto D. Ortiz Millán



Lithobates zweifeli
Foto F. H. Carmona Torres

REFERENCIAS

- Aanensen, D. 2016. Bd Maps. The Global Bd mapping Group. Imperial College. London. Consultado en: <http://www.bd-maps.net>
- Alford, R.A. y Richard, S.J. (1999). Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 30, 133-165.
- Alford, R.A. (2010). Declines and the global status of amphibians. En Sparling, D (Ed.). *Ecotoxicology of amphibians and reptiles* (13-45). United States of America: Society of Environmental Toxicology and Chemistry.
- Annis, S.L., Dastoor, F.P., Ziel, H., Daszak, P. y Longcore, J.E. (2004). A DNA-Based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal Wildlife Disease*, 40(3), 420-428.
- Applied Biosystems. (2010). Prepman Ultra: Sample Preparation Reagent Protocol. Consultado en: https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042136.pdf
- Baena, M.L. y Halffter, G. (2008). Extinción de especies. En Sarukan, J (Ed.), *Capital Natural de México: vol I Conocimiento de la biodiversidad* (263-282, apéndice 10.4b). México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Bancroft, B.B., Han, B., Searle, C. L., Biga, L. M., Olson, D.H., Kats, L.N., Lawler, J.J. y Blaustein, A. R. (2011). Species-level correlates of susceptibility to the pathogenic amphibian fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in the United States. *Biodiversity Conservation* 20: 1911-1920
- Barnett, H.L. y Hunter B. B. (1972). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Burgess Publishing Company. United States of America. 237pp
- Bentley, P.J. y Yorio, T. (1979). Evaporative water loss in anuran amphibians: a comparative study. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 62A, 1005-1009
- Berger, L., Marantelli, G., Skerrat, L. y Speare, R. (2005 a). Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. *Disease of Aquatic Organism*, 68, 47-50.
- Berger, L., Hyatt, A.D., Speare, R. y Longcore, J.E. (2005 b). Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Disease of Aquatic Organism*, 68, 51-63.
- Berger, L., Speare, R. y Kent, A. (2000). Diagnosis of Chytridiomycosis in amphibians by histologic examination. *Zoos Print Journal*, 15(1), 184-190.
- Bishop, P.J., Angulo, A., Lewis, J.P., Moore, R.D., Rabb, G.B. y García, J. (2012). The amphibian extinction crisis-What will it take to put the action into the amphibian conservation action plan? [Versión electrónica]. *S.A.P.I.E.N.S. Vol 5(2)*. Recuperado el 29 de septiembre de 2013, de <http://www.sapiens.revues.org/1406>
- Blaustein, A.R., Wake, D.B. y Sousa, W.P. (1994). Amphibian Declines: Judging Stability, Persistence, and Susceptibility of Populations to Local and Global Extinctions. *Conservation Biology*, 8(1), 60-71

Blaustein, A.R., Wake, D.B. y Sousa, W.P. (2009). Amphibian Declines: Judging Stability, Persistence, and Susceptibility of Populations to Local and Global Extinctions. *Conservation Biology*, 8(1), 60-71

Blaustein, A.R., Han, B.A., Relyea, R.A., Johnson, P.T.J., Buck, J.C., Gervasi, S.S. y Kats, L.B. (2011). The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1223, 108-119

Bletz, M.C., Rebollar, E.A., Harris, R.N. (2015). Differential efficiency among DNA extraction methods influences detection of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 113(1): 1-8

Boyás, J.C. (28 al 30 de noviembre, 1994). *Aspectos generales sobre la Selva Baja Caducifolia*. En: Memorias I Reunión Nacional sobre Selva Baja Caducifolia. Reunión llevada a cabo en Cuernavaca, Morelos.

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. *Disease of Aquatic Organism*, 60, 114-148

Buck, J.L., Truong, L. y Blaustein, A.R. (2011). Predation by zooplankton on *Batrachochytrium dendrobatidis*: biological control of the deadly amphibian chytrid fungus?. *Biodiversity Conservation*, 20, 2549-3553

Caldwell, J. (1986). A Description of the Tadpole of *Hyla smithii* with Comments on Tail Coloration. *Copeia* 4: 1004-1006

Cabrera, R. (2012). Evaluación de la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis*, en poblaciones de anfibios en área cero extinción (aze) en Oaxaca y Chiapas, México. *LACANDONIA*, 6(1), 7-16

Canseco, L. y Gutiérrez, M.G. (2010). Anfibios y Reptiles del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. México: Comisión Nacional para el Uso y Conocimiento de la Biodiversidad.

