



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
ECOLOGÍA

**Tolerancia y respuesta a la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*
en *Pseudoeurycea leprosa***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CINTHYA MENDOZA ALMERALLA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. GABRIELA PARRA OLEA

INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ JAIME ZUÑIGA VEGA

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 25 de mayo de 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna MENDOZA ALMERALLA CINTHYA con número de cuenta 98228120 con la tesis titulada: "Tolerancia y respuesta a la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Pseudoeurycea leprosa*", realizada bajo la dirección de la DRA. GABRIELA PARRA OLEA:

Presidente:	DR. VÍCTOR HUGO REYNOSO ROSALES
Vocal:	DR. GERARDO SUZÁN AZPIRI
Secretario:	DR. JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO
Suplente:	DR. AURELIO RAMÍREZ BAUTISTA
Suplente	DR. EDUARDO OCTAVIO PINEDA ARREDONDO

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 8 de enero de 2016.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por todas las facilidades prestadas durante mis estudios de doctorado y por el apoyo económico para la asistencia a estancias internacionales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca con número 205284/202580 (CVU/becario) otorgada para la realización de mis estudios de doctorado.

Al proyecto de investigación PAPIIT-UNAM. IN209914 (2014-2016). Biodiversidad y Conservación de los Anfibios de Bosques Mesófilos de Montaña del Sur de México y al proyecto UC-MEXUS CONACyT (CN-13-614).

A mi tutora principal la Dra. Gabriela Parra Olea por sus conocimientos y facilidades otorgadas.

A los miembros de mi comité tutorial los Dres. José Jaime Zuñiga Vega y Joaquín Cifuentes Blanco por su apoyo y consejo durante la elaboración de la tesis.

Agradecimientos a título personal

A mi tutora la Dra. Gabriela Parra Olea ya que: guió la estructura del proyecto, revisó la redacción de todos mis escritos y colaboró con ideas para mejorarlos, consiguió apoyo económico para las salidas de campo y análisis de laboratorio y me inculco trabajar de forma ordenada y detallada.

Al Dr. José Jaime Zuñiga Vega por ser parte de mi comite tutorial y secretario de examen de candidature y por revisar los escritos y el diseño experimental. Sus comentarios fueron necesarios para la culminación de la tesis.

Al Dr. Joaquín Cifuentes Blanco por ser parte de mi comite tutorial y brindar consejos que mejoraron el proyecto.

A todos mis profesores y a los miembros del comite de mi examen de candidatura. Sus comentarios ayudaron a eliminar errores en la elaboración de la tesis.

A David Vallejo Bravo por enseñarme detalladamente la técnica de aislamiento y cultivo de *Bd.* Su enseñanza fue vital para la realización de la tesis.

A la Dra. Patricia Burrowes por enseñarme la técnica de qPCR y por su colaboración en el primer capítulo de tesis.

A todos mis compañeros de búsqueda y colecta de *Pseudoeurycea leprosa*: Papá Paco, Carlitos Cruz Dominguez, Pedro Tenorio, Aldo, Mirna, Rafael y Jorge. Sin su colaboración la tesis no habria sido realizada.

A mi colega Aldo López Velázquez por su apoyo en la colecta y en el mantenimiento de los experimentos.

A Saúl López Alcaide. Nunca olvidaré su compañía y apoyo durante la realización de mi examen escrito de candidatura. Fue un diciembre sin vacaciones. ¡Gracias por los viajes pasados y futuros y por el tiempo que estaras conmigo! Deseo platicar contigo toda la vida.

A la Dra. Lidia Cabrera ya que facilitó los instrumentos para la extracción de ADN.

A las Doctoras Ana Longo y Kelly Zamudio. Sus conocimientos fueron necesarios para realizar el artículo requisito.

A mis amigos Carlos Cruz Dominguez, Liset Serna Navarrete, Asael Najera Carpio, Roberto Sánchez², Hugo Siliceo y Adriana Vargas por su apoyo y compañía en tiempos buenos y malos.

A mis tíos y tías. ¡Es genial ser parte de sus vidas!

Mi mayor agradecimiento para mis padres Estela Almeralla Narvaez y Francisco Mendoza Díaz. Siempre he tenido su apoyo y compañía ¡Son y serán siempre las personas mas importantes!

INDICE

Resumen	1
Abstract.....	2
Introducción general.....	3
Capítulo 1	
Mendoza-Almeralla, C., Burrowes, P., y Parra-Olea, G. (2015). La quitridiomycosis en los anfibios de México: una revisión. <i>Revista Mexicana de Biodiversidad</i> , 86, 238-248.	11
Capítulo 2	
Protocolo modificado para el aislamiento y cultivo del hongo patógeno <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en anfibios mexicanos. Cinthya Mendoza-Almeralla, Joaquín Cifuentes Blanco y Gabriela Parra-Olea.....	22
Capítulo 3	
Longo, A.V., Rodriguez, D., da Silva, Leite D., Toledo, L.F., Mendoza-Almeralla, C., Burrowes, P.A. y Zamudio, K.R. (2013). ITS1 copy number varies among <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> isolates: Implications for qPCR zoospore detection. <i>PLoS ONE</i> 8(3): e59499.....	29
Capítulo 4	
Temperature treatments boost subclinical infections of <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> in a Mexican salamander (<i>Pseudoeurycea leprosa</i>).....	39
Discusión y conclusiones generales.....	60
Consideraciones finales.....	64
Literatura citada.....	70

RESUMEN

La quitridiomycosis es una enfermedad causada por dos especies de hongos quitridiales del género *Batrachochytrium*: *B. dendrobatidis* (*Bd*) y *B. salamandrivorans* (*Bsal*). Esta enfermedad apareció simultáneamente en varias regiones del mundo a partir de 1970 y ha infectado a más de 500 especies de anfibios. En México se confirmó la presencia de *Bd* a partir de la década de los años 70's en poblaciones de salamandras pletodóntidas y a partir de entonces se ha documentado en más de 50 especies de anfibios que habitan diversos ambientes, desde desiertos hasta bosques de pino-encino en todo el país. Debido a lo anterior en este trabajo: a) realizamos una revisión del estado del conocimiento sobre la quitridiomycosis en anfibios mexicanos, b) aislamos y cultivamos la cepa de *Bd* en la población de *Pseudoeurycea leprosa* en el Parque Nacional La Malinche, c) determinamos si la cepa mexicana aislada (*MexMkt*) de *Bd* presenta diferencias genéticas con respecto a otras cepas de otras regiones del mundo, d) evaluamos el efecto de la temperatura y la infección por *Bd* en la supervivencia de *Pseudoeurycea leprosa*. Los resultados obtenidos en campo y laboratorio así como la revisión de la literatura, sugieren que *Bd* habita todo país y hasta ahora se ha detectado en más de 50 especies de anfibios, sin evidencia de que el episodio de cambio climático global contemporáneo promueva su dispersión. En cambio las especies invasoras, por medio de propagación natural o por el comercio internacional, sí pueden ocasionar brotes y dispersión de la enfermedad. Por otra parte, modificamos un protocolo ampliamente utilizado para aislar y cultivar *Bd* a partir de cortes de piel de individuos de la población de *Pseudoeurycea leprosa* del Parque Nacional La Malinche y de individuos de *Hyla eximia* obtenidos de comercio; con lo que se obtuvo la cepa de *Batrachochytrium dendrobatidis* para ambas especies. Además, analizamos la variabilidad en copias de una región del gen ITS1 entre ocho cepas de *Bd* encontradas en Norteamérica, Sur América, el Caribe y Australia. Se determinó que la cepa de México (*Mex Mkt*) presenta diferencias con respecto a la de otras 7 cepas estudiadas, ya que exhibe menor número de copias (10) amplificadas en la región ITS, en comparación con las otras cepas que presentan de 39 a 144 copias. Los resultados de este trabajo indican que se ha presentado una evolución en la talla del genoma de *Bd* ocurriendo inserciones o deleciones que han provocado diferencias en el número de copias del ITS1. Concluyendo que no es posible establecer comparaciones entre regiones geográficas hasta no determinar si se cuenta con la misma cepa del patógeno. Por último, se evaluó el efecto del estrés por temperatura en la prevalencia y grado de infección de *Bd* en *P. leprosa* en el Parque Nacional "La Malinche". Los resultados indican que 7.5% de los individuos estaban infectados con *Bd* al momento de la colecta (nivel de infección 372.8 a 7812 zoosporas equivalentes). Luego de exponer las salamandras a los tratamientos de temperatura, se presentaron 33 casos nuevos de infección, lo cual indica que las salamandras persisten en la naturaleza con infecciones subclínicas. El tratamiento de 20 °C produjo el mayor grado de infección (41,390 equivalentes de zoosporas), mientras que en el tratamiento de 23 °C se presentó una mayor prevalencia de la infección. Los análisis de supervivencia indicaron que la temperatura, y no la infección por *Bd*, es el factor que más contribuye a la mortalidad de *P. leprosa*. La mayoría de las salamandras infectadas tuvieron de 1 a 5 episodios de recuperación. Por lo tanto, se generó conocimiento en cuatro diferentes vertientes. 1) El estado de conocimiento de *Batrachochytrium dendrobatidis* en México, 2) la modificación del método utilizado para aislamiento y cultivo de *Bd* en anfibios mexicanos, 3) la confirmación del problema en la obtención de cuantificaciones no equivalentes entre cepas de *Bd*, debido a las diferencias en el número de copias de la región ITS y 4) la detección, cuantificación y dinámica de infección por *Bd* en *Pseudoeurycea leprosa* bajo diferentes condiciones de temperatura. Con respecto a esto, se concluyó que *P. leprosa* sobrevive a la infección causada *Bd* y que puede actuar como hospedera de la enfermedad.

ABSTRACT

Chytridiomycosis is a disease caused by two species of chytrid fungi of the genus *Batrachochytrium*: *B. dendrobatidis* and *B. salamandrivorans*. The disease arose simultaneously in different regions of the world since 1970, and has infected more than 500 species of amphibians. In Mexico, the presence of *Bd* was confirmed at same time in populations of plethodontid salamanders. To date, more than 50 species of amphibians in Mexico have been infected in diverse environments from deserts to Pine-Oak forests and throughout Mexican Republic. Therefore in this work: a) we review the state of knowledge about chytridiomycosis in Mexican amphibians, b) isolate and culture the strain of *Bd* in the population of *Pseudoeurycea leprosa* from La Malinche National Park, c) determine whether the Mexican strain (MexMkt) of *Bd* exhibit genetic differences on regard to other strains of the same species in other regions of the world, d) determine the effect of temperature and *Bd* infection on the survival of the *P. leprosa*. The data of field and laboratory as well as the literature review suggest that *Bd* inhabits the most of the world and has been detected in more than 50 species of amphibians. However, do not have evidence that the episode of contemporary global climate change leads its dispersion. But invasive species through natural propagation or international trade, can cause outbreaks and spread of disease. Furthermore, we modified a protocol widely used to isolate and cultivate *Bd* from skin sections of individuals of *Pseudoeurycea leprosa* from La Malinche National Park and *Hyla eximia* obtained from trade; whereby the strain *Batrachochytrium dendrobatidis* for both species was obtained. Moreover, we analyzed the variability in copies of an ITS1 gene region between eight *Bd* strains from North America, South America, the Caribbean and Australia. It was determined that the Mexico strain (Mex Mkt) has differences with respect the other seven strains studied, because it exhibits fewer copies amplified (10) in the region ITS, compared to the other strains which have from 39 to 144 copies. The results of this study suggest that there has been a evolution in the size of the genome of *Bd* occurring insertions or deletions that cause differences in the number of copies of the ITS1. In conclusion it is not possible to make comparisons between geographic regions unless that we have already established that the same strain of the pathogen. Finally, it was evaluated the effect of thermal stress on the prevalence and degree of *Bd* infection in *P. leprosa* in "La Malinche" National Park. The results shown that 7.5% of individuals were infected with *Bd* at the time of collect them (level infection of 372.8 to 7812 zoospores equivalents). After exposing the salamanders to temperature treatments, 33 new cases of infection were presented, indicating that salamanders persist in nature with subclinical infections. The treatment of 20 °C produced the highest level of infection (41.390 zoospores equivalents), whereas the treatment of 23 °C exhibited a higher prevalence of the infection. The survival analysis indicated that temperature, and not *Bd* infection is the most important factor to mortality of *P. leprosa*. The most of salamanders counter the infection up to five times. Therefore, we provide of information in four different aspects. 1) The state of knowledge of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Mexico, 2) the modifying of the method used for isolation and culture of *Bd* in Mexican amphibians, 3) the confirmation of the problem in obtaining not equivalent quantifications between strains of *Bd* because to differences in the number of copies of the ITS region and 4) the detection, quantification and dynamic of *Bd* infection in *Pseudoeurycea leprosa* under different temperature conditions. In that respect, it was concluded that *P. leprosa* survives to infection of *Bd* and may can act as a host of the disease.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Es un hecho que las poblaciones de especies silvestres están disminuyendo drásticamente en varias regiones del mundo (Medina-Vogel, 2010; Cardinale et al., 2012), lo que se reconoce por varios autores como “la sexta extinción masiva de especies” (Wake y Vredenburg, 2008). Se ha documentado que este fenómeno es ocasionado por diversos factores como la destrucción del hábitat, la contaminación, la sobreexplotación de los recursos naturales, el cambio climático y las enfermedades infecciosas (Dobson y Foufopoulus, 2001; Medina-Vogel, 2010). Sin embargo, en la última década han recobrado importancia las enfermedades infecciosas debido a la aparición de nuevos casos en el mundo (Heide-Jorgensen et al., 1992; Medina-Vogel, 2010).

Las enfermedades infecciosas emergentes son aquellas provocadas por patógenos de nueva aparición o aquellas que han existido pero aumentan su incidencia y patogenicidad y que se expanden rápidamente a otras zonas geográficas (Daszak et al., 2000; Williams et al., 2002; Medina-Vogel, 2010). Desde 1990 se advirtió la aparición simultánea de varias enfermedades en vida silvestre tales como el distemper en focas (Kennedy et al., 2000; Härkönen et al., 2006) y en leones (Roelke-Parker et al., 1996), el síndrome de nariz blanca en murciélagos (Blehert et al., 2009) y la quitridiomycosis en anfibios (Harvell et al., 2002; Daszak et al., 2003). Los científicos han determinado que las causas posibles de estas enfermedades son las alteraciones en el ecosistemas por actividades antropogénicas, los movimientos de patógenos o vectores y el cambio climático (Harvell et al., 2002; Medina-Vogel, 2010). Se ha documentado que muchos de los patógenos y huéspedes están limitados por las temperaturas ambientales por lo que cuando las condiciones climáticas se modifican, ocurre una disrupción parasito- hospedero que altera la virulencia de los patógenos y/o la susceptibilidad de los hospederos (Harvell et al., 2002).

La quitridiomycosis es una enfermedad importante debido a que se localiza en los cinco continentes y ha provocado el declive de más de 200 especies de anfibios en el mundo (Skerratt et al., 2007). Los patógenos que la provocan son los hongos quitridiales *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) y *Batrachochytrium salamandrivorans* (Longcore, 1999; Martel et al., 2013), los cuales se alojan en el interior de las células de la piel de los anfibios ya que el patógeno degrada la queratina (Berger et al., 2005). Hasta el momento se ha registrado la infección en más de 500 especies de anfibios distribuidos en los cinco continentes (Olson et al., 2013).

Científicos de todo el mundo han realizado estudios acerca de su origen, morfología, fisiología, evolución, interacción ecológica del patógeno con especies hospederas y vectoras, forma de transmisión a través de huéspedes, variabilidad genética entre cepas y causas de sus epizootias (Laurance et al., 1996; Berger et al., 1999; Pessier et al., 1999; Daszak et al., 2000; Fellers et al., 2001; Harvell et al.,

2002; Berger et al., 2005; Medina-Vogel, 2010; Farrer et al., 2011). Sin embargo, en varias regiones falta determinar el número de linajes y virulencia de las cepas presentes, la interacción del patógeno con las variables ambientales de las distintas comunidades de anfibios, los mecanismos de dispersión del quitridio y las respuestas de los anfibios para combatir la infección y la enfermedad.

En Latinoamérica se reportó una rápida expansión del patógeno desde el norte de México a Sudamérica en dos décadas, asociada a extinciones masivas de especies y declive de poblaciones (Lips et al., 2008; Rovito et al., 2009; Cheng et al., 2011). En México se confirmó la presencia de *Bd* a partir de la década de los 70's en poblaciones de salamandras pletodóntidas (Cheng et al., 2011) y a partir de entonces se ha documentado un declive masivo de este grupo y otros anfibios en el centro y sur del país (Parra Olea et al., 1999; Rovito et al., 2009). Hasta el momento se ha registrado la infección en 50 especies de anfibios en el país, de los cuales 15 (30%) pertenecen a la familia Plethodontidae (Mendoza-Almeralla et al., 2015). Sin embargo, hasta la fecha todos los estudios de quitridiomycosis en México, se han realizado para detectar presencia/ausencia y con un muestreo de tipo aleatorio. No existe un estudio planeado de manera sistemática para evaluar la quitridiomycosis en una especie o bien en una población y su asociación a parámetros ambientales.

Quitridiomycosis en salamandras de la familia Plethodontidae

El primer registro de *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) en la familia Plethodontidae ocurrió en la especie *Plethodon neomexicanus* en su hábitat natural en Nuevo México (Cummer et al., 2005; Weinstein, 2009). Posteriormente, Lips et al. (2006) encontraron el quitridio en salamandras muertas de las especies *Bolitoglossa schizodactyla*, *Oedipina collaris* y *Oedipina parvipes* en Centroamérica. Rovito et al. (2009) determinaron la presencia del patógeno en otros pletodóntidos de México y Guatemala y sugirieron que éste pudo ocasionar el declive de esta familia en esa región. Cheng et al. (2011) localizaron *Bd* en salamandras preservadas y colectadas desde 1972 en los estados de Hidalgo, Veracruz y Chiapas en México, corroborando que el patógeno pudo ser promotor del declive señalado por Parra et al. (1999) y Rovito et al. (2009); además identificaron que la especie *Pseudoeurycea leprosa* puede presentar niveles de infección de más de 37,000 zoosporas, los cuales son elevados en comparación a otros grupos (Vredenburg et al., 2010; Briggs et al., 2010; Kinney et al., 2011).

Estudios de detección y cuantificación del patógeno en la familia Plethodontidae alrededor del mundo han encontrado que este orden de anfibios puede presentar estrategias que combatan la infección por el patógeno (Harris et al., 2006; Lauer et al., 2007; Lauer et al., 2008). Por ejemplo en siete de las ocho especies del género *Spelomantes* se ha determinado que las secreciones de su piel combaten la infección por *Bd* (Pasmans et al., 2013). De igual manera se ha encontrado que los pletodóntidos

Plethodon cinereus y *Hemidactylum scutatum* presentan bacterias en la piel que inhiben el crecimiento de *Bd* (Harris et al., 2006; Lauer et al., 2007).

Métodos de detección de quitridiomycosis

En un inicio y antes de los avances en el uso de las herramientas moleculares, la detección de *Bd* se realizaba a través de observación de tejido en fresco y por métodos histológicos. Estas técnicas tienen la complejidad de que el reconocimiento de los zoosporangios podría verse dificultado por confusión con otras estructuras, además de requerir de un tiempo considerable para finalizar la técnica. En Annis et al. (2004) publicaron la primera técnica molecular para la detección de *Bd*, la cual consistía en la amplificación del gen rRNA 5.8S y la región ITS mediante la creación de dos cebadores específicos y la reacción en cadena de la polimerasa. Finalmente, en 2004, Boyle y colaboradores (Boyle et al., 2004) desarrollaron una técnica para la detección de *Bd* por la técnica de PCR en tiempo real, la cual en comparación con las demás técnicas es más rápida, eficiente y mucho más precisa, ya que se puede detectar cargas bajas de infección. Esta técnica consiste en la amplificación y cuantificación de las regiones ribosomales 1.8 S e ITS1.

Ahora, después de diez años de implementar el uso de la técnica de PCR en tiempo real se han detectado algunos problemas con dicha técnica. Por ejemplo, que puede subestimar o sobreestimar el grado de infección si no se realiza la detección del patógeno con los estándares obtenidos del cultivo de la cepa a detectar. Sin embargo, a pesar de esto sigue siendo la más eficiente. Los factores que se deben tomar en cuenta para una adecuada detección y cuantificación se abordan en el presente trabajo, y son: el aislamiento y cultivo de *Bd* (capítulo 2), la intensidad de carga detectable por esta técnica (capítulo 4) y el efecto del contenido genómico, en términos de la cantidad de copias del gen amplificado en la comparación de niveles de infección en diferentes muestras o taxones infectados por diferentes cepas del patógeno (capítulo 3).

El presente trabajo, presenta un análisis del nivel de conocimiento de la quitridiomycosis en México y muestra el primer estudio sistemático de la infección por *Bd* en una salamandra endémica de México a través de los siguientes objetivos:

Objetivo general

Determinar el efecto de la temperatura y la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en la supervivencia de *Pseudoeurycea leprosa*.

Objetivos específicos

1. Realizar una revisión del conocimiento de *Batrachochytrium dendrobatidis* en los anfibios de México.
2. Determinar si la población de *Pseudoeurycea leprosa* del Parque Nacional La Malinche presenta infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*.
3. Aislar y cultivar la cepa de *Batrachochytrium dendrobatidis* en la población de *Pseudoeurycea leprosa* del Parque Nacional La Malinche.
4. Determinar si la cepa mexicana de *Batrachochytrium dendrobatidis* (MexMkt) presenta diferencias en el grado de infección cuantificable con respecto a otras cepas de la misma especie.
5. Evaluar los valores de prevalencia de la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* durante el año de colecta en la población de *Pseudoeurycea leprosa* en el Parque Nacional La Malinche.
6. Determinar si existen diferencias significativas en el número de individuos infectados antes y después del tratamiento de estrés en un gradiente de temperatura.
7. Determinar si alguna temperatura en el intervalo de 10 a 25 °C provoca diferencias en el grado de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Pseudoeurycea leprosa*.
8. Determinar el efecto de la temperatura y la infección de *Batrachochytrium dendrobatidis* en la supervivencia de *Pseudoeurycea leprosa*.