Castro, R., Vergara, G., Bustos, M. y Mena, W. (2006). Diversidad y distribución de anfibios del Estado de Morelos, México. *Acta zoológica mexicana nueva serie*, 22(1), 103-117

Cheng, T.L., Rovito, S.M., Wake, D.B. y Vredenburg, V.T. (2011). Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 9502-9507

Cheville, N. (1980). *Patología Celular*. Acribia. España. 62-65 pp.

Collins, J.P. y Storfer, A. (2003). Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity Distributions*, 9, 89-98

Colwell, R. K. (2006). EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. [ON LINE]. Versión 8.0. Disponible en: <http://purl.oclc.org/estimates>

Conlon, J. (2010). The contribution of skin antimicrobial peptides to the system of innate immunity in anuras. *Cell Tissue Res* (Springer) Consultado en https://www.researchgate.net/profile/John_Conlon2/publication/45272703_Conlon_JM_The_contribution_of_skin_antimicrobial_peptides_to_the_system_of_innate_immunity_in_anurans_Cell_Tissue_Res_343_201-212/links/56574cc508ae4988a7b53beb.pdf

Cortés, J. (2014). *Prevalencia del Hongo Quitridio Batrachochytrium dendrobatidis en Zonas Conservadas y Fragmentadas, en Comunidades de Anfibios de la Cuenca Hidrológica de Cuixmala en el Estado de Jalisco, México*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Cushman, S.A. (2006). Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. *Biological Conservation*, 128, 231-240

Daniel, O. (1998). *Subsidios al uso del Índice de Shannon*. En: Anais do I Congreso Latinoamericano IUFRO. Congreso llevado a cabo en Valdivia, Chile.

Daskaz, P., Berger, L., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., Earl, D.E. y Speare, R. (1999). Emerging Infectious Diseases and Amphibian Population Declines. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 5(6), 735-748

Doherty, T.M., Gonwouo, N.L., Hirschfeld, M., Ohst, T., Weldon, C., Perkins, M., Kouete, M.T., Browne, R.K., Loader, S.P., Gower, D.J., Wilkinson, M.W., Röderl, M.O., Penner, J., Barej, M.F., Schmitz, A., Plötner, J. y Cunningham, A. (2013). *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians of Cameroon, including first records for caecilians. *Disease of Aquatic Organism*, 102, 187-194

Duellman, W.E. (1999). Global Distribution of Amphibians: Patterns, Conservation, and Future Challenges. En: Duellman, W.E. (Ed.). *Patterns of distribution of amphibians: a global perspective* (1-30). United States of America: The Johns Hopkins University Press.

Duellman, W.E. y Trueb, L. (1986). Cap. 8 Relationships with the Environment. En *Biology of Animals* (pp. 197-227). Estados Unidos de Norteamérica: McGraw-Hill

Elias, H. y Shapiro, J. (1957). Histology of the Skin of Some Toads and Frogs. *American Museum Novitates*, 1819, 1-27

Escalante, T. (2003). ¿Cuántas especies hay?: Los estimadores no paramétricos de Chao. *Elementos*, 52, 53-56

Espinosa, D. y Ocegueda, S. (2009). El conocimiento biogeográfico de las especies y su regionalización natural. En Sarukhán, J. (Ed.). *Capital natural de México. Síntesis: conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad* (33-65). México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

Familiar, 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. Universidad Nacional Autónoma de México.

Familiar, M. (2010). *Influencia de los factores ambientales y geográficos en la incidencia y prevalencia de la quitridiomycosis en anfibios de las zonas montañosas de Guerrero, México*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ecología.