Los objetivos de esta tesis se abordan en cuatro capítulos

Capítulo 1. En este capítulo se aborda el primer objetivo particular con el manuscrito aceptado titulado “La quitridiomycosis en los anfibios de México: una revisión” en el que se incluye la historia de aparición de la enfermedad, la descripción del hongo que la origina, causas y vías de dispersión. También los requerimientos para su crecimiento y las respuestas fisiológicas y conductuales que han presentado los anfibios para el combate de la infección. Estos tópicos fueron necesarios para determinar y comparar el nivel de conocimiento en México. Además, se analizaron las causas de los brotes epidemiológicos y los medios de dispersión del patógeno en el país. En el artículo se discute si la aparición de los brotes epidemiológicos de la enfermedad en salamandras pletodóntidas podría haber sido provocada por el cambio climático ocurrido a partir de 1970. ó si la especie invasora, el anuro *Lithobates catesbeiana* pudo ser un factor de dispersión de la enfermedad en el país. También se confirma que durante la propagación del patógeno algunos grupos de anuros y caudados (pletodóntidos) que se distribuyen en el sur del país han presentado un declive generalizado por esta causa. Aunado a esto se cuantifican las especies infectadas en el país y se indica su estado de conservación.

Capítulo 2. En este capítulo se presenta el manuscrito preparado para su publicación como nota científica titulada “Protocolo modificado para el aislamiento y cultivo del hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios mexicanos”. En este escrito se describen los métodos para obtener la cepa de *Batrachochytrium dendrobatidis* de anfibios mexicanos, específicamente para las salamandras de la familia Plethodontidae. Este capítulo es resultado del procedimiento realizado para para cumplir el tercer objetivo. Además el aislamiento y cultivo de la cepa mexicana de *Batrachochytrium dendrobatidis* fue necesario para realizar el estudio de las diferencias genéticas de esta cepa con respecto de otras; lo cual puede consultarse en el capítulo tres.

Capítulo 3. Se presenta el artículo publicado: Longo, A.V., D. Rodriguez, D. da Silva Leite, L.F. Toledo, C. Mendoza-Almeralla, P.A. Burrowes y K.R. Zamudio. 2013. ITS1 copy number varies among *Batrachochytrium dendrobatidis* isolates: Implications for qPCR zoospore detection. PLoS ONE 8(3): e59499. En este artículo se muestran las diferencias genéticas en cuanto al número de copias amplificadas de la región ITS 1 del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* de ocho distintas cepas de América del Norte, América del Sur, el Caribe y Australia. Este capítulo abordó el objetivo particular número cuatro.

Capítulo 4. En el capítulo cuatro se presenta el manuscrito titulado “Respuesta a la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Pseudoeurycea leprosa* bajo estrés de temperatura” en el que se aborda el objetivo general y los objetivos particulares del dos al ocho correspondientes a la dinámica de infección de *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Pseudoeurycea leprosa* bajo diferentes temperaturas.

Literatura citada

Annis S. L., F. P. Dastoor, H. Ziel, P. Daszak, J. E. Longcore. 2004. A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases*, 40(3): 420-428.

Berger, L., R. Speare y A. D. Hyatt. 1999. Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. In *Declines and disappearances of Australian frogs*, A. Campbell (ed.). Environment Australia, Canberra. p. 23-33.

Berger, L., A. Hyatt, R. Speare, y J. Longcore. 2005. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of aquatic organisms*, 68: 51-63.

Blehert, D.S., J.M. Lorch, A.E. Ballmann, P.M. Cryan y C.U. Meteyer. 2011. Bat white-nose syndrome in North America. *Microbe*, 6: 267-273.

Boyle, D. G., V. Olsen, J. A. T. Morgan y A. D. Hyatt. 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60: 141-148.

Briggs, C.J., R.A. Knapp y V.T. Vredenburg. 2010. Enzootic and epizootic dynamics of the chytrid fungal pathogen of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 21(107): 9695-9700.

Cardinale, B. J., J. E. Duffy, A. Gonzalez, D. U. Hooper, C. Perrings, P. Venail, A. Narwani, G. M. Mace, D. Tilman, D. A. Wardle, A. P. Kinzig, G. C. Daily, M. Loreau, J. B. Grace, A. Larigauderie, D. Srivastava y S. Naeem. 2012. Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature*, 486:59-67.

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

Cummer, M. R., D. E. Green y E. M. O'Neill. 2005. Aquatic chytrid pathogen detected in terrestrial plethodontid salamander. *Herpetological Review*, 36: 248–249.

Daszak, P., A. A. Cunningham y A. D. Hyatt. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife—threats to biodiversity and human health. *Science*, 287:443-449.

Daszak, P, A.A. Cunningham y A.D. Hyatt. 2003. Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and distributions*, 9: 141-150.

Dobson, A. P. y J. Foufopoulos. 2001. Emerging infectious pathogens in wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London-B*, 356: 1001-1012.

Farrer, R. A., L. A. Weinert, J. Bielby, T. W. J. Garner, F. Balloux, F. Clare, J. Bosch, A. A. Cunningham, C. Weldon, L. H. Du Preez, L. Anderson, S. L. Kosakovsky-Pond, R. Shahar-Golan, D. A. Henk y M. C. Fisher. 2011. Multiple emergences of genetically diverse amphibian infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108:18732-18736.

Fellers, G. M., D. E. Green y J. E. Longcore. 2001. Oral chytridiomycosis in the mountain yellow-legged frog (*Rana muscosa*). *Copeia*, 4:945-953.

Härkönen T., R. Dietz, P. Reijnders, J. Teilmann, K. Harding, K. Hall, S. Brasseur, U. Siebert, S.J. Goodman, P.D. Jepson, T. Dau-Rasmussen y P. Thompson. 2006. A review of the 1988 and 2002 phocine distemper virus epidemics in European harbour seals. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68: 115-130.

Harris, R. N., T. Y. James, A. Lauer, M. A. Simon y A. Patel. 2006. Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. *EcoHealth*, 3:53-56.

Harvell, C.D., C.E. Mitchell, J.R. Ward, S. Altizer, A.P. Dobson, R.S. Ostfeld y M.D. Samuel. 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science*, 296: 2158-2162.

Heide-Jorgensen, M. P., T. Harkonen, R. Dietz y P. M. Thompson. 1992: Retrospective of the 1988 European seal epizootic. *Diseases of Aquatic Organisms*, 13: 37-62.

Kennedy. S., T. Kuiken, P.D. Jepson, R. Deaville, M. Forsyth, T. Barrett, M.W. Van de Bildt,

A.D. Osterhaus, T. Eybatov, C. Duck, A. Kydyrmanov, I. Mitrofanov y S. Wilson. 2000. Mass die-off of Caspian seals caused by canine distemper virus. *Emerging Infectious Diseases*, 6: 637–639.

Kinney, V.C., J.L. Heemeyer, A.P. Pessier y M.J. Lannoo. 2011. Seasonal pattern of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and mortality in *Lithobates areolatus*: affirmation of Vredenburg's "10,000 Zoospore Rule". *PLoS ONE*, 6(3): e16708.

Lauer, A., M. A. Simon, J. L. Banning, E. André, K. Duncan y R. N. Harris. 2007. Common cutaneous bacteria from the eastern red-backed salamander can inhibit pathogenic fungi. *Copeia*, 3:630-640.

Lauer, A., M. A. Simon, J. L. Banning, B.A. Lam y R.N. Harris. 2008. Diversity of cutaneous bacteria with antifungal activity isolated from female four-toed salamanders. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 2:145-57.

Laurance, W. F., K. R. McDonald y R. Speare. 1996. Epidemic disease and the catastrophic decline of Australian rain forest frogs. *Conservation Biology*, 10:406-413.

Lips, K. R., F. Brem, R. Brenes, J. D. Reeve, R. A. Alford, J. Voyles, C. Carey, L. Livo, A. P. Pessier y J. P. Collins. 2006. Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 3165–3170.

Lips, K.R., J. Diffendorfer, J.R. Mendelson III y M.W. Sears. 2008. Riding the wave: Reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *Plos Biology*, 6: 441- 454.

Longcore, J. E., A. P. Pessier y D. K. Nichols. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91:219-227.

Martel, A., S. A. Spitzen-Van der Sluijs, M. Blooi, W. Bert, R. Ducatelle, M. C. Fisher, A. Woeltjes, W. Bosman, K. Chiers, F. Bossuyt y F. Pasmans. 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110:15325-15329.

Medina-Vogel, G. 2010. Ecología de enfermedades infecciosas emergentes y conservación de especies silvestres. *Archivos de medicina veterinaria*, 42:11-24.

Mendoza-Almeralla, C., P. Burrowes y G. Parra-Olea. 2015. La quitridiomycosis en los anfibios de México: una revisión. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86, 238–248.

Olson, D. H., D. M. Aanensen, K. L. Ronnenberg, C. I. Powell, S. F. Walker, J. Bielby, T. W. J. Garner, G. Weaver, the *Bd* mapping group y M. C. Fisher. 2013. Mapping the global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the amphibian chytrid fungus. *PloS one* 8, e56802. doi:10.1371/journal.pone.0056802.

Parra-Olea, G., M. García-Paris y D. B. Wake. 1999. Status of some populations of Mexican salamanders (Amphibia: Plethodontidae). *Revista de Biología Tropical*, 47: 217-223.

Pasmans, F., P. Van Rooij, M. Blooi, G. Tessa, S. Bogaerts, T.W. Garner, M.Fisher, B.R. Schmidt, T.Woeltjes, W. Beukema, F. Oneto y D. Ottonello. 2013. Resistance to Chytridiomycosis in European Plethodontid Salamanders of the Genus *Speleomantes*. PLoS ONE, 8(5): e63639.

Pessier, A. P., D. K. Nichols, J. E. Longcore y M. S. Fuller. 1999. Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and white's tree frogs (*Litoria caerulea*). Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 11:194-199.

Roelke-Parker, M.E., L. Munson, C. Packer, R. Kock, S. Cleaveland, M. Carpenter, S.J. O'Brien, A. Pospischil, R. Hofmann-Lehmann, H. Lutz, G.L. Mwamengele, M.N. Mgasa, G.A. Machange, B.A. Summers y M.J. Appel. 1996. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). Nature, 379: 441–445.

Rovito, S. M., G. Parra-Olea, C.R. Vásquez-Almazán, T. J. Papenfuss y D. B. Wake. 2009. Dramatic declines in neotropical salamander populations are an important part of the global amphibian crisis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106: 3231-3236.

Skerratt, L., L. Berger, R. Speare, S. Cashins, K. McDonald, A. Phillott, H. Hines y N. Kenyon. 2007. Spread of Chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. EcoHealth, 4: 125-134.

Vredenburg, V.T., R.A. Kannap, T.S. Tustall y C.J. Briggs. 2010. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. Proceedings of the National Academy of Sciences, 21(107): 9689-9494.

Wake, D. B y V. T. Vredenburg. 2008. Are we in midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105:11466-11473.

Weinstein, S.B. 2009. An aquatic disease on a terrestrial salamander: individual and population-level effects of the amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, on *Batrachoseps attenuates* (Plethodontidae). Copeia, 2009:653.660.

Williams, E.S., T. Yuill, Artois, M. Fischer y S.A. Haigh. 2002. Emerging infectious diseases in wildlife. In: Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties, 21 (1): 139-157.



Artículo de revisión

La quitridiomycosis en los anfibios de México: una revisión

*Chytridiomycosis in amphibians from Mexico: a revision*Cintha Mendoza-Almeralla^a, Patricia Burrowes^b y Gabriela Parra-Olea^{a,*}^a Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado postal 70-153, 04510, México, D. F., México^b Departamento de Biología, Universidad de Puerto Rico, P.O. Box 23360, 00931 San Juan, Puerto Rico

Recibido el 10 de octubre de 2013; aceptado el 7 de octubre de 2014

Resumen

La quitridiomycosis es una enfermedad causada por el hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), el cual afecta la piel de los anfibios y puede provocar la muerte. El declive de las poblaciones de anfibios como resultado del efecto de este patógeno se presentó simultáneamente en varias partes del mundo a partir de la década de 1980. En México se identificó una oleada epidémica por *Bd* en la década de 1970, la cual concuerda con el declive de poblaciones de salamandras (caudados) en el sur del país. Nuestro trabajo presenta una revisión sobre el estado actual del conocimiento de la quitridiomycosis como uno de los factores causales del declive de las poblaciones de anfibios a nivel mundial y se analiza la información recabada al momento sobre la presencia de este patógeno en México. A la fecha, se ha registrado la infección en

50 especies de anfibios que se distribuyen, principalmente en las regiones montañosas del centro y sur del país, y se ha determinado que las familias Hylidae y Plethodontidae son las más afectadas. Diversos autores han propuesto que el cambio climático global ha jugado un papel fundamental en la presencia y virulencia del género *Batrachochytrium*, ya que el incremento de temperatura induce un desequilibrio en la relación patógeno-hospedero provocando mayor virulencia de *Bd* y/o mayor susceptibilidad a la infección en los anfibios. Sobre este tema, analizamos las temperaturas registradas de 1964 a 1989 en las zonas donde el declive de caudados fue más drástico. No se encontró una asociación clara entre el declive de salamandras con la temperatura. Por otro lado, se determinó que al igual que otros países, el comercio internacional, la introducción y desplazamiento de la “rana toro” *Lithobates catesbeiana* son importantes para la dispersión del patógeno.

Derechos Reservados © 2015 Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0.

Palabras clave: Cambio climático global; Especies invasoras; Declive

Abstract

Chytridiomycosis is a disease caused by the fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), which affects the skin of amphibians and may cause death. The decline of amphibian populations as a result of the effect of this pathogen occurred simultaneously in various parts of the world from the early 1980's. In Mexico the epidemic wave of *Bd* was identified in the 1970's, which is consistent with the decline of salamander (caudate) populations in the southern part of the country. Our work presents a review of the state of knowledge of chytridiomycosis as a factor in the decline of amphibian populations worldwide and the information gathered until now of the presence of this pathogen in Mexico. To date, there has been infection in 50 Mexican amphibian species that are mainly distributed in the mountainous regions of central and southern Mexico, and was determined that the families Hylidae and Plethodontidae are the most affected. Several authors have suggested that global climate change has played a key role in the occurrence and virulence of *Batrachochytrium* because the temperature increase induces an imbalance in the pathogen-host relationship to increased virulence of *Bd* and / or increased susceptibility to infection in amphibians. On this matter, we analyzed the reported temperatures of 1964-1989 in areas where the decline of caudates was more drastic. We found no relationship between the decline of salamanders with temperature. However, the international trade, the introduction and displacement of the “bullfrog” *Lithobates catesbeiana* are important factors for the spread of the pathogen.

All Rights Reserved © 2015 Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. This is an open access item distributed under the Creative Commons CC License BY-NC-ND 4.0.

Keywords: Global climate change; Invasive species; Decline

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: gparra@ibiologia.unam.mx (G. Parra-Olea).

Introducción

En la década de 1980 herpetólogos de diversos países registraron disminuciones drásticas de poblaciones de anfibios, en lugares donde los efectos antropogénicos comunes como la destrucción del hábitat, la contaminación, sobreexplotación y la introducción de especies introducidas no eran evidentes (Crump, Hensley y Clark, 1992; Berger, Speare y Hyatt, 1999; Bosch, 2003; Pounds, Fogden, Savage y Gorman, 1997; Stuart et al., 2004; Young, Stuart, Chanson, Cox y Boucher, 2004). Los casos más conocidos de este declive sucedieron en Costa Rica y Australia (Berger et al., 1998; Crump et al., 1992), en donde en una temporada reproductiva se encontraron miles de individuos muertos (*Bufo periglenes* y *Reobatrachus silus*, respectivamente) (Berger et al., 1998; Crump et al., 1992; Pounds et al., 1997), y al año siguiente estas especies estaban prácticamente extintas (Berger et al., 1998; Crump et al., 1992; Pounds et al., 1997).

En un inicio, los científicos argumentaron que uno de los efectos del cambio climático era el incremento de la temperatura en los hábitats donde viven los anfibios (Pounds y Crump, 1994) y que el gran declive de anfibios pudo ser ocasionado por condiciones climáticas inusuales. Heyer, Rand, Da Cruz y Peixoto (1988) sugirieron que la extinción del anuro *Fritziana ohausi* en el sureste de Brasil en 1979 y la drástica disminución en las poblaciones de los anuros *Centrolenella eurygnatha*, *Ololygon perpusilla*, *Adenomera marmorata*, *Eleutherodactylus guentheri*, *E. parvus* e *Hylodes phyllodes* estaban asociados a una inusual helada en ese año. Hacia finales de siglo, se propuso que el declive podría explicarse por una enfermedad infecciosa (Crump et al., 1992; Laurance, McDonald y Speare, 1996). En 1999, Longcore, Pessier y Nichols encontraron zoosporangios característicos de hongos de la clase Chytridiomycota en la piel de individuos muertos de las especies *Dendrobates azureus* y *Litoria caerulea*, originarios de Centroamérica y Australia, pero viviendo en cautiverio en Estados Unidos. Los autores describieron al patógeno y lo llamaron *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Una vez identificado, se realizaron búsquedas exhaustivas en varias especies de anfibios y su presencia fue registrada en poblaciones de Australia, África, Norteamérica, Centroamérica y el Caribe (Burrowes, Joglar y Green, 2004; Hero y Shoo, 2003; Lips, 1999; Lips, Green y Pappendick, 2003; Muths, Corn, Pessier y Green, 2003; Young et al., 2001).

Hoy en día, se ha registrado el patógeno prácticamente en todo el mundo (Fisher, Garner y Walker, 2009; Olson et al., 2013), desde los desiertos costeros hasta los bosques de alta montaña (Bradley, Rosen, Sredl, Jones y Longcore, 2002; Luja, Rodríguez-Estrella, Ratzlaff, Parra-Olea y Ramírez-Bautista, 2012; Ron, 2005). Sin embargo, dados los requerimientos térmicos del patógeno, los registros más comunes de infección se presentan en localidades montañosas en altitudes entre 1,000 y 3,500 m snm, las cuales a su vez, son zonas de alto endemismo y diversidad de anfibios (Berger et al., 2004; Ron, 2005; Young et al., 2004). Hasta el momento se ha registrado la infección en más de 516 especies de anfibios en 15 biomas (Gower et al., 2013; Olson et al., 2013).

La quitridiomycosis y su agente patógeno: Batrachochytrium dendrobatidis

El hongo quitridiomyceto, *B. dendrobatidis*, presenta formas de vida saprófitas o parasíticas y se caracteriza por tener una fase móvil infectiva y una fase sésil (Longcore et al., 1999; Voyles, Rosenblum y Berger, 2011). El ciclo de infección inicia con la llegada de las zoosporas móviles que se alojan en la piel de anfibios adultos, o bien, en las partes bucales de las larvas; ambos sitios poseen queratina, la cual es degradada por *Bd* para obtener sus nutrientes (Berger, Hyatt, Speare y Longcore, 2005). Después de un periodo de motilidad de 24 h, las zoosporas se enquistan y crecen finos rizoides a su alrededor, induciendo la formación de un esporangio joven; este crece y el citoplasma desarrolla divisiones mitóticas para formar las zoosporas que después serán liberadas, incrementando la abundancia de *Bd* en los anfibios (Berger, Hyatt et al., 2005; Berger, Speare y Skerratt, 2005). Las células huésped de *Bd* se ubican en el estrato córneo de la epidermis, el cual es la capa más superficial; sin embargo, también se han localizado zoosporangios de *Bd* en el estrato más interno, sugiriendo que el patógeno se desplaza hasta la capa más profunda de la piel para después proliferar en el estrato córneo (Berger, Hyatt et al., 2005; Berger, Speare et al., 2005).

La enfermedad provocada por este patógeno se conoce como quitridiomycosis y sus síntomas visibles son: la hiperqueratinización, decoloración, ulceración y erosión del estrato córneo de la piel, inapetencia, posturas anormales y ausencia de comportamiento de escape (Berger et al., 1999; Fellers, Green y Longcore, 2001; Pessier, Nichols, Longcore y Fuller, 1999). Algunas de las afecciones provocadas por la enfermedad y que en algunos casos provoca mortalidad incluyen: 1) desequilibrio osmótico originado por las perforaciones en la piel donde se sitúan los tubos de descarga de los zoosporangios o por la hiperqueratosis de la piel, en especies más vulnerables este desorden ocasiona un desbalance de electrolitos severo que redundará en un fallo cardíaco (Berger et al., 1999; Pessier et al., 1999; Voyles et al., 2007); 2) un bloqueo del intercambio de gases causado por la hiperplasia de la piel (Berger et al., 1998; Pessier et al., 1999) y 3) la liberación por parte del patógeno de enzimas proteolíticas tóxicas para los anfibios (Bosch, 2003). Por otro lado, Fites et al. (2013) encontraron que algunas micotoxinas secretadas por el patógeno inhiben la proliferación de linfocitos y causan la apoptosis de estos, provocando el incremento de la infección cuando los anfibios no presentan una respuesta eficaz por parte de macrófagos y otras células del sistema inmune innato.

Origen de *Batrachochytrium dendrobatidis*

Después que *Bd* fue descrito se inició un gran debate sobre su origen, y se propusieron 2 hipótesis principales: la hipótesis del patógeno endémico (Rachowicz et al., 2005) y la del patógeno incipiente (Daszak, Cunningham y Hyatt, 2000, 2003; Laurance et al., 1996; Rachowicz et al., 2005). La primera postula establece que *Bd* estaba presente históricamente en las localida-

des y un cambio en las condiciones ambientales (cambio climático) causó una disrupción en la relación parásito-huésped, volviendo a los anfibios susceptibles a la infección y a *Bd* más virulento. Por otro lado, la hipótesis del patógeno incipiente establece que *Bd* se originó en algún sitio geográfico particular y que se dispersó y arribó recientemente a nuevas áreas, causando una epidemia entre las especies de anfibios más vulnerables (Daszak et al., 2000, 2003; Laurance et al., 1996; Rachowicz et al., 2005).

Las primeras evidencias obtenidas para este tema fueron las espacio-temporales (Kilpatrick, Briggs y Daszak, 2010). Los registros más antiguos de *Bd* en ejemplares de colección corresponden a aquellos de *Andrias japonicus* colectados en Japón en 1902 (Goka et al., 2009) y a ejemplares de *Xenopus laevis* colectados en África en 1938 (Weldon, Du Preez, Hyatt, Muller y Speare, 2004), mientras que el registro más antiguo en otros continentes como América o Australia data de la década de 1980 (James et al., 2009). Diversos autores postularon que *Bd* fue transportado en la década de 1930 cuando miles de ejemplares de *X. laevis* fueron trasladados alrededor del mundo con fines farmacéuticos (James et al., 2009). Estos datos espacio-temporales proveen de evidencia clara y contundente de que *Bd* se estableció y dispersó por regiones geográficas en donde no se encontraba históricamente (Cheng, Rovito, Wake y Vredenburg, 2011; Lips, Diffendorfer, Mendelson III y Sears, 2008).