Fox, H. (1986). Cap. 5 Epidermis. En: Bereiter, A.G., Matolsty, A.G., Richards. (Ed.). *Biology of the Integument: 2 Vertebrates* (pp. 75-110). Berlin, Alemania: Springer-Verlang

Frías, P., Vredenburg, V.T., Familiar, M., Longcore, J.E., González, E., Santos, G., Zambrano, L. y Parra, G. (2008). Chytridiomycosis survey in wild and captive Mexican amphibians. *EcoHealth*, 5, 18-26

Frost, D. (2016). Amphibian Species of the World 6.0, an Online Reference. The American Museum of Natural History. Disponible en: <http://www.Research.amnh.org/vz/herpetology/amphibian/>

- Galindo, M., Hernandez, D., Cheng, T., Vredenburg, V., Parra, G. 2014. Presence and Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in commercial amphibians in Mexico city. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 45(4): 830–835
- García, U., Canseco, L., Gutiérrez, G. y Trujano, M. (2009). Actualización del conocimiento de la fauna herpetológica en el estado de Puebla. *Boletín de la Sociedad Herpetológica Mexicana*, 17(1), 12-36
- García, U., Canseco, L., Maceda, J., Aguilar, J., Hernández, C., Gutiérrez, M. y Melgarejo, E. (2006). Análisis de la distribución de la herpetofauna en la Región Mixteca de Puebla, México. *Boletín de la Sociedad Herpetológica Mexicana*, 3, 152-169
- Garner, T. (2013) *Batrachochytrium dendrobatidis* Infection and Lethal Chytridiomycosis in Caecilian Amphibians (Gymnophiona). *EcoHealth*, 10(2), 173-183
- Gardner, T., Perkins, M.W., Govindarajulu, P., Seglie, D., Walker, S., Cunningham. y Fisher, M. (2006). The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biology letters*, 2, 455-459
- Gardner, T. (2001). Declining amphibian populations: a global phenomena in conservation biology. *Animal Biodiversity and Conservation*, 24(2), 25-44
- Gondola, R. y Hendry, C.R. (2013). No detection of the chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in a multi-species survey of Ireland's native amphibians. *Herpetological Journal* 23: 233-236
- Goldberg, C. y Schwalbe, C. (2004). Habitat use and Spatial Structure of a Barking Frog (*Eleutherodactylus augusti*) Population in Southeastern Arizona. *Journal of Herpetology*, 38(3), 305-312
- González, A., Hernández, O., Cervantes, M. y Reynoso, V.H. (2014). First record of the Mountain Caecilian *Gymnopsis syntrema* (Amphibia: Gymnophiona: Dermophiidae) in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 645-649
- González, D., Espinosa, G., Rivero, N.E., Trejo, A., Nava, A.D. y Ilizaliturri, C.A. (2013). Persistent Organochlorine Pollutants (POPs) and DNA Damage in Giant Toads (*Rhinella marina*) from an Industrial Area at Coatzacoalcos, Mexico. *Water Air Soil & Pollution*, 2013, 224-1781
- Gower, D.J., Doherty, T., Loader, S., Wilkinson, M., Kouete, M., Tapley, B., Orton, F., Daniel, O., Wynne, F., Flach, E., Müller, H., Menegon, M., Stephen, I., Browen, R., Fisher, M., Cunningham, A., y Green, M.D. (2003). The ecology of extinction: population fluctuation and decline in amphibians. *Biological Conservation*, 111, 331-343
- Gratwicke, B., Evans, M.M., Campbell, E.H., Greathouse, E.H., McShea, W.J., Rotzel, N. y Fleishcer, R.C. (2011). Low Prevalence of *Batrachochytrium dedrobatidis* Detected in Appalachian Salamanders from Warren County, Virginia, USA. *Herpetological Review*, 42(2): 217-219
- Hale, S.F., Rosen, P.C., Jarchow, J.L. y Bradley, G.A. (2005). Effects of the Chytrid Fungus on the Tarahumara Frog (*Rana tarahumarae*) in Arizona and Sonora, Mexico. *USDA Forest Service Proceedings, RMRS-P-36*, 407-411
- Hale, S.F. (2001). The Status of the Tarahumara Frog in Sonora Mexico. Report to United States Fish and Wildlife Service, Phoenix, AZ.

Hansgate, A.M., Schloss, P.D., Hay, A.G. y Walker, L.P. (2005). Molecular characterization of fungal community dynamics in the initial stages of composting. *FEMS Microbiology Ecology*, 51, 209-214

Hardy, L.M. y McDiarmid, R.W. (1969). The Amphibians and Reptiles of Sinaloa, México. *University of Kansas Publications, Museum of Natural History*, 18(3), 39-252

Hargis, A., Ginn, P. (2007). The Integument. En: McGaving, M., Donald, M. *Pathology Basis of Veterinary Disease*. Mosby Elsevier. USA. 1107-1195 pp.