Por otro lado, se han llevado a cabo múltiples estudios a nivel molecular (Farrer et al., 2011; Rosenblum et al., 2013; Schloegel et al., 2009; Schloegel et al., 2012) que sugieren que la diversidad de *Bd* es mucho más grande de lo que se había considerado inicialmente, e incluye linajes de *Bd* endémicos y genéticamente aislados, cuyo ancestro común data de hasta 100,000 años (Rosenblum et al., 2013). Todos estos estudios en conjunto sugieren que este hongo quitridial ha infectado anfibios mucho antes que la gran pandemia del siglo xx (Blaustein y Wake, 1990).

Se han caracterizado múltiples linajes genéticamente divergentes de *Bd*. Farrer et al. (2011) encontraron que el linaje común “global panzootic lineage: BdGPL” emergió en 5 continentes durante el siglo xx y está claramente asociado a los episodios epizooticos de Norteamérica, Centroamérica, el Caribe, Australia y Europa. Ellos también documentan 2 linajes nuevos, el “Cape lineage (BdCAPE)” y el “Swiss lineage (BdCH)”, los cuales presentan diferencias en caracteres morfológicos comparados con el BdGPL. Farrer et al. (2011) encontraron que cepas de BdGPL tienen evidencia de recombinación genómica, por lo que postularon que el contacto entre cepas genéticamente aisladas de *Bd* generó recombinación resultando en una cepa hipervirulenta y la cual provocó la crisis de la biodiversidad contemporánea a través de su diseminación.

Factores causales a la quitridiomycosis

Independientemente de las teorías del origen de *Bd* se han encontrado 2 factores que están asociados a la prevalencia de este patógeno y a la respuesta de las comunidades de anfibios en diferentes partes del mundo:

1. *Cambio climático global.* Uno de los efectos del cambio climático es el incremento de la temperatura en los hábitats donde viven los anfibios (Pounds y Crump, 1994). Esta aseveración fue realizada por Pounds y Crump (1994) cuando encontraron que la desecación y el aumento de temperatura provocaron la muerte masiva de individuos adultos del género *Atelopus* en Costa Rica. Sin embargo, no descartaron que hubiera interacción con otro factor, por lo que postularon por primera vez la hipótesis de epidemia ligada al clima. Esta señala qué condiciones fisiológicas no letales, pero sí estresantes pueden alterar el comportamiento y el sistema inmunario comprometiendo la vitalidad del individuo. También señala que, al incrementarse la temperatura, los anfibios se agregan y hacen en un mismo hábitat, lo que promueve el acercamiento del parásito a los huéspedes. Recientemente Rohr y Palmer (2013) señalaron que la variabilidad climática tiene efectos directos sobre la pérdida de biomasa y la mortalidad en anfibios, ya que determinaron que a pesar de que los anfibios pueden presentar una gama de adaptaciones de comportamiento, como el forrajeo para resguardarse de condiciones cálidas, se presenta una elevada tasa de pérdida de masa y de mortalidad cuando la temperatura se incrementa a 27 °C y la humedad es baja. Por lo anterior, sugirieron que el cambio climático moderado puede causar declives poblacionales y que el efecto se incrementaría cuando se presenta sinergia de varios factores estresantes.

Por otra parte, Pounds et al. (2006) confirmaron que en altitudes intermedias el cambio climático es un factor clave para la desaparición de poblaciones de anfibios, ya que promueve un gradiente termal cercano al intervalo de 17 a 25 °C, el cual es adecuado para el crecimiento del patógeno. Los autores explicaron que en lugares con vegetación predominante de bosques nublados el aumento de temperatura provoca un incremento de nubosidad que impide la entrada de radiación solar, lo que trae como consecuencia la existencia de temperaturas templadas durante el día, mientras que en la noche las temperaturas son más cálidas, debido a que la nubosidad impide el escape de calor. De igual forma, en zonas tropicales y húmedas el incremento de temperatura provoca mayor evaporación de las aguas marinas y en consecuencia un aumento de nubosidad, lo cual impide que los rayos del sol calienten el suelo, favoreciendo de igual manera, el crecimiento del patógeno (La Marca et al., 2005; Pounds et al., 2006). Un ejemplo de sinergia entre el clima y *Bd* se ha descrito para *Eleutherodactylus coqui* en Puerto Rico. En estas ranas de desarrollo directo los niveles más altos de infección de *Bd* se registran en la época fría y seca del año. En esta época, las ranas tienden a agruparse en los sitios húmedos del bosque donde el hongo es más abundante (Longo, Burrowes y Joglar, 2010). Por lo tanto, el aumento de la sequía pronosticado para el Caribe como tendencia del cambio climático global, representa una amenaza contundente para especies como esta.

Recientemente Hof, Araujo, Jetz y Rahbek (2011) evaluaron si la diversidad de anfibios se podría ver afectada por la interacción espacial entre cambio climático y la quitridiomycosis entre los años 1980 a 2080. En cuanto al cambio climá-

tico, estos autores encontraron que las zonas geográficas potencialmente más afectadas o amenazadas para los anuros son: el norte de los Andes, el Amazonas y el cerrado en Sudamérica, el Subsáhara tropical en África y en una pequeña región del sureste de Asia. Para las salamandras las zonas con efectos del cambio climático se encuentran en el noroeste de América, en el norte de Centroamérica y en el sureste de Europa; mientras que para el grupo de las cecilias las zonas con efectos del cambio climático se presentan en el norte de Sudamérica. La presencia de la quitridiomycosis se localizó en áreas con climas templados en regiones montañosas y regiones costeras, por lo que determinaron pocos solapamientos de áreas con presencia de cambio climático y quitridiomycosis, sugiriendo que la quitridiomycosis tiene una asociación fuerte con condiciones de elevada humedad y bajas temperaturas; mientras que los efectos del cambio climático son prominentes en áreas cálidas y húmedas, por tanto, estos factores no se encuentran actuando juntos en la mayoría de las áreas geográficas provocando por separado el declive de poblaciones de anfibios.

II. Comercio internacional e introducción de especies exóticas. Diversos estudios señalan que la aparición del patógeno en algunas regiones de Asia, Australia, Europa, Norte y Sudamérica ha sido provocada por el comercio y consecuente introducción de especies exóticas infectadas (Bai, Garner y Li, 2010; Fisher y Garner, 2007; Laurance et al., 1996; Lips et al., 2008;). Los anuros *Lithobates catesbeiana*, *X. laevis* y *Rhinella marina* han sido determinados como vectores de la enfermedad, debido a que: 1) se comercian e introducen en diversos hábitats (Bai et al., 2010; Schloegel et al., 2009); 2) son especies que se infectan y toleran la infección, por lo que a lo largo del tiempo provocan una alta prevalencia de *Bd* en los ecosistemas (Bai et al., 2010; Schloegel et al., 2009); 3) pueden coexistir con otras especies, mientras compiten con ellas (Bai et al., 2010) y 4) son asintomáticas, por lo que el comprador no advierte signos de enfermedad y obtiene animales que infectan los materiales utilizados para el cautiverio que ocuparán otros individuos (Daszak et al., 2004). Organismos de la rana toro infectados por *Bd* se han encontrado en países como Estados Unidos, Canadá, Brasil, Uruguay, Reino Unido, Francia, Italia y China (Bai et al., 2010; Garner et al., 2006; Peterson, Wood, Hopkins, Unrine y Mendoza, 2007).

Por otra parte, Kilburn, Ibáñez y Green (2011) comprobaron que otros vertebrados pueden ser vectores de la enfermedad. Ellos detectaron al patógeno en la piel de los reptiles *Anolis humilis*, *A. linotus*, *Pliocercus euryzonus*, *Imantodes cenchoa* y *Nothopsis rugosus* en Panamá, por lo que sugirieron que esas especies son hospederas del patógeno y que, por lo tanto, están vinculadas con la dispersión y prevalencia de la enfermedad en los ecosistemas de ese país. De igual manera, se ha planteado que otros posibles agentes de dispersión son las aves *Branta canadensis* y *Anser domesticus*, ya que el patógeno presenta una elevada afinidad y adhesión al tejido queratinoso de los dígitos de esas aves, por lo que podría dispersarse hasta 30 km en cada vuelo (Garmyn et al., 2012).

Respuestas de los anfibios para combatir la infección por Bd

Se han detectado 3 respuestas principales para la regulación de la infección por *Bd* por parte de los anfibios. La primera consiste en un incremento en la tasa de muda de piel, la cual contribuye a desechar las zoosporas del organismo (Bovero et al., 2008; Davidson et al., 2003; Padgett-Flohr y Hayes, 2011). Davidson et al. (2003) señalan que esta respuesta se presenta tanto en anuros como en caudados y funciona como una estrategia para controlar la infección por *Bd*. Sin embargo, sugieren que es más eficaz en los caudados y concluyen que las especies que muestran esta estrategia pueden actuar como reservorios de la enfermedad y que, por lo tanto, juegan un rol importante en el sostenimiento de la infección en los ecosistemas (Bovero et al., 2008; Davidson et al., 2003; Padgett-Flohr y Hayes, 2011).

La segunda respuesta sucede cuando las células de la primera fase de actividad del sistema inmune (fase innata) detectan la entrada de las zoosporas al organismo y activan al sistema nervioso, el cual estimula glándulas de la piel para que sinteticen y secreten péptidos antimicrobiales (Rollins-Smith y Conlon, 2005). Diversos autores señalan que los péptidos antimicrobiales de las familias caerina, citropina, uparina y dahelina son eficaces para reconocer e inducir la disrupción de la membrana celular del patógeno y eliminar la infección (Wiesner y Vilcinskis, 2010). Hasta el momento, se ha comprobado que algunas especies de las familias Alytidae, Bombinatoridae, Hylidae, Hyperoliidae, Leiopelmatidae, Leptodactylidae, Myobatrachidae, Pipidae y Ranidae secretan los péptidos eficaces para eliminar la infección por *Bd*; asimismo, se ha descubierto que algunas especies de las familias Bufonidae, Ceratophryidae, Dicroglossidae, Eleutherodactylidae, Microhylidae, Pelobatidae, Pyxicephalidae, Rhacophoridae y Scaphiropodidae presentan péptidos que no provocan la disrupción membranal de *Bd* (Conlon, 2011).

Igualmente se ha sugerido el combate de la infección por parte de la segunda fase de respuesta del sistema inmune (fase adaptativa) a través del incremento linfocitos T y B, así como de los anticuerpos IgM, IgX e IgY (Ramsey, Reinert, Harper, Woodhams y Rollins-Smith, 2010; Rollins-Smith, Ramsey, Pask, Reinert y Woodhams, 2011; Voyles et al., 2011). Sin embargo, se ha observado que esta fase se altera en el estadio metamórfico debido a que se presenta una destrucción de hasta 40% de linfocitos, con el fin de permitir la reorganización de tejidos (Conlon, 2011; Rollins-Smith, 1998; Rollins-Smith et al., 2011). Esto explicaría por qué en algunas especies se ha demostrado que los juveniles de los anuros representan la etapa más vulnerable a la quitridiomycosis (Longo y Burrowes, 2010).

Otra posible respuesta de defensa por parte de los anfibios es la conducta de termorregulación. Por ello, algunos individuos infectados con *Bd* podrían modificar su comportamiento desplazándose de un microhábitat fresco a uno más caluroso (Richards-Zawacki, 2009). Actualmente, no se cuenta con otros estudios que respalden la conducta de termorregulación en anfibios infectados, pero es un hecho que poblaciones silvestres con climas más calurosos exhiben más resistencia a la

infección por *Bd*, en comparación con las poblaciones infectadas en climas templados o en zonas montañosas tropicales (Burrowes, Longo, Joglar Cunningham, 2008; Puschendorf et al., 2011).

Por último, se ha detectado que algunas bacterias de los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Kitasatospora*, *Lysobacter*, *Paenibacillus*, *Pedobacter*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Janthinobacterium* se encuentran en la piel de estos vertebrados y adquieren un papel fundamental en el combate de la infección, ya que producen los metabolitos 2,4-diacetilfloroglucinol, indol-3-carboxaldehído y violaceína, los cuales actúan eliminando directamente al patógeno o provocando un movimiento de aislamiento de las zoosporas (Brucker, Baylor et al., 2008; Harris, James, Lauer, Simon y Patel, 2006; Lauer et al., 2007; Woodhams et al., 2007). Particularmente se ha encontrado que algunas salamandras combaten de manera eficaz la infección por *Bd*, debido a que presentan la bacteria *Janthinobacterium lividum*. Esta bacteria es la más efectiva para producir el metabolito violaceína (Brucker, Harris et al., 2008; Harris, Lauer, Simon, Banning y Alford, 2009). Sin embargo, estudios recientes demostraron que la inoculación de *Atelopus zeteki* con *J. lividum* no fue efectiva para evitar su mortandad por quitridiomycosis (Becker et al., 2011). Por lo tanto, aunque el uso de probióticos puede ser prometedor como medida de manejo y prevención de quitridiomycosis en algunos ecosistemas, es evidente que hacen falta más estudios sobre la interacción de los mecanismos del sistema inmune de los anfibios y las bacterias simbióticas para combatir la infección por *Bd*.

La quitridiomycosis en México

Los registros de quitridiomycosis en México datan de la década de 1980, cuando Scott (1993) observó una mortalidad masiva en individuos postmetamórficos de la especie *Lithobates tarahumare* distribuidos desde Arizona hasta Sonora. Scott (1993) sugirió que esto era provocado por un agente infeccioso, sin embargo, no determinó el patógeno causal de dicha mortalidad hasta que Hale, Rosen, Jarchow y Bradley (2005) detectaron al patógeno en la parte norte del país en ejemplares de colección colectados en 1981. Por otro lado, un declive dramático de las poblaciones de salamandras de los géneros *Bolitoglossa*, *Thorius*, *Pseudoeurycea* y *Chiropterotriton* en los estados de Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Hidalgo y Nuevo León fue documentado por Parra-Olea, García-Paris y Wake (1999) y Rovito, Parra-Olea, Vásquez-Almazán, Papenfuss y Wake (2009). Los autores señalaron que el declive debió de haber ocurrido a finales de los años 70 y principios de los 80. Posteriormente, Cheng et al. (2011) corroboraron la presencia de *Bd* en ejemplares colectados entre 1972 y 1974 en poblaciones de salamandras pletodóntidas en los estados de Oaxaca, Hidalgo y Veracruz.

De acuerdo con el trabajo de Cheng et al. (2011), la infección por el quitridio estaba presente desde 1972 a 1989 en Veracruz, desde 1974 a 1981 en Oaxaca y desde 1974 a 1982 en Hidalgo, por lo que concluyeron que los eventos de declive de anuros y salamandras pletodóntidas en el sur del país registrados entre 1970 y 1980 por Parra-Olea et al. (1999) y Rovito et al. (2009)

tienen relación con la onda epidémica de *Bd* en esas regiones, y que, por lo tanto, la presencia del patógeno pudo haber mermaado otras poblaciones de anfibios en México. Adicionalmente, los autores realizaron experimentos de tolerancia máxima de la infección en el anuro *Plectrohyla matudai* y en los pletodóntidos *Pseudoeurycea leprosa* y *Bolitoglossa rufescens*. Los resultados indicaron que en ambas salamandras la infección incrementó rápidamente y que los individuos sucumbieron cuando la infección alcanzó niveles promedio de 37,841 zoosporas; mientras que los anuros persistieron con bajos niveles de infección durante los 50 días de duración del experimento. Otro trabajo de detección de *Bd* en pletodóntidos de México, fue el realizado por Van-Rooij et al. (2011). En este trabajo, los autores encontraron que el 48% de los 33 individuos de las especies *Bolitoglossa platydactyla*, *B. rufescens*, *Pseudoeurycea belli*, *P. cephalica*, *P. leprosa* y *P. longicauda* presentaron la infección con *Bd*. Además, registraron que el 50% de las salamandras infectadas exhibieron pérdida de cola, por lo que sugirieron que la infección por *Bd* puede inducir esta respuesta.

Por otra parte, Muñoz-Alonso (2010) realizó un muestreo de anfibios a lo largo de 3 transectos al este del istmo de Tehuantepec y obtuvo 1,106 frotis de piel correspondientes a 77 especies de anfibios. Los resultados del análisis de detección mostraron que 24 especies de anfibios pertenecientes a las familias Bufonidae, Hylidae, Leptodactylidae, Microhylidae, Plethodontidae y Ranidae, es decir, el 21% de las especies analizadas, presentaron la infección; por su parte, el análisis estadístico mostró que la familia Hylidae presenta una tendencia significativa a estar más infectada por *Bd* en comparación con las otras familias.

Hasta el momento se ha registrado la presencia de *Bd* a todo lo largo de la República Mexicana, en 13 de los 32 estados que la conforman (Cheng et al., 2011; Frías-Álvarez et al., 2008; Global *Bd* mapping project, 2013; Lips, Mendelson III, Muñoz-Alonso, Canseco-Márquez y Mulcahy, 2004; Luja et al., 2012; Muñoz-Alonso, 2010; Van-Rooij et al., 2011) (fig. 1; tabla 1).

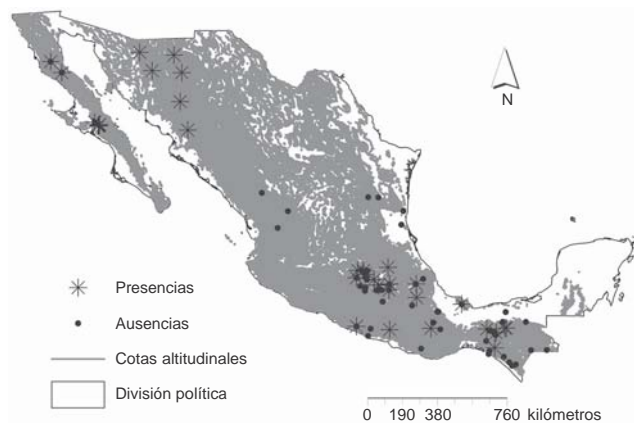


Figura 1. Mapa de la distribución de *Batrachochytrium dendrobatidis* en México. Los asteriscos señalan los sitios en el que se ha detectado la infección por el quitridio. Los círculos representan lugares donde no se ha detectado la presencia del mismo en los anfibios analizados.

Tabla 1

Especies de anfibios infectados por *Bd* en México hasta el año 2013

Número de anuros y caudados infectados con <i>Bd</i>	Nombre de la especie	Categoría de conservación de acuerdo con la IUCN	Estados donde se registra	Altitud (m snm)	Referencia bibliográfica
1	<i>Agalychnis moreletii</i>	CR	Guerrero, Chiapas	939, Nd	Frías-Álvarez et al., (2008) y Muñoz-Alonso (2010)
2	<i>Craugastor saltator</i>	SD	Guerrero	600-2,300	Lips et al. (2004)
3	<i>Dendropsophus ebraccatus</i>	LC	Chiapas	Nd	Muñoz-Alonso (2010)
4	<i>Duellmanohyla schmidtorum</i>	VU	Chiapas	Nd	Muñoz-Alonso (2010)
5	<i>Duellmanohyla schmidtorum</i>	VU	Chiapas	Nd	Muñoz-Alonso (2010)
6	<i>Exerodonta melanomma</i>	VU	Guerrero	1,600	Frías-Álvarez et al. (2008)
7	<i>Hyla euphorbiacea</i>	NT	Oaxaca	2,924	Frías-Álvarez et al. (2008)
8	<i>Hyla eximia</i>	LC	Estado de México	2,604	Frías-Álvarez et al. (2008)
9	<i>Hyla walkeri</i>	VU	Chiapas	Nd	Muñoz-Alonso (2010)
10	<i>Hypopachus barberi</i>	VU	Chiapas	Nd	Muñoz-Alonso (2010)
11	<i>Incilius macrocristatus</i>	VU	Chiapas	Nd	Muñoz-Alonso (2010)
12	<i>Incilius occidentalis</i>	LC	Puebla	Nd	Global <i>Bd</i> -Mapping Project (2013)
13	<i>Incilius valliceps</i>	LC	Chiapas	Nd	Muñoz-Alonso (2010)
14	<i>Lithobates maculatus</i>	LC	Chiapas	Nd	Muñoz-Alonso (2010)
15	<i>Lithobates magnaocularis</i>	LC	Sonora	Nd	Global <i>Bd</i> -Mapping Project (2013)
16	<i>Lithobates megapoda</i>	VU	Estado de México	2,863	Frías-Álvarez et al. (2008)
17	<i>Lithobates montezumae</i>	LC	Distrito Federal	2,337	Frías-Álvarez et al. (2008)
18	<i>Lithobates neovolcanica</i>	NT	Estado de México	2,841, 3,236	Frías-Álvarez et al. (2008)
19	<i>Lithobates pustulosus</i>	LC	Sonora	Nd	Global <i>Bd</i> -Mapping Project (2013)
20	<i>Lithobates spectabilis</i>	LC	Morelos	1,097	Frías-Álvarez et al. (2008)
21	<i>Lithobates tarahumarae</i>	VU	Sonora	Nd	(Hale et al., 2005)
22	<i>Plectrohyla ixil</i>	CR	Chiapas	Nd	Muñoz-Alonso (2010)
23	<i>Plectrohyla lacertosa</i>	EN	Chiapas	Nd	Muñoz-Alonso (2010)
24	<i>Plectrohyla matudai</i>	VU	Chiapas	Nd	Muñoz-Alonso (2010)
25	<i>Plectrohyla sagorum</i>	EN	Chiapas	Nd	Muñoz-Alonso (2010)
26	<i>Pseudacris hypochondriaca curta</i>	SD	Baja California	94, 97, 145, 154, 280	Luja et al., 2012
27	<i>Ptychohyla erythromma</i>	EN	Guerrero	600-2,300	Lips et al. (2004)
28	<i>Ptychohyla euthysanota</i>	NT	Chiapas	Nd	Muñoz-Alonso (2010)
29	<i>Smilisca baudinii</i>	LC	Chiapas	Nd	Muñoz-Alonso (2010) Global <i>Bd</i> -Mapping Project (2013)
30	<i>Tlalocohyla loquax</i> Caudados	LC	Chiapas	Nd	Muñoz-Alonso (2010)
31	<i>Ambystoma altamirani</i>	EN	Estado de México	2,800	Global <i>Bd</i> -Mapping Project (2013)
32	<i>Ambystoma granulosum</i>	CR	Michoacán, Estado de México	2,300, 2,840	Frías-Álvarez et al. (2008)
33	<i>Ambystoma rivulare</i>	DD	Michoacán	3,236	Frías-Álvarez et al. (2008)
34	<i>Ambystoma velasci</i>	LC	Puebla	2,350	Frías-Álvarez et al. (2008)
35	<i>Bolitoglossa lincolni</i>	NT	Chiapas	Nd	Muñoz-Alonso (2010)
36	<i>Bolitoglossa rufescens</i>	CR	Chiapas, Veracruz	Nd, 1,030, 1,025	Muñoz-Alonso (2010)
37	<i>Bolitoglossa platydactyla</i>	NT	Chiapas	Nd	Muñoz-Alonso (2010) Van-Rooij et al. (2011)
38	<i>Chiropterotriton dimidiatus</i>	EN	Hidalgo	Nd	Van-Rooij et al. (2011)
39	<i>Chiropterotriton multidentatus</i>	EN	Hidalgo	Nd	Cheng et al. (2011)
40	<i>Dendrotriton megarhinus</i>	VU	Chiapas	Nd	Cheng et al. (2011) Muñoz-Alonso (2010)
41	<i>Dendrotriton xolocalcae</i>	VU	Chiapas	Nd	Muñoz-Alonso (2010)
42	<i>Pseudoeurycea belli</i>	VU	Sin registro	Nd	Van-Rooij et al. (2011)
43	<i>Pseudoeurycea cephalica</i>	NT	Veracruz, Estado de México, Hidalgo,	3,044, 3,243 2,942	Van-Rooij et al. (2011)
44	<i>Pseudoeurycea firscheini</i>	EN	Veracruz	2,337	Van Rooij et al., 2011
45	<i>Pseudoeurycea galeanae</i>	NT	Tamaulipas	Nd	Van Rooij et al., 2011
46	<i>Pseudoeurycea leprosa</i>	VU	Estado de México, Puebla	1,996, 3,079, Nd	Global <i>Bd</i> -Mapping Project (2013)
47	<i>Pseudoeurycea Longicauda</i>	EN	Nd	Nd	Van-Rooij et al., 2011 Cheng et al. (2011)
48	<i>Pseudoeurycea nigromaculata</i>	CR	Veracruz	Nd	Van-Rooij et al. (2011)
49	<i>Pseudoeurycea smithi</i>	CR	Oaxaca	Nd	Cheng et al. (2011)
50	<i>Thorius pennatulus</i>	CR	Veracruz	Nd	Cheng et al. (2011)

Las categorías de conservación señaladas son las registradas en el libro rojo de la IUCN (2013), y se escriben con las siguientes abreviaturas: en peligro crítico (CR), en peligro de extinción (EN), preocupación menor (LC), poco amenazado (NT), vulnerable (VU), datos deficientes (DD) y sin datos (SD).

Estos registros corresponden a 50 especies de anfibios distribuidas desde el desierto costero (Luja et al., 2012) hasta el bosque de alta montaña (Frías-Álvarez et al., 2008; Lips et al., 2004); desde el nivel del mar (Luja et al., 2012) hasta una altitud de 2,336 m snm (Frías-Álvarez et al., 2008). De acuerdo con la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN, 2013) 13 de estas especies son vulnerables, 8 se encuentran en peligro de extinción y 7 en peligro crítico (tabla 1).

Factores causales a la quitridiomycosis en México

Con respecto al cambio climático global en México, Pavía, Grae y Reyes (2006) evaluaron el cambio de la temperatura ambiental en México entre los periodos de 1940 a 1969 y de 1970 a 2004. Para ello, utilizaron datos de temperaturas máximas y mínimas de 1,400 estaciones meteorológicas de todo el país. Estos autores encontraron que a partir de 1970 se presentó un incremento significativo de temperatura en el sur de México y que este fue más marcado en la estación de verano. De igual manera, los brotes epidemiológicos del quitridio en México y el declive de anfibios sucedieron a partir de esa década (Cheng et al., 2011). Esta información podría sugerir que el cambio de temperatura en el país provocó una disrupción en la relación parásito-huésped propiciando el declive de pletodóntidos registrado por Parra-Olea et al. (1999) y Rovito et al. (2009). De acuerdo con Pounds y Crump (1994), la disrupción pudo llevarse a cabo porque el aumento de temperatura provocó estrés fisiológico en las salamandras, haciéndolas más vulnerables a la infección.

Con el fin de apreciar el intervalo de la temperatura a partir de 1970 en los sitios con declive de anfibios y prevalencia de *Bd*, se obtuvo el registro de la temperatura promedio anual en las localidades del Parque Nacional El Chico en Hidalgo, cerro Chicahuaxtla en Veracruz y cerro San Felipe en Oaxaca. Los datos de temperatura promedio anual fueron tomados de Cicese (2014) y corresponden a las estaciones meteorológicas: El Chico en Hidalgo; Coscomatepec (DGE) en Veracruz; presa El Estudiante, Santo Domingo Barrio y Oaxaca en Oaxaca. En el Parque Nacional El Chico la temperatura entre 1964 a 1988 se mantuvo en un intervalo de entre 18.89 a 21.96 °C. En la localidad del cerro Chicahuaxtla la temperatura osciló de 16.42 a 22.43 °C en el periodo de 1964 a 1989. En lo que respecta a la localidad de cerro San Felipe los valores de temperatura durante el periodo de 1955 a 1984 oscilaron entre 19.37 a 21.72 °C. Lo anterior sugiere que no hubo un cambio dramático en el promedio de temperatura, pero el quitridio pudo prevalecer con un crecimiento adecuado en esos sitios, debido a que la temperatura óptima para el crecimiento del patógeno se encuentra entre 17 y 23 °C (Piotrowski, Annis y Longcore, 2004). Al respecto Cheng et al. (2011) encontraron que en los 3 lugares el patógeno se detectó en 5 especies de pletodóntidos a partir de 1972. Por ejemplo, en el Parque Nacional El Chico se detectó a *Bd* en *Chiropoterotriton multidentatus* en 1974 con un valor de 3% de prevalencia y en 1982 la prevalencia fue de 14% en *C. dimidiatus*. En el cerro Chicahuaxtla la presencia de *Bd* se detectó en 1972 con un 2% de prevalencia en *Thorius pennatulus*; en 1976 la infección se detectó en *Pseudoeurycea nigromaculata* con

una prevalencia de 50% y en 1989 la prevalencia en *T. pennatulus* fue de 50%. En el cerro San Felipe los valores de prevalencia en *Pseudoeurycea smithi* fueron de 3% en 1974, 5% en 1976 y 54% en 1981. Estos datos sugieren que el declive de salamandras puede estar asociado al incremento en la prevalencia de la quitridiomycosis, pero no con el clima.

En lo concerniente a las especies invasoras como vectores de la enfermedad en México, se han registrado poblaciones exóticas de *L. catesbeiana* desde la primera mitad del siglo xx (Smith y Taylor, 1948). Actualmente existe una importación de la especie desde China y muchos de los individuos importados se encuentran infectados por *Bd*, por lo que son una fuente de transmisión de la enfermedad (Bai et al., 2010). Al respecto Luja et al. (2012) corroboraron que la presencia de *Bd* en diferentes oasis aislados en el estado de Baja California fue ocasionada por el constante desplazamiento de individuos infectados de la especie *L. catesbeiana*. En total se han encontrado poblaciones silvestres y de cautiverio de este anuro en los estados de Aguascalientes, Baja California, Chihuahua, Estado de México, Distrito Federal, Michoacán, Morelos, Puebla, Sonora, Veracruz y Yucatán (Casas-Andreu, Aguilar-Miguel y Cruz-Aviña, 2001; Conabio, 2013). En las poblaciones en cautiverio no se han tomado las medidas necesarias para impedir que los individuos escapen y se trasladen a hábitats silvestres (Casas-Andreu et al., 2001), por tanto, se introduce la enfermedad a nuevos sitios.

Consideraciones finales

La quitridiomycosis es una enfermedad infecciosa y emergente de la piel de los anfibios que surgió simultáneamente en todos los continentes a partir de la década de 1970. Las evidencias muestran que el patógeno estuvo presente desde la primera parte del siglo xx en Asia y África. Hasta el momento las hipótesis del origen del patógeno han sido respaldadas por trabajos en diferentes partes del mundo. Se ha documentado que el cambio climático global ha traído condiciones que favorecen el crecimiento del patógeno, y se ha postulado que la dispersión de diversas cepas de *Bd* ha sido ocasionada por la introducción y desplazamiento de especies vectoras o por medios abióticos como corrientes de agua, suelo húmedo o neblina. Asimismo, se ha determinado que estrategias fisiológicas y conductuales de los anfibios podrían favorecer la resistencia o la tolerancia a la infección de *Bd*.

En México la oleada epidémica de *Bd* inició en 1972 y de acuerdo con los estudios de extensión del patógeno en América por Lips et al. (2008) la dispersión del patógeno presentó una dirección hacia el sur. Hasta el momento se ha registrado la infección en 50 especies mayoritariamente distribuidas en las regiones montañosas del noroeste, centro y sur del país. Es importante señalar que 7 de esas especies se encuentran en peligro crítico de acuerdo con la UICN (2013), por lo que se deben de tomar medidas de conservación sobre sus poblaciones. En la tabla 1 se localiza el estatus de conservación de las especies infectadas por *Bd* en el país. Se ha constatado el declive de caudados por *Bd* en México, debido a los registros de monitoreo por Parra-Olea et al. (1999) y Rovito et al. (2009) en el Parque

Nacional El Chico, Hidalgo, cerro Chicahuaxtla, Veracruz y cerro San Felipe, Oaxaca, y por la detección del patógeno *Bd* en esos lugares realizada por Cheng et al. (2011).

Por otra parte, se ha documentado que el cambio climático global ha provocado la presencia de brotes epidemiológicos en varias regiones. Con respecto a México, el cambio significativo de temperatura fue evaluado a partir de 1970, lo cual coincide con el inicio de la oleada epidémica de *Bd* en el sur del país. El registro de la temperatura en los sitios con declive y prevalencia del patógeno sugiere que la temperatura permitió su supervivencia, pero no hay una asociación clara con el incremento en la prevalencia de *Bd*. Aún no se puede comprobar que el cambio climático global se encuentre relacionado con la aparición y virulencia de *Bd* en México, debido a que no se cuenta con datos suficientes de número de individuos infectados y grado de infección en los sitios monitoreados por Parra-Olea et al. (1999) y Rovito et al. (2009). Por lo anterior, es necesario realizar un análisis de detección histológica de *Bd* en los anfibios colectados durante el siglo xx, con el fin de determinar la relación entre las condiciones ambientales que se presentaron después del cambio climático y la prevalencia del patógeno.

La familia Plethodontidae es importante para el análisis de la quitridiomycosis, ya que refleja el efecto de la enfermedad en las poblaciones de anfibios completamente terrestres y porque se ha determinado que toleran altos grados de infección, por lo que pueden ser vectores del patógeno y causantes de la prevalencia de la infección en los ecosistemas. Recientemente se descubrió un nuevo quitrido, *Batrachochytrium salamandrivorans* (Martel et al., 2013) de elevada virulencia con especificidad aparente a los caudados en Europa. Este nuevo descubrimiento trae consigo varias incógnitas; por ejemplo, dada la especificidad a los caudados, emerge la necesidad de revisar si este estuvo involucrado en las extinciones y declinaciones observadas en México. Por otro lado, plantea la posibilidad de nuevas cepas emergentes en los diferentes grupos o en las diferentes regiones geográficas, por tanto, hay que estudiar a detalle las características genéticas y morfológicas de la cepa de *Bd* que infecta las poblaciones naturales de anfibios de México.

Adicionalmente, este trabajo sugiere que la dispersión del patógeno en México fue facilitada por la introducción y desplazamiento de *L. catesbeiana* ocurrido en la primera mitad del siglo xx. Es necesario obtener el cultivo de cepas de *Bd* provenientes de este anuro, con el fin de determinar los genotipos, conocer su virulencia y las posibles rutas de entrada y dispersión del patógeno.

Finalmente, en México los estudios futuros sobre la quitridiomycosis deberían centrarse en: 1) aislar las cepas de *Bd* de poblaciones de anfibios silvestres, ya que solo se cuenta con la cepa MexMkt que fue aislada de anfibios de comercio (Longo et al., 2013); 2) determinar las diferencias en la virulencia de las cepas del patógeno en una muestra representativa de las especies y poblaciones de anfibios, con el fin de establecer las zonas y poblaciones que son más susceptibles a la enfermedad; 3) identificar el impacto de la variabilidad ambiental en la virulencia de *Bd* y en las especies de anfibios; 4) identificar las estrategias que los anfibios pudieran estar realizando para combatir la infección y 5) estudiar detalladamente la respuesta inmune en-

tre parásito-hospedero, con el fin de encontrar vías que beneficien los mecanismos que promuevan resistencia a la infección por *Bd*. Adicionalmente, se debe alertar e informar a la población acerca de las medidas de prevención y de desinfección de los materiales utilizados en el cautiverio de los anfibios. Es prioritario realizar estas medidas en Oaxaca, Chiapas y Veracruz, porque son los estados con más diversidad y endemismos de anfibios en México.

Agradecimientos

La primera autora establece que este artículo es un requisito para la obtención del grado de Doctora en Ciencias del Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM y, por lo tanto, le agradece al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por colaborar en sus estudios, así como al Conacyt por otorgarle la beca con número (CVU/Becario) 2 05284/202580 durante sus estudios de doctorado. GP-O agradece a proyecto PAPIIT-UNAM IN209914.

Referencias

- Bai, C., Garner, T. W. y Li, Y. (2010). First evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in China: discovery of chytridiomycosis in introduced American bullfrogs and native amphibians in the Yunnan Province, China. *EcoHealth*, 7, 127–134.
- Becker, M. H., Harris, R. N., Minbiole, K. P., Schwantes, C. R., Rollins-Smith, L. A., Reinert, L. K. et al. (2011). Towards a better understanding of the use of probiotics for preventing chytridiomycosis in Panamanian golden frogs. *EcoHealth*, 8, 501–506.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A. A., Goggin, C. L. et al. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 9031–9036.
- Berger, L., Speare, R. y Hyatt, A. D. (1999). Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. En A. Campbell (Ed.), *Declines and disappearances of Australian frogs* (pp. 23–33). Canberra: Environment Australia.
- Berger, L., Speare, R., Hines, H. B., Marantelli, G., Hyatt, A. D., McDonald, K. R. et al. (2004). Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Australian Veterinary Journal*, 82, 434–439.
- Berger, L., Hyatt, A. D., Speare, R. y Longcore, J. E. (2005). Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68, 51–63.
- Berger, L., Speare, R. y Skerratt, L. F. (2005). Distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and pathology in the skin of green tree frogs *Litoria caerulea* with severe chytridiomycosis. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68, 65–70.
- Blaustein, A. R. y Wake, D. B. (1990). Declining amphibian populations: a global phenomenon? *Trends in Ecology and Evolution*, 5, 203–204.
- Bosch, J. (2003). Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. *Munibe*, 16, 56–73.
- Bovero, S., Sotgiu, G., Angelini, C., Doglio, S., Gazzaniga, E., Cunningham, A. A. et al. (2008). Detection of chytridiomycosis caused by *Batrachochytrium dendrobatidis* in the endangered Sardinian Newt (*Euproctus platycephalus*) in Southern Sardinia, Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 44, 712–715.
- Bradley, G. A., Rosen, P. C., Sredl, M. J., Jones, T. R. y Longcore, J. E. (2002). Chytridiomycosis in native Arizona frogs. *Journal of Wildlife Diseases*, 38, 206–212.

- Brucker, R. M., Baylor, C. M., Walters, R. L., Lauer, A., Harris, R. N. y Minbiole, K. P. (2008). The identification of 2,4-diacetylphloroglucinol as a natural antifungal metabolite produced by cutaneous bacteria of the salamander *Plethodon cinereus*. *Journal of Chemical Ecology*, *34*, 39–43.
- Brucker, R. M., Harris, R. N., Schwantes, C. R., Gallaher, T. N., Flaherty, D. C., Lam, B. A. et al. (2008). Amphibian chemical defense: antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus*. *Journal of Chemical Ecology*, *34*, 1422–1429.
- Burrowes, P. A., Joglar, R. L. y Green, D. E. (2004). Potential causes for amphibian declines in Puerto Rico. *Herpetologica*, *60*, 141–154.
- Burrowes, P. A., Longo, A. V., Joglar, R. L. y Cunningham, A. A. (2008). Geographic distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Puerto Rico. *Herpetological Review*, *39*, 321–324.
- Casas-Andreu, G., Aguilar-Miguel, X. y Cruz-Aviña, R. (2001). La introducción y el cultivo de la rana toro (*Rana catesbeiana*) ¿Un atentado a la biodiversidad de México? *Ciencia Ergo Sum*, *8*, 62–67.
- 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 of the United States of America*, *108*, 9502–9507.
- Cicese (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada). (2014). Datos climáticos diarios del CLICOM del SMN con gráficas del Cicese. Recuperado el 05 agosto 2014, de <http://clicom-mex.cicese.mx>.
- Conabio (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). (2013). Recuperado el 05 diciembre 2013, de http://www.conabio.gob.mx/invasoras/index.php/Rana_toro
- Conlon, J. M. (2011). The contribution of skin antimicrobial peptides to the system of innate immunity in anurans. *Cell and Tissue Research*, *343*, 201–212.
- Crump, M. L., Hensley, F. R. y Clark, K. L. (1992). Apparent declines of the Golden toad: underground or extinct? *Copeia*, *2*, 413–420.
- Daszak, P., Cunningham, A. A. y Hyatt, A. D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife—threats to biodiversity and human health. *Science*, *287*, 443–449.
- Daszak, P., Cunningham, A. A. y Hyatt, A. D. (2003). Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*, *9*, 141–150.
- Daszak, P., Strieby, A., Cunningham, A. A., Longcore, J. E., Brown, C. C. y Porter, D. (2004). Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetological Journal*, *14*, 201–207.
- Davidson, E. W., Parris, M., Collins, J. P., Longcore, J. E., Pessier, A. P. y Brunner, J. (2003). Pathogenicity and transmission of chytridiomycosis in tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Copeia*, *3*, 601–607.
- Farrer, R. A., Weinert, L. A., Bielby, J., Garner, T. W. J., Balloux, F., Clare, F. et al. (2011). Multiple emergences of genetically diverse amphibian infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*, 18732–18736.
- Fellers, G. M., Green, D. E. y Longcore, J. E. (2001). Oral chytridiomycosis in the mountain yellow-legged frog (*Rana muscosa*). *Copeia*, *4*, 945–953.
- Fisher, M. C. y Garner, T. W. J. (2007). The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biology Reviews*, *21*, 2–9.
- Fisher, M. C., Garner, T. W. y Walker, S. F. (2009). Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. *Annual Review of Microbiology*, *63*, 291–310.
- Fites, J. S., Ramsey, J. P., Holden, W. M., Collier, S. P., Sutherland, D. M., Reinert, L. K. et al. (2013). The invasive chytrid fungus of amphibians paralyzes lymphocyte responses. *Science*, *342*, 366–369.
- Frías-Álvarez, P., Vredenburg, V. T., Familiar-López, M., Longcore, J. E., González-Bernal, E., Santos-Barrera, G. et al. (2008). Chytridiomycosis survey in wild and captive Mexican amphibians. *EcoHealth*, *5*, 18–26.
- Garmyn, A., Van-Rooij, P., Pasmans, F., Hellebuyck, T. Den Broeck, W. V., Haesebrouck, F. et al. (2012). Waterfowl: potential environmental reservoirs of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS ONE*, *7*, e35038.
- Garner, T. W. J., Perkins, M. W., Govindarajulu, P., Seglie, D., Walker, S., Cunningham, A. A. et al. (2006). The emerging pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biology Letters*, *2*, 455–459.
- Global Bd mapping proyect. (2013). Recuperado el 05 diciembre 2013, de http://www.bdmaps.net/surveillance/s_country.asp?country=MX
- Goka, K., Yokoyama, J., Une, Y., Kuroki, T., Suzuki, K., Nakahara, M. et al. (2009). Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology*, *18*, 4757–4774.
- Gower, D. J., Doherty-Bone, T., Loader, S. P., Wilkinson, M., Kouete, M. T., Tapley, B. et al. (2013). *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and lethal chytridiomycosis in caecilian amphibians (Gymnophiona). *EcoHealth*, *10*, 173–183.
- 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*, *36*, 407–411.
- Harris, R. N., James, T. Y., Lauer, A., Simon, M. A. y Patel, A. (2006). Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. *EcoHealth*, *3*, 53–56.
- Harris, R. N., Lauer, A., Simon, M. A., Banning, J. L. y Alford, R. A. (2009). Addition of antifungal skin bacteria to salamanders ameliorates the effects of chytridiomycosis. *Diseases of Aquatic Organisms*, *83*, 11–16.
- Heyer, W. R., Rand, A. S., Da Cruz, C. A. G. y Peixoto, O. L. (1988). Decimations, extinctions, and colonizations of frog populations in Southeast Brazil and their evolutionary implications. *Biotropica*, *20*, 230–235.
- Hero, J. M. y Shoo, L. (2003). Conservation of amphibians in the old world tropics: defining unique problems associated with regional fauna. En R. D. Semlitsch (Ed.), *Amphibian conservation* (pp. 70–84). Washington, D. C.: Smithsonian Press.
- Hof, C., Araujo, M. B., Jetz, W. y Rahbek, C. (2011). Additive threats from pathogens, climate and land-use change for global amphibian diversity. *Nature*, *480*, 516–519.
- James, T. Y., Litvintseva, A. P., Vilgalys, R., Morgan, J. A. T., Taylor, J. W., Fisher, M. C. et al. (2009). Rapid global expansion of the fungal disease chytridiomycosis into declining and healthy amphibian populations. *Plos Pathogens*, *5*, e1000458.
- Kilburn, V. L., Ibáñez, R. y Green, D. M. (2011). Reptiles as potential vectors and hosts of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Panama. *Diseases of Aquatic Organisms*, *97*, 127–134.
- Kilpatrick, A. M., Briggs C. J. y Daszak, P. (2010). The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology and Evolution*, *25*, 109–118.
- La Marca, E., Lips, K. R., Lötters, S., Puschendorf, R., Ibáñez, R., Rueda-Almonacid, J. V. et al. (2005). Catastrophic population declines and extinctions in Neotropical harlequin frogs (Bufonidae: *Atelopus*). *Biotropica*, *37*, 190–201.
- Lauer, A., Simon, M. A., Banning, J. L., André, E., Duncan, K. y Harris, R. N. (2007). Common cutaneous bacteria from the Eastern red-backed salamander can inhibit pathogenic fungi. *Copeia*, *3*, 630–640.
- Laurance, W. F., McDonald, K. R. y Speare, R. (1996). Epidemic disease and the catastrophic decline of Australian rain forest frogs. *Conservation Biology*, *10*, 406–413.
- Lips, K. R. (1999). Mass mortality and population declines of anurans at an upland site in Western Panama. *Conservation Biology*, *13*, 117–125.
- Lips, K. R., Diffendorfer, J., Mendelson III, J. R. y Sears M. W. (2008). Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *Plos Biology*, *6*, e72.