Hayes, T.B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haefele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V.P., Marjuoa, Y., Parker, J. y Tsui, M. (2006). Pesticide mixtures, Endocrine disruption, and amphibian declines: Are we underestimating the impact?. *Environmental Health Perspectives*, 114 (1), 40-50

Hill, M.O. (1973). Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology* 54(2): 427-432

Holde, W., Reinert, L., Hanlon, S., Parris, M., Rollins, L. (2015). Development of antimicrobial peptide defenses of southern leopard frogs, *Rana spheriocephala*, against the pathogenic chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Developmental and Comparative Immunology* 48(1):65-75

Hossack, B.R., Adams, M.J., Campbell, E.H., Pearl, C.A., Bettasim J.B., Barichivich, W.J., Lowe, True, K., Ware, J.L. y Corn, P. (2010). Low prevalence of Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in Amphibians of U.S. Headwater Streams. *Journal of Herpetology*, 44(2): 253-260

Hudson, P. Rizzoli, A., Grenfell, B., Heesterbeek, J., Dobson, A. (2002). Ecology of wildlife diseases. Oxford: Oxford University Press 1-63: 119-139p

Huss, M., Huntley, L., Vredenburg, V., Johns, J. y Green, S. (2014). Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in 120 Archived Specimens of *Lithobates catesbeianus* (American Bullfrog) Collected in California, 1924-2007. *EcoHealth*, 10(4), 339-343

Hussain, Q.A. y Pandit, A.K. (2012). Global amphibian declines: A review. *International Journal Biodiversity Conservation*, 4(10), 348-357

Hyatt, A.D., Boyle, D.G., Olsen, V., Boyle, D.B., Berger, L., Obendorf, D., Dalton, A., Kringer, K., Heros, 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*. *Disease of Aquatic Organism*, 73(3), 175-192

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). *Prontuario de Información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos: Jalalpan, Puebla, Clave geoestadística 21087*[En línea]. (2009). [fecha de consulta: 12 de septiembre 2012]. Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/21/21087.pdf>

International Union for Conservation of Nature (IUCN). (2000). Guías para la Prevención de Pérdidas de Diversidad Biológica ocasionadas por especies exóticas invasoras. Recuperado el 5 de febrero del 2013, de http://intranet.iucn.org/webfiles/doc/SSC/SSCwebsite/Policy_statements/Guidelines_for_the_Prevention_of_Biodiversity_Loss_Caused_by_Alien_Invasive_Species_Sp.pdf

International Union for Conservation of Nature (IUCN). (2012). Amphibians: Geographic Patterns. Recuperado el 5 de febrero del 2013, de <http://www.iucnredlist.org/initiatives/amphibians/analysis/geographic-patterns>

International Union for Conservation of Nature (IUCN). (2016). The IUCN Red List of Threatened Species. Consultado el 1 de Agosto del 2016, en: <http://www.iucnredlist.org>

International Union for Conservation of Nature (IUCN). (2016b). Amphibians. Consultado el 1 de Agosto del 2016, en: <http://www.iucnredlist.org/initiatives/amphibians/analysis/major-threats>

Invasive Species Specialist Group (ISSG). (s.f.). *Invasive Species in Mexico*, [fecha de consulta: 6 de mayo 2014]. Base de datos disponibles en Global Invasive Species Database. <http://www.issg.org/database/species/search.asp?sts=sss&st=sss&fr=1&x=7&y=9&sn=&rn=Mexico&hci=-1&ei=-1&lang=EN>

Johnson, M. y Speare, R. (2003). Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and diseases. *Emerging Infect Diseases* 9 (8): 922-925

Kessing, F., Holt, R.D. y Ostfeld. (2006). Effects of species diversity on disease risk. *Ecology Letters*, 9, 485-498

Kiesecker, J.M. (2011). Global stressor and the global decline of amphibians: tipping the stress immunocompetency axis. *Ecological Research*, 26, 897-908

Kiesecker, J.M., Blaustein, A.R. y Belden, L.K. (2001). Complex causes of amphibian population declines. *Nature*, 410, 681-684

Kilburn, V.L., Ibáñez, R. y Green, D.M. (2011). Reptiles as potential vector and hosts of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Panama. *Disease of Aquatic Organism*, 97(2), 127-134.