- Lips, K. R., Green, D. E. y Papendick, R. (2003). Chytridiomycosis in wild frogs from Southern Costa Rica. *Journal of Herpetology*, 37, 215–218.
- Lips, K. R., Mendelson III, J. R., Muñoz-Alonso, A., Canseco-Márquez, L. y Mulcahy, D. G. (2004). Amphibian population declines in montane Southern Mexico: resurveys of historical localities. *Biological Conservation*, 119, 555–564.
- Longcore, J. E., Pessier, A. P. y Nichols, D. K. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91, 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 for persistence. *Diseases of Aquatic Organisms*, 92, 253–260.
- Longo, A. V. y Burrowes, P. A. (2010). Persistence with chytridiomycosis does not assure survival of direct-developing frogs. *EcoHealth*, 7, 185–195.
- Longo, A. V., Rodríguez, D., Da Silva-Leite, D., Toledo, L. F., Mendoza-Almeralla, C., Burrowes, P. A. et al. (2013). ITS1 copy number varies among *Batrachochytrium dendrobatidis* strains: implications for qPCR estimates of infection intensity from field-collected amphibian skin swabs. *PLoS One*, 8, e59499.
- Luja, V. H., Rodríguez-Estrella, R., Ratzlaff, K., Parra-Olea G. y Ramírez-Bautista, A. (2012). The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in isolated populations of the Baja California tree frog *Pseudacris hypochondriaca curta* in Baja California Sur, Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 57, 323–327.
- Martel, A., Spitzen-Van der Sluijs, S. A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M. C. et al. (2013). *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 15325–15329.
- Muñoz-Alonso, L. A. (2010). *Riqueza, diversidad y estatus de los anfibios amenazados en el sureste de México; una evaluación para determinar las posibles causas de la declinación de las poblaciones*. San Cristóbal de las Casas, Chiapas: Colegio de la Frontera Sur.
- Muths, E., Corn, P. S., Pessier, A. P. y Green, D. E. (2003). Evidence for disease-related amphibian decline in Colorado. *Biological Conservation*, 110, 357–365.
- Olson, D. H., Aanensen, D. M., Ronnenberg, K. L., Powell, C. I., Walker, S. F., Bielby, J. et al. (2013). Mapping the global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the amphibian chytrid fungus. *PLoS One*, 8, e56802.
- Padgett-Flohr, G. E. y Hayes, M. P. (2011). Assessment of the vulnerability of the Oregon spottedfrog (*Rana pretiosa*) to the amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *Herpetological Conservation and Biology*, 6, 99–106.
- Parra-Olea, G., García-Paris, M. y Wake, D. B. (1999). Status of some populations of Mexican salamanders (Amphibia: Plethodontidae). *Revista de Biología Tropical*, 47, 217–223.
- Pavía, E. G., Grae, F. y Reyes, J. (2006). PDO-ENSO effects in the climate of Mexico. *Journal of Climate*, 19, 6433–6438.
- Pessier, A. P., Nichols, D. K., Longcore, J. E. y Fuller, M. S. (1999). Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and white's tree frogs (*Litoria caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11, 194–199.
- Peterson, J. D., Wood, M. B., Hopkins, W. A., Unrine, J. M. y Mendoza, M. T. (2007). Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in American bullfrog and Southern leopard frog larvae from wetlands on the Savannah river site, South Carolina. *Journal of Wildlife Diseases*, 43, 450–460.
- Piotrowski, J. S., Annis, S. L. y Longcore, J. F. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, 96, 9–15.
- Pounds, J. A. y Crump, M. L. (1994). Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Conservation Biology*, 8, 72–85.
- Pounds, J. A., Fogden, M. P. L., Savage, J. M. y Gorman, G. C. (1997). Tests of null models for amphibian declines on a tropical mountain. *Conservation Biology*, 11, 1307–1322.
- Pounds, J. A., Bustamante, M. R., Coloma, L. A., Consuegra, J. A., Fogden, M. P. L., Foster, P. N. et al. (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439, 161–167.
- Puschendorf, R., Hoskin, C. J., Cashins, S. D., McDonald, K., Skerratt, L. F., Vanderwal, J. et al. (2011). Environmental refuge from disease-driven amphibian extinction. *Conservation Biology*, 25, 956–964.
- Rachowicz, L. J., Hero, J., Alford, R. A., Taylor, J. W., Morgan, J. A. T., Vredenburg, V. T. et al. (2005). The novel and endemic pathogen hypotheses: competing explanations for the origin of emerging infectious diseases of wildlife. *Conservation Biology*, 19, 1441–1448.
- Ramsey, J., Reinert, L., Harper, L., Woodhams, D. C. y Rollins-Smith, L. A. (2010). Innate and adaptive immune defenses against a fungus linked to global amphibian declines in the South African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Infection and Immunity*, 78, 3981–3992.
- Richards-Zawacki, C. (2009). Thermoregulatory behaviour affects prevalence of chytrid fungal infection in a wild population of Panamanian golden frogs. *Proceedings the Royal Society of London*, 277, 519–528.
- Rohr, J. R. y Palmer, B. D. (2013). Climate change, multiple stressors, and the decline of ectotherms. *Conservation Biology*, 27, 741–751.
- Rollins-Smith, L. A. (1998). Metamorphosis and the amphibian immune system. *Immunological Reviews*, 166, 221–30.
- Rollins-Smith, L. A. y Conlon, J. M. (2005). Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations. *Microbiology and Immunology*, 29, 589–598.
- Rollins-Smith, L. A., Ramsey, J. P., Pask, J. D., Reinert, L. K. y Woodhams, D. C. (2011). Amphibian immune defenses against C chytridiomycosis: impacts of changing environments. *Integrative and Comparative Biology*, 51, 552–562.
- Ron, S. R. (2005). Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the new world. *Biotropica*, 37, 209–221.
- Rosenblum, E. B., James, T. Y., Zamudio, K. R., Poorten, T. J., Ilut, D., Rodríguez, D. et al. (2013). Complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed with genome resequencing data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 9385–9390.
- Rovito, S. M., Parra-Olea, G., Vásquez-Almazán, C. R., Papenfuss, T. J. y Wake, D. B. (2009). Dramatic declines in neotropical salamander populations are an important part of the global amphibian crisis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 3231–3236.
- Schloegel, L. M., Picco, A. M., Kilpatrick, A. M., Davies, A. J., Hyatt, A. D. y Daszak, P. (2009). Magnitude of the US trade in amphibians and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus infection in imported North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Biological Conservation*, 142, 1420–1426.
- Schloegel, L. M., Toledo, L. F., Longcore, J. E., Greenspan, S. E., Vieira, C. A., Lee, M. et al. (2012). Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology*, 21, 5162–5177.
- Scott, N. J. (1993). Post-metamorphic death syndrome. *Froglog*, 7, 1–2.
- Smith, H. M. y Taylor, E. H. (1948). An annotated checklist and key to the Amphibia of Mexico. *Bulletin of the United States National Museum*, 194, 1–118.
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S., Fishman, D. L. et al. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306, 1783–1786.
- UICN (Union Internacional para la Conservación de la Naturaleza). (2013). Recuperado el 05 diciembre 2013, de <http://www.iucnredlist.org>
- Van-Rooij, P., Martel, A., Nerz, J., Voitel, S., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F. et al. (2011). Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in mexican Bolitoglossine salamanders using an optimal sampling protocol. *EcoHealth*, 8, 237–243.
- Voyles, J., Berger, L., Young, S., Speare, R., Webb, R., Warner, J. et al. (2007). Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. *Diseases of Aquatic Organisms*, 77, 113–118.
- 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.
- Weldon, C., Du Preez, L. H., Hyatt, A. D., Muller, R. y Speare, R. (2004). Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases*,

10, 2100–2105.

- Wiesner, J. y Vilcinskis, A. (2010). Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*, *1*, 440–464.
- Woodhams, D. C., Vredenburg, V. T., Simon, M., Billheimer, D., Shakhtour, B., Shyr, Y. et al. (2007). Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*. *Biological Conservation*, *138*, 390–398.

- Young, B. E., Lips, K. R., Reaser, J. K., Ibáñez, R., Salas, A. W., Cedeño, J. R. et al. (2001). Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conservation Biology*, *15*, 1213–1223.
- Young, B. E., Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A. y Boucher, T. M. (2004). *Joyas que están desapareciendo: el estado de los anfibios en el Nuevo Mundo*. Arlington Virginia: Nature Serve.

Capítulo 2

Protocolo modificado para el aislamiento y cultivo del hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios mexicanos

Cinthyia Mendoza-Almeralla¹, Gabriela Parra-Olea^{1*}, Joaquín Cifuentes-Blanco²

¹Departamento de Zoología, Instituto de Biología, UNAM, México, D.F y ² Laboratorio de Biodiversidad y Biogeografía Ecológica de Hongos, Departamento de Biología comparada, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.

*autor de correspondencia

Resumen

La infección provocada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) se ha detectado en los cinco continentes, y ha provocado el declive de más de doscientas poblaciones de anfibios en el mundo. En Latinoamérica es necesario cultivar todas las cepas del patógeno para comprender las rutas y dispersión de cada una de ellas. Este trabajo es una modificación del trabajo de Longcore (2000) y pretende explicar de manera detallada el proceso de aislamiento y cultivo utilizado para obtener una cepa de *Bd* de México; con el fin de que otros científicos puedan realizarlo en su región de estudio.

Palabras clave: aislamiento, cultivo, *Batrachochytrium dendrobatidis*, anfibios neotropicales

Introducción

Batrachochytrium dendrobatidis (*Bd*) es un hongo quitridial acuático y patógeno de los anfibios (Longcore, 1999). La enfermedad ocasionada por *Bd* es la quitridiomycosis y en los anfibios provoca hiperplasia, asfixia, desequilibrio osmótico y problemas cardíacos llevando a la mortalidad en algunos casos (Berger *et al.*, 1999; Pessier *et al.*, 1999; Voyles *et al.*, 2007). Hasta el momento al patógeno se le ha implicado en el declive de más de doscientas poblaciones de anfibios en todo el mundo (Wake y Vredenburg, 2008). La infección inicia cuando las zoosporas se alojan dentro de las células del estrato corneo de la epidermis de los anfibios (Berger *et al.*, 2005). Posteriormente se convierten en zoosporangios que producen nuevas zoosporas y que son expulsadas al medio ambiente (Berger *et al.*, 2005).

La quitridiomycosis es una enfermedad emergente en todos los continentes excepto la Antártida (Fisher *et al.*, 2009; Olson *et al.*, 2013), por lo que los científicos requieren conocer las cepas existentes en cada región con el fin de determinar diferencias en la virulencia, encontrar las rutas y mecanismos de entrada y dispersión del patógeno y establecer los lugares de monitoreo y detección de la infección. Longcore (2000) realizó una descripción general de los métodos de aislamiento, cultivo y preservación del patógeno. Sin embargo, durante varios intentos por realizar este procedimiento en México se ha determinado que en el protocolo no se especificaron algunos de los procedimientos importantes para lograr un aislamiento sin contaminación por otros microorganismos. El presente trabajo pretende realizar una descripción detallada de las modificaciones al protocolo original para su implementación en anfibios neotropicales. Particularmente proporcionamos datos sobre: el tamaño adecuado de tejido para su

observación en el microscopio, el número determinado de estrias de limpieza en los tejidos y la correcta esterilización de los instrumentos en diferentes momentos del cultivo de la cepa. Estos datos son muy importantes para un aislamiento y crecimiento de *Bd* sin contaminación de otros microorganismos.

Aislamiento y cultivo de *Batrachochytrium dendrobatidis*

El patógeno se aisló a partir de las especies *Hyla eximia* y *Pseudoeurycea leprosa*. Los organismos se mantuvieron en recipientes individuales a una temperatura de 20 °C hasta que en cada uno de ellos se inició el protocolo de aislamiento en un periodo máximo de dos días después del sacrificio.

Sacrificio de los organismos.

Se sacrificó un individuo a la vez inyectando 0.2 ml de pentobarbital a la altura del corazón. No se utilizaron sustancias como clorotono o lidocaína para favorecer la supervivencia del patógeno en la piel. Posterior a la muerte los organismos, estos se mantuvieron a una temperatura de 5 °C con el fin de conservar el tejido en buen estado.

Corte y detección del patógeno.

En los anuros se realizaron cortes de piel de aproximadamente 2 mm² en la zona inguinal y en los dígitos. En el caso de *P. leprosa* los cortes fueron del mismo tamaño y se realizaron en el lado plantar de las extremidades, en la zona ventral del abdomen y en la sección dorsal y ventral de la cola, ya que son los sitios con mayor prevalencia de la infección en este grupo (Rooij et al., 2011). Es importante señalar que cuando se analizaron los cortes en *Pseudoeurycea leprosa*, la pigmentación de la piel no permitió distinguir el espacio intracelular en el que se encuentra el patógeno, por lo que se realizó un raspado de la piel en los mismos sitios y se obtuvieron segmentos de piel más finos (Fig. 1). Cada tejido se colocó en un portaobjetos y se cubrió con una gota de agua destilada esterilizada, un cubreobjetos y después se observó bajo el microscopio óptico con un lente de 40x, para identificar los zoosporangios de *Bd* (Fig.2).

Limpieza y cultivo de tejidos.

Una vez que en los tejidos se identificaron los zoosporangios con zoosporas móviles en su interior, se trasladaron a una caja de Petri con medio de cultivo con antibióticos (Longcore, 2000) para limpiar cada segmento de piel. Cada tejido se dividió en segmentos de aproximadamente 1 mm² con ayuda de un microscopio estereoscópico. Posteriormente el tejido fue limpiado realizando como mínimo ocho estrías. Cada estría se formó colocando el tejido a una profundidad de medio centímetro en un extremo de la caja

de Petri con medio de cultivo sólido y se deslizó con ayuda de una aguja de disección hasta el otro extremo (Fig. 3). Al inicio de cada estría se esterilizó la aguja de disección con alcohol y fuego. Finalmente diez tejidos limpios se inocularon en el borde de una nueva caja de medio con antibióticos (Fig. 4). Por último, se selló la caja de inoculación con papel parafilm y se colocó en un sistema cerrado con temperatura de 20 °C.

En total se cultivaron 30 cortes de piel de *Hyla eximia* y 100 de *P. leprosa*. Se revisaron diariamente para verificar si había contaminación por bacterias o aparición de zoosporangios. La observación se realizó colocando la base de la caja debajo de un lente de 10x. Cuando se distinguieron colonias de bacterias se retiró el medio contaminado con un bisturí estéril en una campana de flujo laminar y se sellaron las cajas de Petri. En ambos grupos se observaron zoosporangios en algunos tejidos después de la segunda semana de cultivo. Cabe destacar que el 90% de los tejidos de piel de *P. leprosa* se contaminaron por otro patógeno, el 40 % no obtuvo crecimiento del patógeno y en el 10 % se observaron zoosporangios y zoosporas móviles (Fig 5 y 6). En lo que respecta a *Hyla eximia* se observó contaminación en el 10 % de los tejidos, en el 70 % no se obtuvo crecimiento del patógeno y en el 20 % se observaron zoosporas móviles.

Transferencia de colonias.

A los diez días de la observación de zoosporas móviles se trasladaron los cultivos a una campana de flujo laminar. Con ayuda de una aguja de disección estéril se transfirió cada colonia de *Bd* dividiéndola en 5 secciones en una caja nueva de medio de cultivo sin antibióticos. Posterior a las tres semanas de revisión diaria, se transfirió el quitridio cortando un cuadrado de 1 cm² de medio de cultivo con zoosporas móviles y se colocó en una caja de Petri con medio sólido sin antibióticos. Al momento del contacto el cuadro con crecimiento de *Bd* se deslizó cinco centímetros en línea recta para distribuir los zoosporangios y zoosporas (Fig. 7). Por último se selló la caja y se colocó en el sistema cerrado con 23 °C. Este procedimiento de transferencia se realizó cada tres semanas o cuando la colonia del patógeno estuvo completamente extendida en el medio y las zoosporas aun eran móviles.

Adicionalmente se preparó medio de cultivo líquido (Longcore, 2000) con el fin de obtener mayor crecimiento del patógeno. El procedimiento se realizó colocando el cuadro de 1 cm² de medio sólido con zoosporas a un tubo tipo falcón con 35 ml de medio líquido, el cual se introdujo en un sistema cerrado con 10 °C. A los diez días por medio de una micropipeta y puntas estériles se extrajo 500 microlitros del medio líquido con zoosporas y se transfirieron a una caja de Petri con medio de cultivo sólido sin antibióticos. En un lapso no mayor a cinco días se observó el crecimiento del patógeno. Además se revisó la supervivencia de las zoosporas en los medios de cultivo líquido una vez al mes. El procedimiento consistió en obtener 50 microlitros de medio líquido y observarlos con el microscopio

óptico. Al momento de advertir poca movilidad de zoosporas se realizó una transferencia de 1000 microlitros de medio líquido con zoosporas a otro tubo con 35 mililitros de medio de cultivo líquido con el fin de preservar la supervivencia.

Consideraciones finales

A través de varios intentos de aislamiento y cultivo del patógeno se analizaron las causas del fracaso en la obtención de la cepa. La causa mayor fue la contaminación por microorganismos; por lo que se optimizaron las condiciones de asepsia mencionadas por Longcore (2000). Las medidas de asepsia se resumen en: 1) esterilizar continuamente el área de trabajo, 2) flamear los instrumentos cada que se cortó un tejido o al realizar cada estría de limpieza, 3) cortar tejidos de piel de 1 a 2 mm y limpiarlos por medio de ocho estrías en un medio sólido con antibióticos, 4) inocular tejidos que presenten zoosporangios con zoosporas móviles al interior y que no contengan bacterias y protozoarios.

Durante múltiples intentos de aislamiento se observó una gran cantidad de bacterias y protozoarios en la muda de piel de *Pseudoeurycea leprosa* e *Hyla eximia*, además de que se contaminaron la mayoría de los inóculos provenientes de ese tejido. Por lo que a diferencia de Longcore (2000), este protocolo señala que no es adecuado utilizar la muda de piel para aislar y cultivar *Bd*, pero si es la única fuente del patógeno se sugiere la realización de mayor número de estrías e inocular menor número de tejidos en la caja de cultivo, con el fin de evitar medio de cultivo contaminado.

Otra contribución del presente protocolo es el método para obtener tejidos de caudados y la advertencia de realizar el corte y análisis de piel dentro de los dos días posteriores a la muerte del organismo.

Literatura citada

Berger, L., R. Speare y A. Hyatt. 1999. Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. In: A. Campbell (ed), Declines and disappearances of Australian frogs. Environment, Canberra. p. 23-33.

Berger, L., A. D. Hyatt, R. Speare y J.E. Longcore. 2005. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. Diseases of aquatic organisms 68:51-63.

Fisher, M. C., T. W. Garner y S. F Walker. 2009. Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. Annual Review of Microbiology 63:291-310.

Longcore, J.E., A.P. Pessier y D.K. Nichols. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. Mycologia 91:219-227.

Longcore, J. E. 2000. Culture techniques for amphibian chytrids: Recognizing, isolating and culturing *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. Proceedings of Getting the Jump! On Amphibian Diseases Conference. Cairns, Australia, agosto 26-30, p.52-54.

Olson, D. H., D. M. Aanensen, K. L. Ronnenberg, C.I. Powell, S. F. Walker, J. W. Bielby, T.W. J Garner, G .Weaver, The Bd Mapping Group y M.C. Fisher. 2013. Mapping the global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the amphibian chytridfungus. PLoS One 8, e56802.

Pessier, A., D. Nichols, J. Longcore y M. Fuller. 1999. Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and white's tree frogs (*Litoria caerulea*). Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 11:194-199.

Van- Rooij, P., A. Martel, J. Nerz, S. Voitel, F. Van Immerseel, F. Haesebrouck, Pasmans. 2011. Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in mexican *Bolitoglossine salamanders* using an optimal sampling protocol. EcoHealth, 8:237-243.

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

Wake, D. B y V. T. Vredenburg. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians.Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A. 105:11466-11473.

Figuras

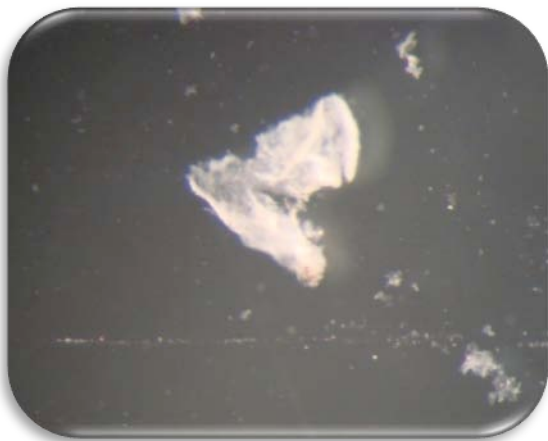


Figura 1. Tejido obtenido por medio del raspado de piel.



Figura 2. Observación de zoosporangios de *Bd* con un objetivo de 40x.

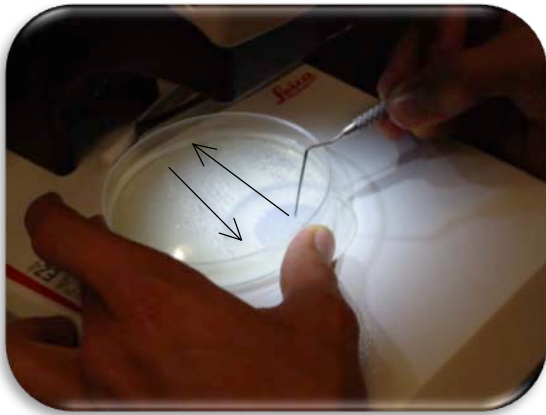


Figura 3. Realización de las estrías para limpiar el tejido de piel.



Figura 4. Colocación de 10 tejidos limpios en una caja de medio con antibióticos.



Figura 5. Zoosporangios en el tejido de *P. leprosa*.

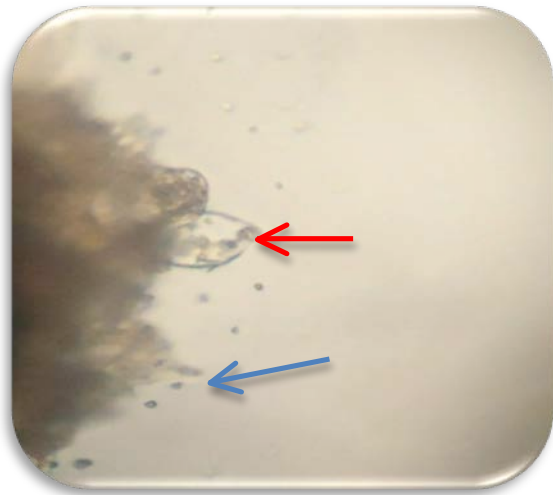


Figura 6. Observación de zoosporas. La flecha azul indica una zoospora móvil y la flecha roja señala el zoosporangio.

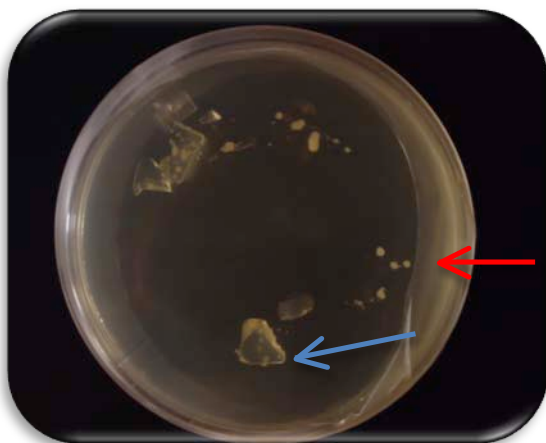


Figura 7. Observación a los 7 días de la transferencia de *Bd* a un nuevo medio. La flecha roja indica el inicio del deslizamiento del cuadro con medio y zoosporas. La flecha azul señala el cuadro de medio original con zoosporas.

ITS1 Copy Number Varies among *Batrachochytrium dendrobatidis* Strains: Implications for qPCR Estimates of Infection Intensity from Field-Collected Amphibian Skin Swabs

Ana V. Longo^{1*}, David Rodriguez¹, Domingos da Silva Leite², Luís Felipe Toledo³, Cinthya Mendoza Almeralla⁴, Patricia A. Burrowes⁵, Kelly R. Zamudio¹

¹ Department of Ecology and Evolutionary Biology, Cornell University, Ithaca, New York, United States of America, ² Laboratório de Antígenos Bacterianos II, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, Brazil, ³ Museu de Zoologia “prof. Adão José Cardoso”, Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, Brazil, ⁴ Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México, ⁵ Department of Biology, University of Puerto Rico, San Juan, Puerto Rico

Abstract

Genomic studies of the amphibian-killing fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*, [Bd]) identified three highly divergent genetic lineages, only one of which has a global distribution. Bd strains within these lineages show variable genomic content due to differential loss of heterozygosity and recombination. The current quantitative polymerase chain reaction (qPCR) protocol to detect the fungus from amphibian skin swabs targets the intergenic transcribed spacer 1 (ITS1) region using a TaqMan fluorescent probe specific to Bd. We investigated the consequences of genomic differences in the quantification of ITS1 from eight distinct Bd strains, including representatives from North America, South America, the Caribbean, and Australia. To test for potential differences in amplification, we compared qPCR standards made from Bd zoospore counts for each strain, and showed that they differ significantly in amplification rates. To test potential mechanisms leading to strain differences in qPCR reaction parameters (slope and y-intercept), we: a) compared standard curves from the same strains made from extracted Bd genomic DNA in equimolar solutions, b) quantified the number of ITS1 copies per zoospore using a standard curve made from PCR-amplicons of the ITS1 region, and c) cloned and sequenced PCR-amplified ITS1 regions from these same strains to verify the presence of the probe site in all haplotypes. We found high strain variability in ITS1 copy number, ranging from 10 to 144 copies per single zoospore. Our results indicate that genome size might explain strain differences in ITS1 copy number, but not ITS1 sequence variation because the probe-binding site and primers were conserved across all haplotypes. For standards constructed from uncharacterized Bd strains, we recommend the use of single ITS1 PCR-amplicons as the absolute standard in conjunction with current quantitative assays to inform on copy number variation and provide universal estimates of pathogen zoospore loads from field-caught amphibians.

Citation: Longo AV, Rodriguez D, da Silva Leite D, Toledo LF, Mendoza Almeralla C, et al. (2013) ITS1 Copy Number Varies among *Batrachochytrium dendrobatidis* Strains: Implications for qPCR Estimates of Infection Intensity from Field-Collected Amphibian Skin Swabs. PLoS ONE 8(3): e59499. doi:10.1371/journal.pone.0059499

Editor: Tom Coenye, Ghent University, Belgium

Received November 14, 2012; Accepted February 14, 2013; Published March 21, 2013

Copyright: © 2013 Longo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was funded by National Science Foundation grants DEB-0815315, DEB-1120249, and DBI-0905810 (to DR). SUNY/Sage Diversity Fellowships and Ford Foundation's Pre-Doctoral Fellowship supported of the authors (AVL). A percentage of the funding for the author publication charges came from the Cornell Open Access Publication Fund (<http://compact.library.cornell.edu>), which is funded jointly by the Cornell University Office of the University Provost and Cornell University Library. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: av17@cornell.edu

Introduction

Advances in quantitative polymerase chain reaction (qPCR) protocols and their application in detection and quantification of pathogens have contributed significantly to our understanding of disease dynamics in natural host populations [1,2]. Disease ecologists investigating the amphibian-killing fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis* [Bd]) use qPCR to detect the pathogen on the skin of wild amphibian populations, providing a non-invasive sampling method that can yield diagnosis within a few hours [2,3]. Bd detection via qPCR has allowed researchers to detect infection levels in natural populations at different stages of emerging epidemics [4], track outbreaks that cause amphibian declines [5],

establish disease thresholds predicting frog mortality [6], and reconstruct historical Bd epizootic waves spreading through naïve populations [7].

Recent genomic characterization of 20 global Bd strains indicates that Bd is composed of at least three divergent genetic lineages that differ in virulence [8]. One of these lineages, the global panzootic lineage (GPL) is hypervirulent and has been implicated in the recent epizootics [8]. In addition, a novel Bd strain recently discovered in Brazil differs in DNA content compared to GPL strains from Panama and California [9]. If these deeply-divergent strains carry polymorphisms at the primer or probe binding sites or if target ITS1 genes vary in copy number, then qPCR efficiency and sensitivity among strains may also vary

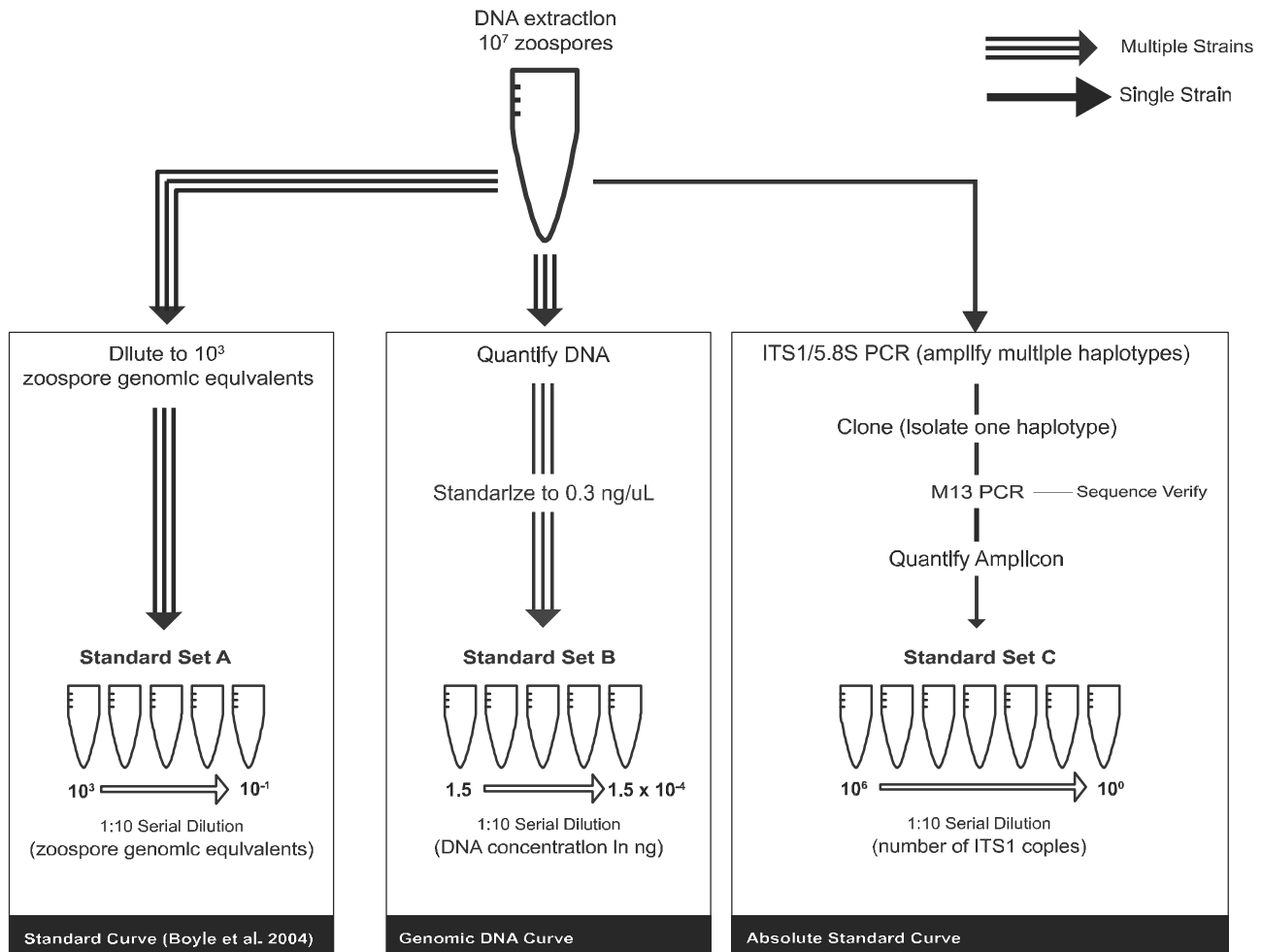


Figure 1. Schematic view of standard set preparations used in this study.
doi:10.1371/journal.pone.0059499.g001

[1,10], which will reduce the comparability of qPCR infection intensity estimates across sites.

To generate standards for quantification of *Bd* via qPCR, researchers count zoospores from cultured *Bd* strains, extract genomic DNA (gDNA), and serially dilute to the desired concentrations (usually 100 to 0.1 zoospore genomic equivalents [2,3]). The forward primer/probe combination of the qPCR TaqMan assay anneals to the internal transcribed spacer (ITS1) region, which is a rapidly evolving nuclear ribosomal repeat unit used for species-level identification [3,11]. In fungal genomes, this region occurs in multiple copies providing over 100 potential primer/probe binding sites per haploid genome [3] and in *Bd* it can be repeated up to 169 times [12]. Duplications or deletions of genomic regions that include ITS1 sequences may result in over- or underestimation of zoospore load by established qPCR methods [3] because fluorescence and copy number in template DNA are linearly related.

In this study, we quantified and characterized ITS1 regions in multiple *Bd* strains to evaluate the effects of copy number and sequence variation on qPCR efficiency and zoospore quantification among strains. We quantified three different template preparations for each *Bd* strain including 1) genomic DNA (zoospore counts), 2) equimolar DNA solutions, and 3) ITS1 PCR amplicons. For each strain template, we tested differences in cycle threshold (C_t), defined as the point on the amplification curve

associated with exponential growth of PCR product. We then used ITS1 PCR amplicons as a standard to quantify the ITS1 copy number from our focal strains. Finally, we cloned and Sanger-sequenced ITS1 PCR amplicons to compare ITS1 haplotype diversity among strains, which could lead to differences in amplification rates. Our study highlights the importance of understanding the evolutionary history of *Bd* at each sampling locality and the caveats of using genomic DNA as a standard for qPCR. We include a step-by-step protocol (Supporting Information) so *Bd* researchers can measure ITS1 copy numbers from any uncharacterized *Bd* strain and estimate infection intensity from field-collected amphibian skin swabs.

Methods

Bd Strain Selection

We used *Bd* strains isolated from amphibian hosts in different countries to generate replicate sets of DNA standards for qPCR: JEL404 (USA, Maine), MexMkt (Mexico), JEL427 (Puerto Rico, Luquillo), PAB01 (Puerto Rico, Maricao), LFT001_01 (Brazil, São Paulo), CLFT023 (Brazil, Minas Gerais), CLFT024 (Brazil, Paraná), and LBabercrom (Australia). Most of these *Bd* strains belong to the global panzootic lineage (GPL, sensu Farrer et al. [8]) except LFT001_01 which is a highly divergent strain of *Bd* [9]. Therefore, our strain selection encompasses much of the known

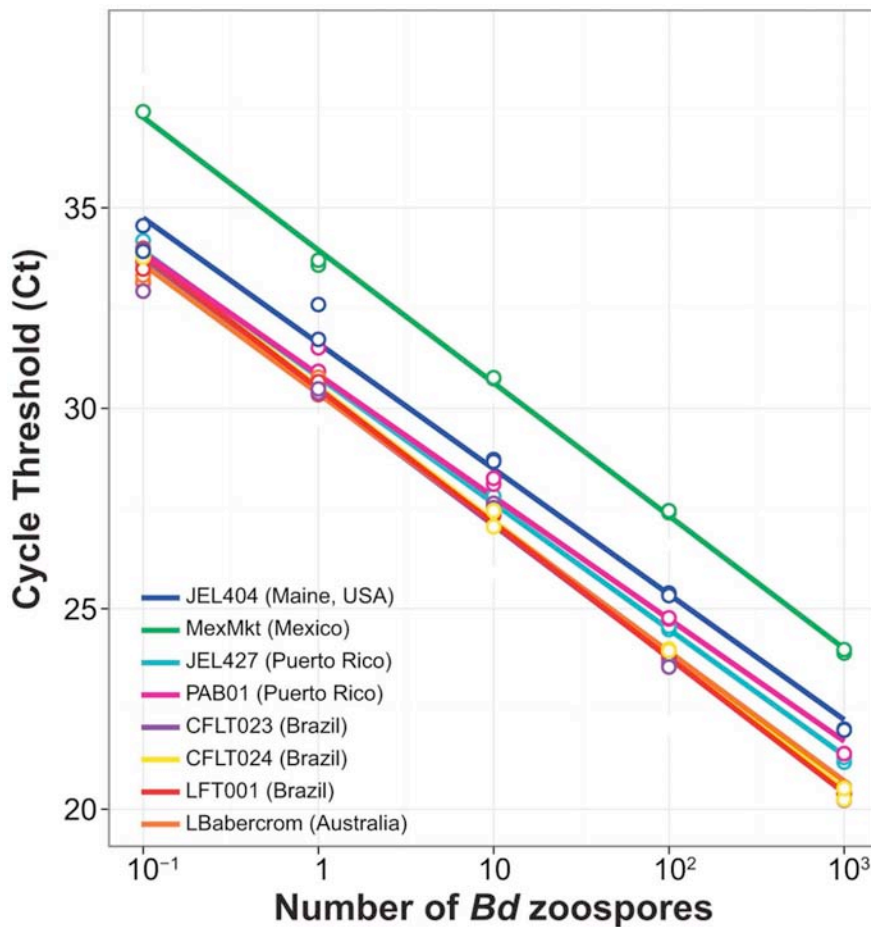


Figure 2. Standard curve regression lines for multiple isolates of *Batrachochytrium dendrobatidis* based on zoospore counts (Standard Set A).

doi:10.1371/journal.pone.0059499.g002

global genetic variation in *Bd*. In addition, our focal strains include *Bd* isolated from the same host species at small spatial scales (e.g. Puerto Rican *Eleutherodactylus coqui*, JEL427 and PAB01) to others cultured from different host species across the New World

(JEL404, MexMkt and Brazilian strains: LFT001, CLFT023, and CLFT024). Because *Bd* quantification methods were developed using Australian strains [2,3,13], we included LBAbercrom for comparison.

Table 1. Standard curve equations, reaction efficiencies and starting DNA concentrations of eight *Batrachochytrium dendrobatidis* strains.

Strain	Origin	DNA Concentration (ng/mL) \pm SD	Standard Set A: Zoospore Counts (R^2)	Efficiency ($10^{-(2.1/\text{slope})}$ -16100%)	Standard Set B: DNA dilutions (R^2)	Efficiency (%)
JEL404*	USA (Maine)	0.33 \pm 0.01	$y = 23.13x + 31.6$ (0.990)	109%	$y = 23.42x + 14.3$ (0.999)	96.1%
MexMkt	Mexico	1.01 \pm 0.04	$y = 23.31x + 33.9$ (0.999)	101%	$y = 23.48x + 15.9$ (0.996)	93.8%
JEL427	Puerto Rico	2.76 \pm 0.06	$y = 23.15x + 30.8$ (0.998)	108%	$y = 23.44x + 14.5$ (0.999)	95.3%
PAB01*	Puerto Rico	0.65 \pm 0.04	$y = 23.05x + 30.8$ (0.992)	113%	$y = 23.28x + 16.3$ (0.997)	102%
LFT001_01	Brazil	4.11 \pm 0.10	$y = 23.36x + 30.5$ (0.999)	98.4%	$y = 23.48x + 14.3$ (0.999)	93.8%
CLFT023	Brazil	2.09 \pm 0.05	$y = 23.35x + 30.4$ (0.993)	98.8%	$y = 23.36x + 13.2$ (0.999)	98.4%
CLFT024*	Brazil	4.64 \pm 0.03	$y = 23.35x + 30.5$ (0.993)	98.8%	$y = 23.52x + 15.1$ (0.999)	92.3%
LBAbercrom	Australia	1.34 \pm 0.05	$y = 23.22x + 30.4$ (0.997)	104%	$y = 23.55x + 12.6$ (0.999)	91.3%

Standard curve coefficients (slopes and intercepts) were estimated from the linear regression equation between cycle threshold (Ct) and log-transformed zoospore counts. Average (\pm SD) DNA concentration of extracts is based on 10^7 zoospores in 200 μ L extraction buffer.

* 10^6 zoospores.

doi:10.1371/journal.pone.0059499.t001

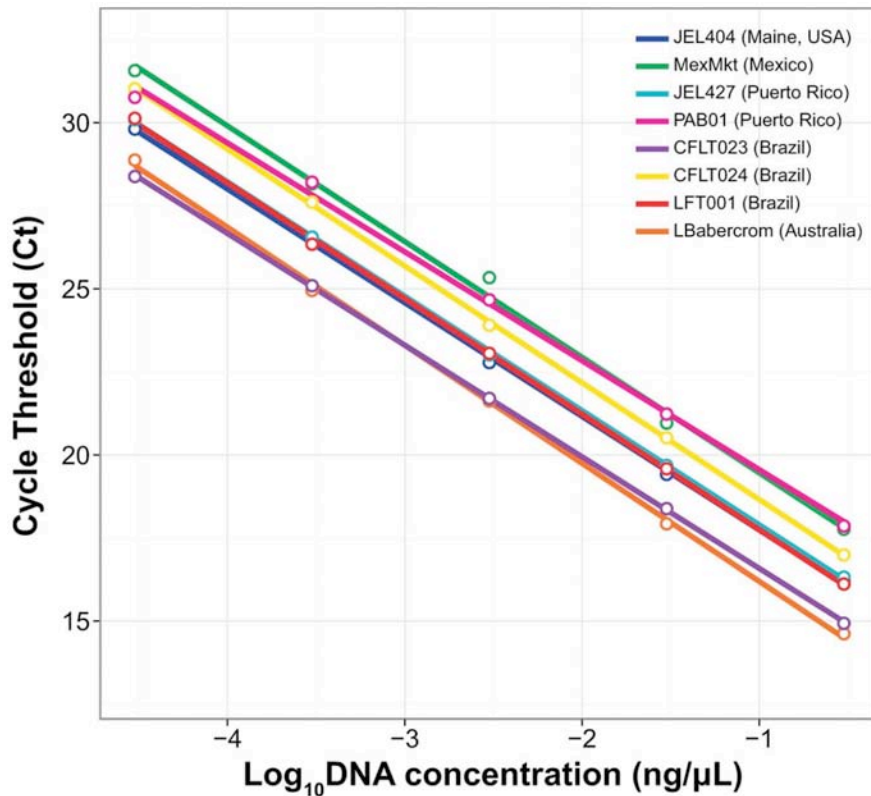


Figure 3. Standard curve regression lines for multiple strains of *Batrachochytrium dendrobatidis* based on equimolar DNA solutions starting at 0.3 ng mL^{-21} (Standard Set B). doi:10.1371/journal.pone.0059499.g003

DNA Extraction from *Bd* Cultures

We grew *Bd* strains on 1% mTGH agar with penicillin-G and streptomycin sulfate [14]. We flooded five-day-old colonies from at least five separate plates with distilled water [14], and pooled all harvested zoospores for use in standards. The zoospore solution was filtered using a 10 mm filter (Pall Acrodisc syringe filter AP-4001T) to ensure that zoosporangia were not present in the suspension. Using a 5% iodine solution (one part 10% povidone iodine: one part distilled water) we killed and stained a small aliquot (50 mL) of the zoospores to facilitate counting in a hemocytometer. We performed 10 individual counts for each strain and used the average count value to estimate the concentration of zoospores. We used these concentrations to make five to ten aliquots of 10^7 zoospores mL^{-21} for each strain. We then centrifuged all the aliquots at high speed (13,000g) for five minutes to obtain a zoospore pellet. We removed the supernatant and extracted the DNA from the pellet using 200 mL Prepman Ultra (Applied Biosystems, Inc.) following Boyle et al. [3], and measured the concentration of DNA in three extracts per strain using QubitH double strand DNA high sensitivity assay (Life Technologies, Inc) (Table 1).

Bd Strain Comparison, ITS1 Copy Number and Real-time qPCR TaqMan Assay

Our goal was to evaluate the qPCR assay performance parameters (slope and intercept) for several *Bd* strain preparations to compare their efficiency as absolute quantification standards (Fig. 1). qPCR performance parameters are important in determining whether the target PCR product successfully doubles with each amplification cycle [1,15]. To test for potential biases

during the DNA extraction and PCR amplification, we compared two standard sets made from PrepMan extracts: the first quantified by direct zoospore counts (Standard Set A) and the second based on equimolar DNA concentration dilutions for each strain (Standard Set B). If these two standard sets vary in amplification rates or in performance parameters among different *Bd* strains, we can infer that either the zoospore extraction efficiencies differ between the strains, or that genomic changes among strains cause differences in their amplification efficiencies.