Kruger, K.M., Pereoglou, F. y Hero, J.M. (2007). Latitudinal Variation in the Prevalence and Intensity of Chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) Infection in Eastern Australia. *Conservation Biology* 21(5): 1280-1290

Kruger, K.M., Hines, H.B., Hyatt, A.D., Boyle, D.G. y Hero, J.M. (2006). Techniques for detecting chytridiomycosis in wild frogs: comparing histology with real-time Taqman PCR. *Disease of Aquatic Organism*, 71(2), 141-148

Kosh, T. y Summers, K. (2013). Techniques for minimizing the effect of PCR inhibitors in the chytridiomycosis assay. *Molecular Ecology Resources* 13(2):230-236

Lips, K.R., Mendelson, J.R., Muñoz, A., Canseco, L. y Mulcahy, D. (2004) Amphibian population declines in montane southern Mexico: resurveys of historical localities. *Biological Conservation*, 119, 555-564

Lips, K.R., Burrowes, P.A., Mendelson III, J.R. y Parra, G. (2005). Amphibian Declines in Latin America: Widespread Population Declines, Extinctions and Impacts. *Biotropica*, 37(2), 163-165

Longcore, J.E., Pessier, A.P. y Nichols, D.K. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a Chytrid Pathogenic to Amphibians. *Mycologia*, 91(2), 219-227

Longo, A.V., Burrowes, P.A. y Joglar, R.L. (2010). Seasonality of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in direct-developing frogs suggests a mechanism of persistence. *Diseases of Aquatic Organism*, 92(2-3), 253-260

Longo, A.V., Rodríguez, D., Domingos da, S., Toledo, L.F., Mendoza, C., Burrowes, P.A. y Zamudio, K.R. (2013). ITS1 Copy Number Varies among *Batrachochytrium dendrobatidis* Strains: Implications for qPCR Estimates of Infection Intensity from Field-Collected Amphibian Skin Swabs. DOI: 10.1371/journal.pone.0059499

- López, A. (2014). *Dinámica Estacional de la Infección por el Hongo Quitridio Batrachochytrium dendrobatidis en una Población de Salamandras de la Especie Pseudoeurycea leprosa en el Parque Nacional "La Malinche"*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- López, M.C., Mandujano, S. y Yánes, G. (2007). Evaluación poblacional del venado cola blanca en un bosque tropical seco de la mixteca poblana. *Acta Zoológica Mexicana*, 23(3), 1-6
- López, M.C., Yánes, G., López, J.C., López, G., Hernández, C., Pérez, A.M., Martínez, G., Roldan, M.S. y Arias, A. (6 al 9 de junio, 2006). Los servicios ambientales derivados de la protección de la biodiversidad en la UMA Rancho El Salado, Jolalpan, Puebla. En: Academia Nacional de Ciencias Ambientales. X Congreso Internacional y I Nacional de Ciencias Ambientales. Congreso llevado a cabo en Cuernavaca, Morelos.
- Luja, V.H., Rodríguez, R., Ratzlaff, K., Parra, G. y Ramírez, A. (2012). The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Isolated Populations of the Baja California treefrog *Pseudacris hypochindriaca curta* in Baja California Sur, Mexico. *Southwestern Naturalist*, 57(3), 323-327
- Luja, V.H. y Rodríguez, R. (2010). The invasive bullfrog *Lithobates catesbeianus* in oases of Baja California Sur, Mexico: potential effects in a fragile ecosystem. *Biological Invasions*, 12, 2929-2983
- Luría, R., Canseco, L. y Frías, P. (2011). *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Plectrohyla arborescandens* (Anura: Hylidae) Larvae at a Montane Site in the Sierra Negra, Puebla, México. *Herpetological Review*, 42, 552-554
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J. (2004). Microbiología e Inmunología clínica. En: *Brock Biología de los Microorganismos* (787-837). Madrid, España: Pearson Prentice Hall
- Martel, A., Spitzen-Van der Sluijs, A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M.C., Woeltjes, A., Bosman, W., Chiers, K., Bossuyt, F. y Pasmans, F. (2013). *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 110, 15325-15329
- McCallum, M.L. (2007). Amphibian decline or extinction? Current decline dwarfs background extinction rate. *Journal of Herpetology*, 41(3), 483-491
- McDiarmid, R.W. y Foster, M.S. (1987). Cocoon Formation in Another Hylid Frog, *Smilisca baudinii*. *Journal of Herpetology*, 21(4), 351-355
- Medina, E.M., Restrepo, S., Flechas, S.V., Berger, L. y Stajich, J.E. (2013). Complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed with genome resequencing data. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 110(23), 9385-9390
- Medina, G. (2010). Ecología de enfermedades infecciosas emergentes y conservación de especies silvestres. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42(1), 11-24
- Medina, S., Espinoza, E. (1995). Determinación de sustancias antibacterianas en la secreción de piel de *Bufo marinus*. *Ciencia* 3(3):193-200
- Mendelson III, J.R., Mulcahy, D.G., Williams, T.S. y Sites, J.W. (2011). A phylogeny and evolutionary natural history of Mesoamerican toads (Anura: Bufonidae: *Incilius*) based on morphology, life history, and molecular data. *Zootaxa*, 3138, 1-34
- Mendoza, C., Burrowes, P. y Parra, G. (2015). La quitridiomycosis en los anfibios de México: una revisión. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86, 238-248

- Mendoza, L.J., Lara, R. y Castro, R. (2008). Dieta de *Lithobates zweifeli* Hills, Frost y Wedd 1984 (Anura: Ranidae) en un río estacional del centro de México. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, 24(1), 169-197
- Millard, P. (1990). *Essential Histopathology*. Blackwell Scientific Publication. USA. 1-23 pp.
- Mörne, T. y Beasley, V. Monitoring for Diseases in Wildlife Populations. En: Norrgen, L., y Levensgood, J. (2012). *Ecology and Animal Health*. The Baltic University Programme. Suecia. 186-191 pp
- Muñoz, L.A. (2010). *Riqueza, Diversidad y Estatus de los anfibios amenazados en el sureste de México; una evaluación para determinar las posibles causas de la declinación en sus poblaciones*. San Cristóbal de las Casas, Chiapas: Colegio de la Frontera Sur
- Murray, K.A., Skerrat, L.F., Speare, R. y McCallum, H. (2009). Impact and Dynamics of Disease in Species Threatened by the Amphibian Chytrid Fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology*, 23(5): 1242-1252
- Murrieta, R., Parra, G., González, A., López, F. y Vredenburg, V.T. (2014). Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians inhabiting cloud forest and coffee agroecosystems in central Veracruz, Mexico. *European Journal of Wildlife Research*, 60, 431-439
- Oliver, T., Morecroft, M. 2014. Interactions between climate change and land use change on biodiversity: attribution problems, risks, and opportunities. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change* 5(3): 317-335
- Olsen, V., Hyatt, A., Boyle, D. y Mendez, D. (2004). Co-localization of *Batrachochytrium dendrobatidis* in frogs. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61:85-88
- Ortiz, D. y Carmona, F.H. (4 al 8 de noviembre, 2013). Evaluación de la comunidad de anfibios de la Unidad de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre "Rancho El Salado", Jolalpan, Puebla (2010-2012). En: Universidad Autónoma de Aguascalientes. XXI Congreso de Zoología. Congreso llevado a cabo en Aguascalientes, Aguascalientes.
- Padgett, G.E. y Hopkins, R.L. (2009). *Batrachochytrium dendrobatidis*, a novel pathogen approaching endemism in central California. *Diseases of Aquatic Organisms*, 83(1), 1-9
- Parra, G., Flores, O.A., Mendoza, C. (2014). Biodiversidad de anfibios en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 460-466
- Pechmann, J.H.K. y Wilbur, H.M. (1994). Declining amphibian populations in perspective: natural fluctuation and human impacts. *Herpetologica*, 50(1), 65-84
- Pérez, E., Saldaña de la Riva, L. y Uribe, Z. (2000). A check list of the reptiles and amphibians of Guerrero, México. *Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México Serie de Zoología*, 71(1), 21-40
- Perpiñán, D., Trupkiewicz, J.G., Armbrust, A.L., Geiser, D.M., Armstrong, S., Garner, M.M. y Armstrong, D.L. (2010). Dermatitis in captive Wyoming toads (*Bufo baxteri*) associated with *Fusarium* spp. *Journal of Wildlife Disease*, 46(4), 1185-1195
- Phillips, B.L. y Puschendorf, R. (2013). Do pathogens become more virulent as they spread? Evidence from the amphibian declines in Central America. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science*. Recuperado el 29 de diciembre de 2013, de <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.1290>

Piotrowski, J.S., Annis, S.L. y Longcore, J.E. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, 96(1), 9-15

Pla, L. (2006). Biodiversidad: inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31(8), 583-590

Pounds, J. Fogden, M., Campbell, J. 1999. Biological response to climate change on a tropical mountain. *Nature* 398: 611-615