For Standard Set A (based on zoospore counts), we assumed 100% extraction efficiency and serially diluted to the required concentrations following Boyle et al. [3]. We quantified DNA extracts of 10^7 zoospores mL^{-21} three times using a QubitH. For Standard Set A, we used a 5-log dynamic range starting at 10^3 zoospore genomic equivalents in 5 mL (Fig. 1). For Standard Set B (based on equimolar DNA concentrations) we diluted the DNA extracts of each strain to make an aliquot with a final concentration of 0.3 ng mL^{-21} , which is within the detectable range of the QubitH. This amount of DNA roughly contains the genetic material of $\sim 6,000$ zoospores mL^{-21} (based on a 46 Mb diploid genome size [16]). For Standard Set B we used a 5-log dynamic range starting at 0.3 ng mL^{-21} (Fig. 1).

We performed endpoint PCR on strain JEL427 (Puerto Rico) using primers ITS1-3 Chytr and 5.8S Chytr (hereafter ITS1/5.8S region, ~ 146 bp) [3]. The resulting amplicons were cloned into the pGEM-T Easy Vector (Promega) and transformed into *E. coli* competent cells. To verify that bacterial cells incorporated the insert, we used blue-white screening, amplified the plasmid using M13 primers, and visualized the products on a 1.75% agarose gel. We cleaned the PCR products with ExoSap and quantified them

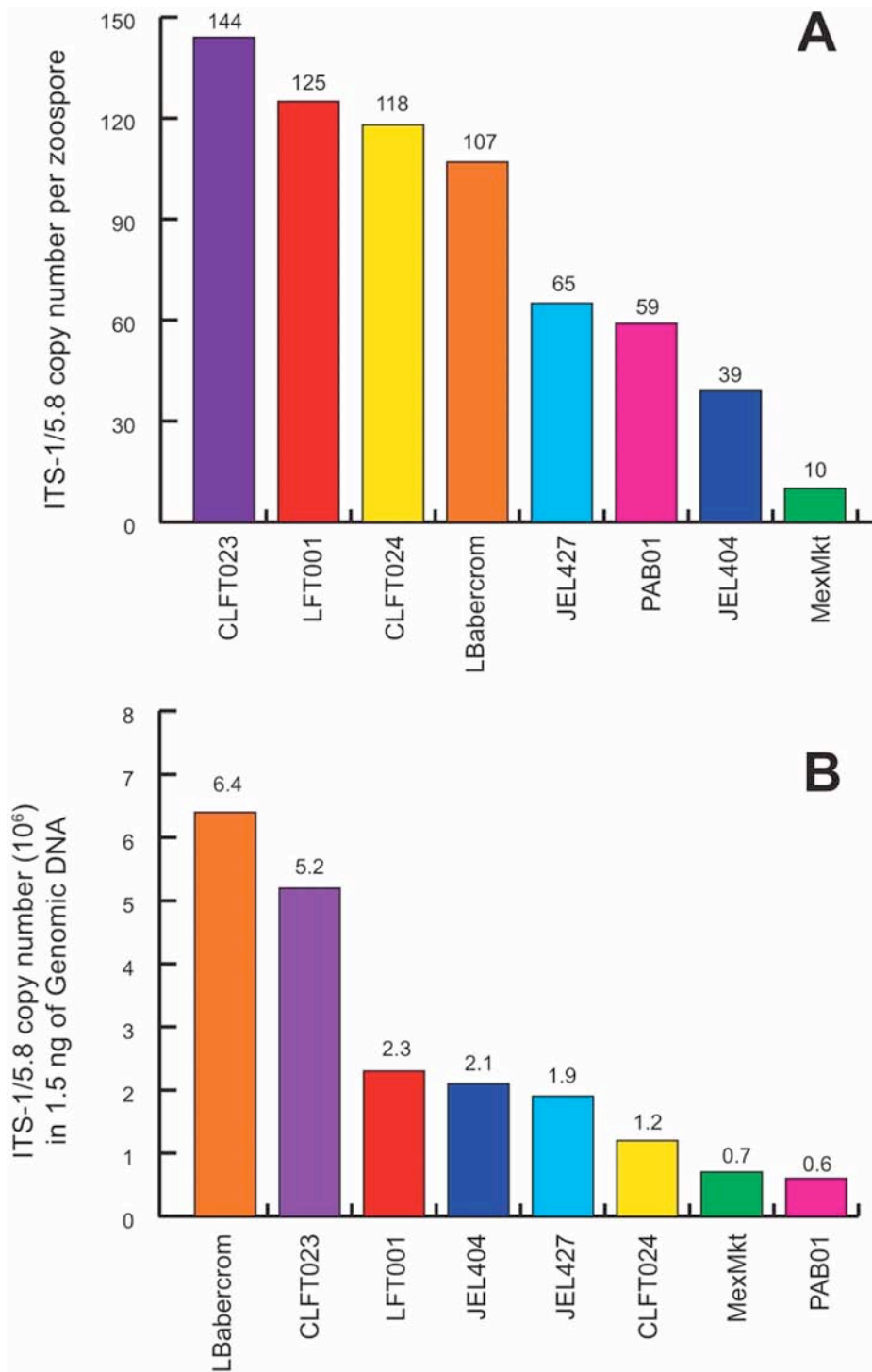


Figure 4. Estimated ITS1 copy number variation for each *Batrachochytrium dendrobatidis* isolate using PCR amplicons in (A) one zoospore, and (B) in 1.5 ng DNA.
doi:10.1371/journal.pone.0059499.g004

with the Qubit[®] to estimate the mass of a fragment containing one copy of the ITS1/5.8S region. We estimated that this fragment weighs 4.10×10^{-210} ng, based on the total length of the M13 PCR-amplicon fragment (400 bp, including the 146 bp insert plus 254 bp of flanking vector sequence) and the average weight of one base pair (660 Da). Then, we built our third serial dilution (Standard Set C: PCR Amplicon, Fig. 1) with a 5-log dynamic

range starting at 2.0×10^5 copies of ITS1 mL^{-21} . We used Standard Set C in qPCR reactions to infer the absolute number of ITS1 copies found in the 10^3 zoospore extracts for each strain (based on zoospore counts in Standard Set A) and in 1.5 ng of DNA (Standard Set B).

We modified the qPCR protocol in Boyle et al. (2004) by adding BSA [13] and using Fast Advanced Master Mix (Applied

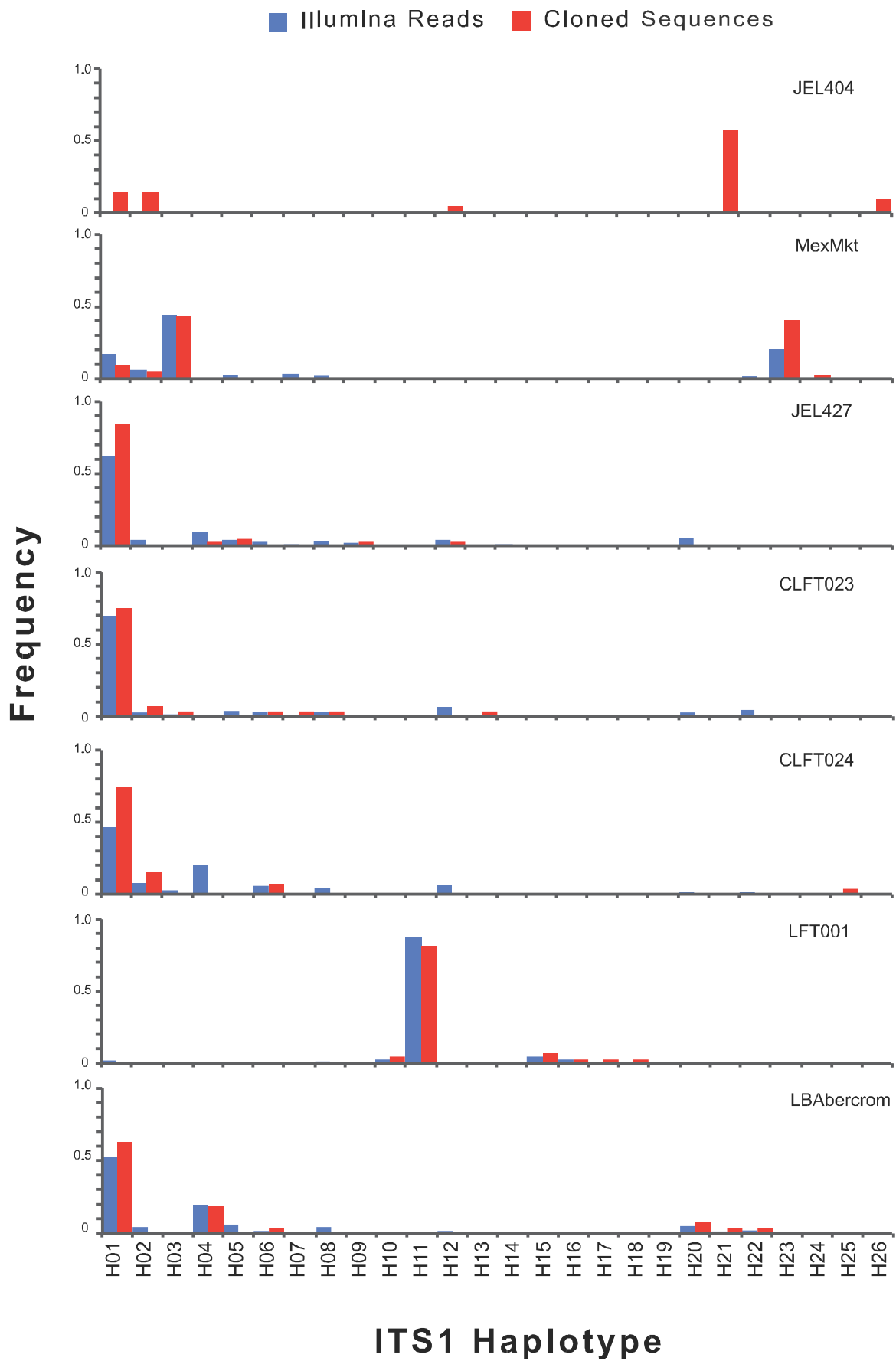


Figure 5. ITS1 haplotype frequencies for each strain. Proportions were estimated using Illumina sequencing (blue) and cloning/Sanger sequencing (red). doi:10.1371/journal.pone.0059499.g005

Biosystems Inc.). We verified qPCR runs by performing duplicate reactions for each standard on an Applied Biosystems ViiA7. We did not set a standard curve a priori, rather we included Standard Set C in all qPCR runs and measured the cycle threshold (C_t) value for each of the dilution curves in Standard Sets A and B. We considered two threshold values in our analyses, the automatic threshold set by the ViiA7 software and a custom threshold of 0.1 to standardize among different runs.

ITS1 Haplotype Diversity

To assess ITS haplotype diversity among strains, we cleaned 400-bp PCR amplicons (M13+ ITS1/5.8S region) using ExoSAP and sequenced 21–43 clones per strain using Big Dye v3.1 chemistry on an ABI 3730 sequencer (Applied Biosystems, Inc.). We aligned and edited chromatograms using Sequencher (Gene Codes Corp.), identified all unique haplotypes, and calculated haplotype frequency [defined as the number of sequences of particular haplotype over the total number of sequences for each strain]. We also verified the presence of the probe-binding site in each haplotype sequence.

We searched whole genome sequence data (Rosenblum et al. unpublished) for strains MexMkt (Mexico), JEL427 (Puerto Rico), LFT001_01 (Brazil), CLFT023 (Brazil), CLFT024 (Brazil), and LBAbercrom (Australia) to assess whether the ITS1 haplotypes detected through cloning occurred in similar frequencies as in the genomic data. To estimate ITS1 haplotype frequencies in Bd

genomes, we counted the number of times that each haplotype sequence recovered through cloning (truncated to a variable 35 bp fragment, see Fig. S1) was found among raw Illumina reads for each strain.

Statistical Analyses

Using analyses of covariance, we tested for the effect of strains in the relationship between the number of genomic equivalents and C_t by fitting separate linear regressions for each standard set. If amplification efficiency among strains varied, we expected significantly different slopes and significant interaction terms across strains. If the number of ITS1 regions varied among strains, we expected differences in the y-intercept of the regression lines. We applied Tukey’s Honestly Significant Differences (HSD) to determine which pairwise strain comparisons were statistically different. To quantify the number of ITS1/5.8S regions in each strain, we used a standard curve based on the ITS1 PCR-amplicon (Standard Set C) against each of the zoospore-based serial dilutions (Standard Set A and Standard Set B). We performed all statistical analyses using R [17].

We compared the number of ITS1 haplotypes recovered by cloning and whole genome sequencing using a paired t-test. Finally, we calculated ITS1 haplotype frequencies for both data sets and estimated pairwise genetic differentiation among the ITS1 haplotypes for each Bd strain using F_{ST} statistics implemented in Arlequin 3.5 [18].

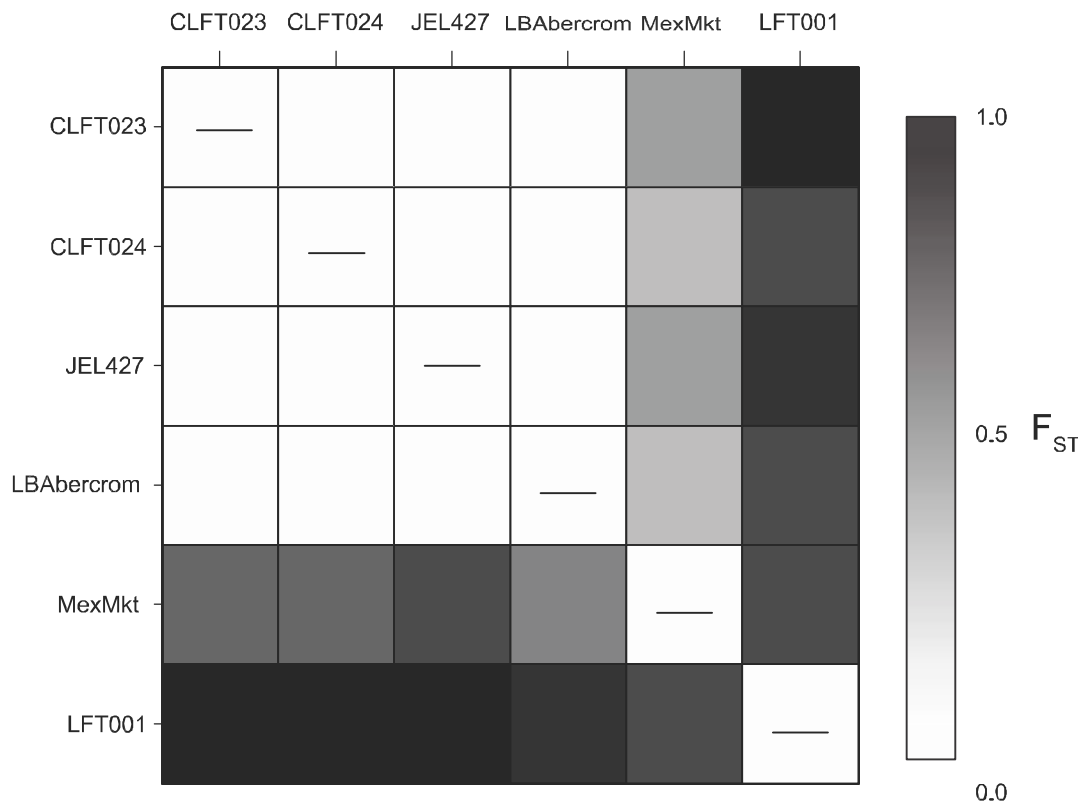


Figure 6. Pairwise F_{ST} values based on ITS1 haplotype frequencies in each Bd strain. Upper and lower diagonals are pairwise F_{ST} values estimated from ITS1 haplotypes obtained by cloning/Sanger sequencing, and from Illumina sequencing, respectively. Darker shades represent greater genetic differentiation. doi:10.1371/journal.pone.0059499.g006

Results

Differences in C_t Values from Zoospore Counts (Standard Set A) and Equimolar DNA Dilutions (Standard Set B)

As expected, we found a significantly negative relationship between the number of zoospores and cycle threshold number, C_t ($B = 23.31$, $T = 244.93$, $P < 0.000$, Fig. 2). The best-fit regression model showed independent slopes and intercepts among Bd strains, and a significant interaction term between log₁₀-transformed zoospore number and strain ($F_{7,2} = 2.64$, $P = 0.018$) (Table 1). All standard curves made from zoospore counts (Standard Set A) exhibited similar intercepts, except the MexMkt (Mexico) strain ($F_{7,2} = 134.5$, $P < 0.001$, Fig. 2). MexMkt showed a higher intercept value for any given zoospore quantity indicating that this strain has fewer ITS1 copies per zoospore. The interaction effect between slope and intercept was driven by a significantly lower slope in strain PAB01 (Puerto Rico) ($B = 23.05$, $T = 2.55$, $P = 0.013$) and a marginally lower slope in JEL404 (USA) ($B = 23.13$, $T = 1.76$, $P = 0.083$). Therefore, most strains had similar amplification efficiencies (~98%) with the exception of PAB01 (Puerto Rico) and JEL404 (USA) which showed slightly higher efficiencies (Table 1).

The same starting number of zoospores (10^7) extracted from each Bd strain had different DNA concentrations, that ranged from 1.01 to 4.11 ng mL⁻²¹ based on QubitH quantification (Table 1). These differences among strains could occur by four possible mechanisms: (1) contamination with other microorganisms, (2) error or low resolution in DNA quantification, (3) differences in DNA extraction efficiency, or (4) different genome sizes. We grew all cultures on antibiotics and did not observe other microorganisms while counting zoospores; therefore, it is unlikely that contamination alone accounts for the large differences across strains. We ruled out the second hypothesis, because we found only negligible variation among three replicate QubitH measurements for each of the three 10^7 zoospore extracts per strain (Table 1). Finally, the third scenario is also unlikely, because we simultaneously extracted all strains using the same extraction reagents and protocols. These differences in amplification rates remained even after diluting all strains to the same DNA concentration (Standard Set B); thus, we can infer that differences in Bd genome size underlie the biases in quantification of DNA template among strains.

qPCR of equimolar Bd DNA dilutions (Standard Set B) showed a significant negative relationship between nanograms of DNA and C_t ($B = 23.34$, $T = 2135.99$, $P < 0.001$, Fig. 3). In contrast to the zoospore regression models, the best model fitted independent intercepts for every strain in our study ($F_{7,2} = 161.6$, $P < 0.001$, Fig. 3). All standard curves made from equimolar DNA concentrations (total of 1.5 ng) showed significant departures in their intercepts from strain L Babercrom (Australia), except the curve from Brazil CLFT023 ($B = 0.09$, $T = 0.69$, $P = 0.50$). Our post-hoc Tukey's HSD tests revealed further pairwise similarities between strains in amplification profiles: JEL404-JEL427, LFT001_01-JEL427, LFT001_01-JEL404, and PAB01-MexMkt did not significantly differ from each other (Fig. 3). Strain MexMkt and L Babercrom showed the largest differences in intercept C_t values (Fig. 3).

ITS1/5.8S Copy Number and Genome Size Varied among Bd Strains

We compared the differences in ITS1 copy number among Bd strains by using the absolute standard (Standard Set C) and holding zoospore quantity or input DNA constant (Fig. 4). When we held zoospore number constant (10^3), our results showed high copy number variability, which ranged from 10 copies in MexMkt

to 144 copies in CLFT023 (Fig. 4A). When we held the DNA concentration constant (1.5 ng), strains also showed 10-fold differences in copy number ranging from 6.06×10^5 to 6.06×10^6 (Fig. 4B). Based on these two measures of copy number, the inferred DNA content per zoospore was significantly different among strains (Fig. S2).

Differences in ITS1 Haplotype Diversity

We detected 26 different ITS1 haplotypes among seven strains through cloning (Fig. S1, Appendix S1). Sequence variants were conserved from bases 1 to 42, which included the primers and the Chytr MGB2 probe binding site, and bases 126 to 154 (Fig. S1). The area internal to these conserved regions showed multiple indels and base changes, resulting in unique haplotypes that vary in length (136–152 bp, Fig. S1). We did not detect significant changes in haplotype frequency distributions obtained by cloning and by Illumina sequencing (Fig. 5 and Fig. 6). However, Illumina sequencing detected significantly more haplotypes (11.269.3) per strain on average compared to cloning (5.861.1) ($T = 4.53$, $DF = 6.9$, $P = 0.003$). This result indicates that cloning did not bias our relative estimates of haplotype diversity but failed to detect rare haplotypes. Strains MexMkt and LFT001_01 had different haplotype frequency distributions compared to JEL427, CLFT023, CLFT024, and L Babercrom (Fig. 5), which had similar frequency profiles (average $F_{ST} = 0.01$, Fig. 6, Table S2).

Discussion

Our results show that using zoospores counts (Standard Set A) to establish qPCR standard curves can be problematic because Bd strains vary in their ITS1 copy number (Fig. 2). These strain differences in gene copy number directly affect qPCR estimates of pathogen load from amphibians or the environment, and thus, underscore the need to improve our current diagnostic methods. Differences in copy number persisted even after holding Bd DNA concentrations constant (Standard Set B, Fig. 3), likely due to genetic changes caused by genomic duplications or deletions. On the other hand, haplotype diversity does not appear to affect quantification, because none of the haplotypes detected by cloning had changes at the probe-binding site (Fig. S1). Our results indicate that researchers interested in estimating absolute Bd zoospore load from amphibians or the environment will have to incorporate an independent measure to estimate ITS1 copy number from the strain used as a standard.

Our comparison of Bd qPCR standards made from strains collected in six countries points to patterns of genomic change during the evolution and global spread of Bd [8]. In the strain MexMkt (Mexico) we found significantly higher cycle threshold values for any given number of zoospores even after holding DNA concentration constant (Fig. 3), suggesting a decrease in the number of probe/primer binding sites in the genome of that strain. Potential causes for a decrease in probe binding include: (1) inhibitors in the qPCR reaction that reduce affinity between probe and binding site, (2) changes in structural conformation or mutations that affect probe/primer binding sites, or (3) copy number/genome size variation. We can eliminate inhibition in our qPCR reaction, because the slope of MexMkt showed an efficiency value of 101% (Table 1). Differences in structural conformations are not expected to interfere with amplification because the ITS1-3/5.8S Chytr primers were designed to avoid G-rich stretches and AT-rich stem/loop structures [3]. Likewise, Illumina reads showed no polymorphism in ITS primer binding sites in MexMkt or any other Bd strain (Table S1), thus differential primer binding is not causing variation in amplification in our focal strains. The

MexMkt strain showed only ten ITS1 copies in a single zoospore, compared to 39–144 copies detected in other strains (Fig. 4A). Thus, our data indicate that these differences are most likely due to a reduction in genome size (Fig. S2).