Pounds, J., Bustamante, M., Coloma, J., Consuegra, J., Fogden, M., Foster, P. La Marca, E. Masters, K., Merino, A., Puschendorf, R., Ron, S., Sanchez, G., Still, C., Young, B. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 439: doi:10.1038/nature04246

Puschendorf, R. y Bolaños, F. (2006). Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* infections in *Eleutherodactylus fitzingeri*: effects of stains and body parts used. *Journal of Wildlife Diseases*, 42, 301-306

Quintero, G. y Vázquez, J. (2009). *Historia natural de una rana muy mexicana*. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes. México. 169 pp.

Rachowicz, L.J., Hero, J.M., Alford, R.A., Taylor, J.W., Morgan, J.A.T., Vredenburg, V.T., Collins, J.P. y Briggs, C. (2005). The Novel and Endemic Pathogen Hypotheses: Competing Explanations for the Origin of Emerging Infectious Diseases of Wildlife. *Conservation Biology*, 19(5), 1441-1448

Reading, C.J. (2007). Linking global warming to amphibian declines through its effects on female body condition and survivorship. *Oecologia*, 151, 125-131

Riddell, R.W. (1950). Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. *Mycologia*, 42(2), 265-270

Rollins, L. (2009). The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1788(8): 1593-1599

Rollins, L. 2016. Amphibian immunity-stress, disease, and climate change. *Developmental and Comparative Immunology*. 2016, doi:10.1016/j.dci.2016.07.002

Romero de Pérez, G. y Ruiz, P.M. (1996). Histología, Histoquímica y Estructura fina de la glándula mentoniana de dos especies de *Hyla* (Grupo *Bogotensis*) y del antebrazo de *Phrynopus adenobranchius*. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*, 20(78), 575-584

Ron, S. (2005). Predicting the Distribution of the Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica* 37(2): 209-221

Rosenblum, E.B., Fisher, M.C., James, T.Y., Stajich, J.E., Longcore, J.E., Gentry, L.R. y Poorten, T.J. (2009). A molecular perspective: biology of the emerging pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organism*, 92(2-3), 131-147

Rosenblum, E.B., James, T.Y., Zamudio, K.R., Poorten, T.J., Ilut, D., Rodriguez, D., Eastman, J.M., Richards, K., Joneson, S., Jenkison, T.S., Longcore, J.E., Parra, G., Toledo, L.F., Arellano, M.L., Medina, E.M., Restrepo, S., Flechas, S.V. Berger, L. y Stajich, J.E. (2013). Complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed with genome resequencing data. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 110 (23), 207-2015

Runnells, R., Monluz, W., Monluz, A. (1965). *Principles of Veterinary Pathology*. The Iowa State University Press, USA. 103-295 pp

Sánchez, B., Carrillo, H., Morón, M.A. y Rivas, S.P. (2012). Especies de Scarabaidae e Hybosoridae (Coleptera: Scarabaeoidea) que habitan en la comunidad del "Rancho El Salado", Jolalpan, Puebla, México. *Dugesiana*, 18(2), 207-215

Searle, C.L., Biga, L.M., Spatafora, J.W. y Blaustein, A. (2011). A dilution effect in the emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Science*, 108(39), 16322-16326

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, México, 2010.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2002, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, México, 2002.

Skerrat, L.F., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., McDonal, K.R., Phillott, A.D., Hines, H.B. y Kenyon, N. (2007). Spread of Chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of Frogs. *Ecohealth*, 4, 125-134

Smith, K. (2007). Use of quantitative PCR assay for amphibian chytrid detection: comment on Kriger et al. (2006a, b). *Diseases of Aquatic Organism*, 73, 253-255

Stice, M.J. y Briggs, C.J. (2010). Immunization is ineffective at preventing infection and mortality due to the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(1), 70-77.

Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S., Fischmas, D.L. y Waller, R.W. (2004). Status and Trend of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science*, 306, 1783-1786

The Herpetological Society of Ireland. *Progress in the fight against Frog-killing chytrid fungus*. Recuperado el 11 de febrero del 2015 de <http://thehsi.org/2015/01/06/progress-in-the-fight-against-frog-killing-chytrid-fungus/>

Toledo, R. C. y Jared, C. (1995). Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 111A(1), 1-29

Toledo, R.C. y Jared, C. (1993). Cutaneous adaptation to water balance in amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 105A, 593-608

University of Alabama. *Rhizophydiales Zoospore Types*. Recuperado el 15 de septiembre del 2014 de <http://bama.ua.edu/~nsfpeet/rhizophyidium.zoospore.htm>.

Van Rooij, P., Martel, A., Nerz, J., Voitel, S., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F. y Pasmans, F. (2011). Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Mexican Bolitoglossine Salamanders Using an Optimal Sampling Protocol. *EcoHealth*, 8, 237-243

Van Sluys, M., Kriger, K.M., Philliot, A.D., Campbel, R., Skerratt, L.F. y Hero, J.M. (2008) Storage of samples at high temperatures reduces the amount of amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* DNA detectable by PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 81: 93-97

Velo, G., Rodríguez, D., Savage, A.E., Parra, G., Lips, K.R. y Zamudio, K.R. (2012). Amphibian-killing fungus loses genetic diversity as it spreads across the New World. *Biological Conservation*, 146, 213-218

Vial, J.L. y Saylor, L. (1993). The Status of Amphibian Populations a Compilation and Analysis. *Declining Amphibian Populations Task Force, IUCN/SSC, Working document 1*, 1-98

Voyles, J., Rosenblum, E.B. y Berger, L. (2011). Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity. *Microbes and Infection*, 13, 25-32

Voyles, J., Richards, K., Cashins, S.D., Rosenblum, E.B., Hyatt, A.D., Berger, L. y Skerratt, L.F. (2010). *Batrachochytrium dendrobatidis*: requirement for further isolate collection and archiving. *Diseases of Aquatic Organism*, 92(2), 109-112

Voyles, J., Berger, L., Young, S., Speare, R., Webb, R., Warner, J., Rudd, D., Campbell, R. y Skerratt, L.F. (2007). Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. *Diseases of Aquatic Organism*, 77(2), 113-118

Voyles, J., Young, Berger, L., Campbell, C., Voyles, W.F., Dinudom, A., Cook, D., Webb, R., Alford, R.A., Skerratt, L.F. y Speare, R. (2009). Pathogenesis of Chytridiomycosis, a Cause of Catastrophic Amphibian Declines. *Science*, 326(5952), 582-585

Wake, D. y Vredendurg. (2008). Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 105(1), 11466-11473

Weldon, C., du Preez, H.D., Hyatt, A.D., Muller, R. y Speare, R. (2004). Origin of the Amphibian Chytrid Fungus. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12): 2100-2105

Wells, K.D. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press. Estados Unidos de America.

Woodhams, D., Ardipradja, K., Alford, R., Marantelli, G., Reinert, L., Rollins, L. (2007). Resistance to chytridiomycosis varies among amphibians species and is correlated with skin peptide defenses. *Animal Conservation* 1-9

Woodhams, D.C., Bosch, J., Briggs, C.J., Cashins, S., Davis, L.R., Lauer, A., Muths, E., Puschendorf, R., Schmidt, B.R., Sheafor, B. y Voyles, J. (2011). Mitigating amphibians disease: strategies to maintain wild populations and control chytridiomycosis. *Frontiers in Zoology*, 8(8), 1-23

Woodhams, D., Voyles, J., Lips, K., Carey, C., Rollins, L. (2006). Predicted disease susceptibility in an Panamanian amphibian assemblage based on skin peptide defenses. *Journal of Wildlife Diseases* 42(2): 207-218

Woolrich, G. A., Oliver, L. y Lemos, J. A. (2005). *Anfibios y reptiles del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla*. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 54 pp

World Organization for Animal Health (OIE). Infection with *Batrachochytrium dendrobatidis*. Manual of Diagnostic test for aquatic animals. (2012). USA. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.1.01_INF_BATRACHOCHYTRIUM.pdf

World Organization for Animal Health (OIE). (2011). *Infection with Batrachochytrium dendrobatidis*. Recuperado el 25 de septiembre del 2013

dehttp://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.1.01_INF_BATRACHO
CHYRIUM.pdf

Young, B., Lips, K., Reaser, J.K., Ibáñez, R., Salas, A.W., Cedeño, J.R., Coloma, L.A., Ron, S., La
Marca, E., Meyer, R.J., Muñoz, A., Bolaños, F., Chaves, G. y Romo, D. (2001). Population Declines
and Priorities for Amphibian Conservation in Latin America. *Conservation Biology*, 5(5), 1213-1223