All other strains showed similar slopes and intercepts for zoospore-based standard curves (Standard Set A; Table 1). Differences in ITS1 copy number (39–144 copies) were not apparent using Standard Set A, but became evident as more (or less) zoospores were required to attain 1.5 ng of DNA (Standard Set B, Fig. 4B). For example, strain LBAbercrom had 107 ITS1 copies in a single zoospore, but showed the highest number of copies (6.46×10^4) in 1.5 ng of extracted DNA (Fig. 4). This finding indicates that LBAbercrom may have a low DNA content per zoospore but includes many copies of the ITS1 region (Fig. S2). In contrast, strain CLFT024 has a large estimated genome with 118 ITS1 copies per zoospore; thus, the ratio of ITS1 to genome size may not be constant across Bd strains. Although intraspecific variability in Bd ITS1 regions often occurred among strains from different countries, our results also highlighted local differences in ITS1 copy number and haplotype diversity (Fig. 4A and Fig. 5). For instance, strains LFT001_01, CLFT023, and CLFT024 were isolated from three states in Brazil (São Paulo, Minas Gerais and Paraná, respectively). These strains show similar ITS1 copy numbers (118–144, Fig. 4A) but LFT001_01 has a unique haplotype distribution (Fig. 5 and Fig. 6). Recent comparisons using flow cytometry of Bd strains from California (JEL270), Panama (JEL423), and Brazil (JEL648, UM142) also indicated significant variation in DNA content [9], and the two fully sequenced Bd strains JEL423 and JAM81 have different assembly sizes, which may result from the presence of chromosomal length polymorphisms [16]. Thus, our results corroborate these earlier findings of genome size evolution within Bd, and indicate that insertions and/or deletions of regions including ribosomal ITS1 may explain the differences we observed in qPCR standard curves across strains.

ITS1 copy number variation among Bd lineages has important implications for comparative studies of disease dynamics in spatially isolated amphibian populations. Infection intensity thresholds of approximately 10,000 Bd genomic equivalents (ge; or zoospores) are often associated with disease epidemics, mortality, and population extirpations [5,7,19]. However, other species carrying a 10-fold lower average infection intensity also experienced severe die-offs [20]. Before assigning biological causation to these observed thresholds, researchers will need to evaluate bias in qPCR measurements resulting from different Bd standards.

10,000 zoospores and 1,000 zoospores can generate the same amount of fluorescence in qPCR assays if standards are made with Bd strains that have a 10-fold difference in the number of ITS1 regions. Furthermore, the possibility of sampling amphibians with co-infections of multiple strains with variable ITS1 copy number will remain a problem in wild populations, unless we characterize ITS1 regions and develop strain-specific assays. To reduce the potential biases caused by Bd genome variation or co-infections,

we recommend that researchers combine PCR amplicon standards in conjunction with standards based on zoospore counts for detecting Bd [2,3]. Researchers should report the ITS copy number per zoospore of the strain used as a qPCR standard, or ITS copy number per sample in addition to Bd genomic equivalents. PCR-amplicon standards can be generated cheaply and will allow researchers to determine the number of ITS1 regions in newly isolated Bd strains. Our strain-independent method (see Supporting Information) complements traditional standard curves, and provides accurate and comparable measures of infection intensities across sampling sites and studies.

Supporting Information

Figure S1 An alignment of 26 ITS1 haplotypes detected by cloning and sequencing PCR products generated using primers ITS1-3 Chytr and 5.8S Chytr on genetic material from seven Bd strains. Light blue area represents unique 35 bp fragment used for searches in the Illumina sequence data. See for FASTA formatted sequences.

(EPS)

Figure S2 Estimated DNA content per zoospore from ITS copy number and the number of copies in 1.5 ng DNA.

(EPS)

Table S1 Percent identity and range in coverage for each strain at each primer binding site. NR represents the total number of filtered reads searched.

(DOCX)

Table S2 Pairwise F_{ST} values. Upper diagonal values are from cloning/Sanger sequencing and lower diagonal values from Illumina sequencing. Significant F_{ST} values ($P < 0.05$) are shown in bold.

(DOCX)

Appendix S1 FASTA formatted ITS1 haplotypes with gaps included.

(DOCX)

Acknowledgments

We thank C. Lambertini, J. Longcore, G. Parra-Ólea and E. B. Rosenblum for providing Bd strains for this study; T. James for useful advice on whole-genome analyses and probe/primer binding site analyses; N. Hairston for sharing lab equipment to grow Bd strains; and K. Kiemiec-Tyburczy and K.E. Tracy for help with ITS1 haplotype cloning and sequencing. We thank Zamudio lab members and one anonymous reviewer for valuable comments that improved earlier versions of this manuscript.

Author Contributions

Isolated Bd strains: AVL DdSL LFT CMA PAB. Conceived and designed the experiments: AVL DR KRZ. Performed the experiments: AVL DR. Analyzed the data: AVL DR. Contributed reagents/materials/analysis tools: AVL DR KRZ. Wrote the paper: AVL DR KRZ.

References

1. Dorak MT, editor (2006) Real-time PCR. New York, NY: Taylor & Francis Group.
2. Hyatt AD, Boyle DG, Olsen V, Boyle DB, Berger L, et al. (2007) Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of aquatic organisms* 73: 175–192.
3. Boyle DG, Boyle DB, Olsen V, Morgan JA, Hyatt AD (2004) Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms* 60: 141–148.
4. Briggs CJ, Knapp RA, Vredenburg VT (2010) Enzootic and epizootic dynamics of the chytrid fungal pathogen of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 9695–9700.
5. Vredenburg VT, Knapp RA, Tunstall TS, Briggs CJ (2010) Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 9689–9694.
6. Voyles J, Young S, Berger L, Campbell C, Voyles WF, et al. (2009) Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science* 326: 582–585.

7. Cheng TL, Rovito SM, Wake DB, Vredenburg VT (2011) Coincident mass extirpation of Neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108: 9502–9507.
8. Farrer RA, Weinert LA, Bielby J, Garner TWJ, Balloux F, et al. (2011) Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a global-ized hypervirulent recombinant lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108: 18732–18736.
9. Schloegel LM, Toledo LF, Longcore JE, Greenspan SE, Vieira CA, et al. (2012) Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology* 21: 5162–5177.
10. Whiley DM, Sloots TP (2005) Sequence variation in primer targets affects the accuracy of viral quantitative PCR. *Journal of Clinical Virology* 34: 104–107.
11. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, et al. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 6241–6246.
12. Kirshtein JD, Anderson CW, Wood JS, Longcore JE, Voytek MA (2007) Quantitative PCR detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* DNA from sediments and water. *Diseases of Aquatic Organisms* 77: 11–15.
13. Garland S, Baker A, Phillott AD, Skerratt LF (2009) BSA reduces inhibition in a TaqManH assay for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 92: 113–116.
14. Longcore JE, Pessier AP, Nichols DK (1999) *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91: 219–227.
15. Hou Y, Zhang H, Miranda L, Lin S (2010) Serious overestimation in quantitative PCR by circular (supercoiled) plasmid standard: microalgal *pca* as the model gene. *PLoS One* 5: e9545.
16. Rosenblum EB, Fisher MC, James TY, Stajich JE, Longcore JE, et al. (2009) A molecular perspective: biology of the emerging pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 92: 131–147.
17. R Development Core Team (2010) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing.
18. Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564–567.
19. Kinney VC, Heemeyer JL, Pessier AP, Lannoo MJ (2011) Seasonal pattern of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and mortality in *Lithobates areolatus*: affirmation of Vredenburg's "10,000 zoospore rule". *PLoS One* 6: e16708.
20. Savage AE, Sredl MJ, Zamudio KR (2011) Disease dynamics vary spatially and temporally in a North American amphibian. *Biological Conservation* 144: 1910–1915.

Capítulo 4

Mendoza-Almeralla et al. - Chytridiomycosis in Pseudoeurycea leprosa
Temperature treatments boost subclinical infections of *Batrachochytrium dendrobatidis* in a Mexican salamander (*Pseudoeurycea leprosa*)

Tratamientos de temperatura aumentan las infecciones subclínicas de *Batrachochytrium dendrobatidis* en una salamandra mexicana (*Pseudoeurycea leprosa*)

Cinthya Mendoza Almeralla¹, Aldo López Velazquez¹, Ana V. Longo² y Gabriela Parra-Olea^{1*}

¹Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.

AP 70-153, 04510, México, D. F. México. mendoza.cinthya@gmail.com;

lopez.velazquez.aldo@hotmail.com; *gparra@ib.unam.mx.

² Department of Ecology and Evolutionary Biology, Cornell University, Ithaca, New York, USA.

av17@cornell.edu

Resumen. El primer registro del hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) en salamandras pletodóntidas de México data de la década de 1970. Sin embargo, se conoce muy poco sobre los patrones de infección por *Bd* en poblaciones silvestres y el efecto de los cambios de temperatura sobre el grado de infección. Este trabajo cuantificó la infección por *Bd* en la población de *Pseudoeurycea leprosa* en el Parque Nacional La Malinche, Puebla, México, de junio de 2011 a septiembre de 2012. Se expusieron 160 individuos adultos a tratamientos de 10, 15, 20, 23, 25 o 28 °C durante 10 semanas. Los resultados de este estudio revelaron que: 1) la población de *P. leprosa* del parque nacional La Malinche presenta infección por quitridiomycosis a lo largo del año con prevalencias bajas, entre 0 y 17%, 2) el 20.6% de organismos que resultaron negativos (sin infección) al momento de la colecta resultaron positivos después de los experimentos de temperatura; 3) la temperatura fue la causa de la muerte en los experimentos realizados a 25 °C y 28 °C afectando directamente la sobrevivencia de *P. leprosa*; 4) la carga de infección en algunos individuos de *P. leprosa* presentó ciclos de aumento y disminución de la infección durante los tratamientos.

Palabras clave: anfibios. salamandras. quitridiomycosis. Plethodontidae. México.

Abstract. The first record of the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) in Mexican plethodontid salamanders dates back to the 1970s. Little is known of the patterns of infection in wild populations and the effects of changes in temperature on the degree of infection. This work quantified *Bd* infection in a population of *Pseudoeurycea leprosa* in La Malinche National Park, Puebla, Mexico from June 2011 to September 2012. A total of 160 adult salamanders were experimentally exposed to temperatures of 10, 15, 20, 23, 25 or 28 °C for 10 weeks. The results of this study revealed that 1) the population of *P. leprosa* in La Malinche National Park is infected with *Bd* throughout the year at a low prevalence of between 0 and 17%; 2) 20.6% of the salamanders that were *Bd* negative at the time of collection expressed chytridiomycosis after exposure to the experimental temperature treatments; 3) temperature was the cause of death in each treatment, with temperatures of 25 °C and 28 °C affecting the survival of *P. leprosa*; and 4) the infection load in certain *P. leprosa* individuals exhibited cycles of increasing and decreasing zoospore genomic equivalents (ZGEs) over time.

Key words: amphibians, salamanders, chytridiomycosis, Plethodontidae, México.

Introduction

The wild populations of many species are decreasing drastically around the world, which has led scientists to propose that we are in the midst of a sixth mass species extinction event (Medina-Vogel, 2010; Wake & Vredenburg, 2008). This phenomenon has been attributed to a variety of factors, including habitat destruction, pollution, overexploitation, climate change and emerging infectious diseases (Dobson & Foufopoulos, 2001; Medina-Vogel, 2010), with latter factors becoming increasingly important as new cases appear around the world (Medina-Vogel, 2010). To address this threat, scientists have suggested that research on emerging diseases should focus on the causes of animal diseases, the transmission of diseases via hosts, the physiology and ecology of the pathogens and the impacts of global climate change (Harvell et al., 2002; Medina-Vogel, 2010).

Many pathogens and their hosts are limited by the temperature of the environment (Harvell et al.,

2002). Thus, when climate conditions change, the parasite-host relationship can be disrupted, which may increase the virulence of the pathogens and/or the susceptibility of the hosts (Harvell et al., 2002). Examples of diseases that have caused population declines and are dependent on specific temperatures include distemper in seals, parvovirus in lions, white-nose syndrome in bats and chytridiomycosis in amphibians (Daszak et al., 2003; Harvell et al., 2002).

Chytridiomycosis occurs worldwide and has caused the decline of more than 200 amphibian species (Skerratt et al., 2007). The pathogenic fungi that cause the disease are *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), which was discovered in the 1990s and occurs in all of the amphibian orders (Olson et al., 2013), and *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*), which was discovered in 2013 in European salamanders (Martel et al., 2014). Chytridiomycosis is characterized by the colonization of the keratinized layers of amphibian epidermis or larval mouthparts (Berger et al., 1998; Martel et al., 2014; Pessier et al., 1999). Motile zoospores develop into sporangia in the keratinized parts of the amphibian skin and release zoospores through a discharge tube. This, which can result in epidermal hyperplasia and hyperkeratosis. In addition, these changes disrupt the osmoregulatory function of the skin, leading to dehydration, electrolyte imbalances and death caused by cardiac arrest (Berger et al., 1998; Brutyn et al., 2012; Carver et al., 2010; Marcum et al., 2010; Voyles et al., 2007; Voyles et al., 2011).

To date, more than 500 amphibian species have been infected with *Bd* (Olson et al., 2013). However, the most dramatic examples of the appearance of *Bd* with a consequent population decline occurred in the anurans *Bufo periglenes* and *Atelopus varius* in Costa Rica in the 1980s (Pounds & Crump, 1994). Because of the seasonality of infectious *Bd* outbreaks, Lips et al. (2008) and Cheng et al. (2011) suggested that the pathogen arrived in North America in the early 1970s and moved southward into Central America and South America through introduced species or other vectors as well as by water currents (Cheng et al., 2011; Lips et al., 2008). In Mexico and Central and South America, the epidemiological outbreaks and the prevalence of *Bd* may also have been caused by more suitable climate conditions for the pathogen (Lips et al., 2008; Ron, 2005).

The earliest record of *Bd* infection in Mexico is from plethodontid salamanders collected in 1972 (Cheng et al., 2011). According to the cited study, chytrid infections were present in voucher specimens of several salamander genera collected in the 1970s and 1980s from the states of Veracruz, Oaxaca and Hidalgo, where severe salamander population declines were reported by Parra-Olea et al. (1999) and Rovito et al. (2009). These results led Cheng et al. (2011) to propose that an outbreak of chytridiomycosis might have been related to these declines. Thus far, *Bd* has been found in 50 species of Mexican amphibians, including *Pseudoeurycea leprosa* (Mendoza-Almeralla et al., 2015), and the affected amphibians are mainly distributed in mountainous regions, extending from the north to the south of the country.

Despite the progress made in gathering information about the presence of *Bd* in Mexico, little is known about its infection dynamics in amphibian species distributed in the country. Therefore, this study had the following objectives: 1) determine whether the population of *P. leprosa* in La Malinche National Park is infected with *Bd* year-round, 2) determine if stress caused by temperature treatments affects the *Bd* infection load in *P. leprosa*, and 3) determine the effect of temperature and *Bd* infection on the survival of *P. leprosa*.

Materials and Methods

Study area. The Malinche National Park is on the Trans-Mexican Volcanic Belt, where two of the continent's biogeographic regions converge. The park is located in the Mexican states of Puebla and Tlaxcala, and this region is characterized by high species diversity and endemism (López-Domínguez & Acosta, 2005). The park has a total area of 45,711 ha and a maximum elevation of 4,461 m.a.s.l. (Melo, 1977). Below 2,800 m.a.s.l., the climate is temperate with temperatures ranging between 12 and 18 °C, and above 2,800 m.a.s.l., the climate is cold with temperatures from 5 to 12 °C (García, 2004).

Collection of Pseudoeurycea leprosa. We visited La Malinche National Park 15 times from June 2011 to September 2012; we collected specimens according to standard protocols and wore surgical gloves when handling and swabbing the salamanders (Van Rooij et al., 2011). The swab

was then placed in a sterile 2 ml vial, and each organism was placed in a plastic bag to prevent cross-contamination. A number of the adult individuals were transported to the laboratory inside a plastic cooler in their individual plastic bags. In the laboratory, the salamanders were placed into a 250 ml plastic container (7.3 cm high, 8 cm upper diameter and 6.4 cm lower diameter), which contained a damp paper substrate. The salamanders were fed 2 flies or two crickets every 4 days, and they were maintained at room temperature for 5 days before being used in the temperature experiments. After the experiments, 160 salamanders were accessioned to the Colección Nacional de Anfibios y Reptiles (CNAR), Universidad Nacional Autónoma de México.

Temperature treatments. Each container was placed in a cooling system (wine cellar) fixed at a constant temperature of 10, 15, 20, 23, 25 or 28 °C. Humidity was maintained constant between 50 and 60% by spraying bottled water into the containers and changing the substrates every 3 days. The temperature and humidity were checked every three days with a thermohydrometer. The experiment lasted for 10 weeks, and each salamander was swabbed once every week. Thirty salamanders were used for each of the temperature treatments (10, 15, 20, 23 and 25 °C); the first 10 salamanders subjected to 28 °C died within the first few days, so this temperature treatment was discontinued.

Detection and quantification of Bd. DNA was extracted from each swab using the PrepMan protocol (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) and analyzed following standard protocols with a real-time PCR assay to quantify *Bd* infection (Boyle et al., 2004). The assay uses genetic markers specific to *Bd* and compares each sample to a set of standards to calculate a genomic equivalent. DNA was extracted from each swab using the PrepMan protocol (Applied Biosystems) and analyzed according to standard protocols with a real-time PCR assay to quantify *Bd* infection (Boyle et al., 2004). The qPCR was performed on a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The PCR conditions consisted of an initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 50 cycles of 10 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. Each sample was assayed in duplicate together with standards of known *Bd* quantity (0.1, 1, 10, 100 and 1000 zoospores) and

with negative controls (5 ml double distilled water). Following the quantification of the *Bd* zoospore genomic equivalents (ZGEs), each value was multiplied by the dilution factor to obtain the total equivalent zoospores of each sample.

Data analysis. We calculated the *Bd* prevalence by dividing the number of infected salamanders by the total number of specimens swabbed per visit. The differences in the number of salamanders infected before and after the temperature treatments were evaluated using a McNemar test for each treatment, and the infection load was expressed as the ZGE. To test for differences in the infection load caused by temperature stress, we ran a nonparametric analysis of variance (ANOVA) in SPSS version 21.0.0.0 (IBM Corporation Armonk, NY, USA) using the treatment data, the number of salamanders, and their infection loads before and after treatment.

To determine the effects of temperature on mortality in *P. leprosa*, we compared survivorship curves for each treatment using the survival package in R (Therneau, 2014). We ran an initial analysis that included all of the salamanders regardless of their infection load, and then divided them into two groups: salamanders that were *Bd* negative during the entire experiment and salamanders that became *Bd* positive during the experiment. In the survival analysis, greater importance was given to deaths that occurred at the beginning of the experiment (option $\rho = 1$, implemented in the `survdiff` function) because temperature and humidity are known to affect *Bd*-amphibian dynamics by physiologically limiting vital processes for both the pathogen and the host. In this analysis, the temperature treatment was considered a *level*, and the collection month was considered a *stratum*. We tested for significant differences between all survivorship curves using a Kaplan-Meier analysis, and the probability of death associated with each temperature treatment was determined with Cox models of proportional risk. (Table 3).

To understand the relationship between infection load and survival in *P. leprosa*, the salamanders were classified into three groups: 1) the No-Cycle group, which included animals in which the infection load was either maintained or increased over time, 2) the 1-2 Cycles group, which included animals in which the infection load decreased/increased once or twice, and 3) the >3 Cycles group, which included animals in which the infection load decreased/increased three or

more times. Using these data, we tested the hypothesis that survival depends on the ability to clear or reduce *Bd* infection. For these analyses, we also applied the Kaplan Meier analysis and Cox's proportional risk model. We included the cumulative number of zoospores over the course of the experiment (i.e., the sum of the ZGEs for 10 weeks) as an additional variable to explain the risk of mortality in Cox's proportional risk model.

Results

Over the 15 visits to La Malinche National Park from June 2011 to September 2012, we collected 160 adult *P. leprosa* (Table 1). Information on the microhabitat, specific locality and ambient temperatures are provided in Supplementary Table 1.

Our results show that only 12 (7.5%) of the salamanders were infected with *Bd* in the months of July, September and December, and the prevalence was low in all three months, with values of 0.17, 0.09 and 0.16, respectively. The highest infection load in the field was 7,812 ZGEs, which was observed in one individual in July (Table 1).

Temperature treatments. In all of the temperature treatments, forty-five of the exposed salamanders (24.82%) were positive for *Bd*, although only 12 of animals were *Bd* positive in the field, whereas the other 33 were recorded as *Bd* negative at the time of collection and became *Bd* positive at some point during the temperature treatments. These data indicate that in their natural habitat, the salamanders had subclinical levels of infection and temperature stress caused an increase in *Bd* load. For each temperature treatment, the McNemar analysis was performed to determine the number of salamanders infected before and after the experiment, and it returned a significant difference ($P \leq 0.05$) between the 10 and 20 °C treatments, indicating that exposing *P. leprosa* to certain temperatures affects pathogen expression.

The number of infected salamanders and the infection loads appeared to differ across treatments (Table 2), although the nonparametric ANOVA did not reveal significant differences ($P \geq 0.05$) in the infection load between the 10, 15, 20, 23 and 25 °C temperature treatments. This result led us to reject the hypothesis that the degree of infection is temperature dependent

Survival of Pseudoeurycea leprosa at different temperatures. When all of the individuals were included in the analyses, the Kaplan-Meier survival analysis showed significant differences between temperatures (chi-square = 59.4, DF = 4, $P < 0.001$) (Table 3) and Cox's proportional risk models using the 10 °C treatment as a reference revealed significant differences in survival with the treatment at 25 °C (LRT = 68.8, DF = 4, $P < 0.001$), which had a risk rate of 63.5 (Table 3, Fig. 1A)

For the *Bd*-negative group, the Kaplan-Meier analysis also showed a difference in the probability of survival (chi-square = 46.8, DF = 4, $P < 0.001$), Cox's proportional risk models showed significant differences with the treatment at 25 °C (LRT = 57.2, DF = 4, $P < 0.001$), and the hazard ratio for this treatment was 160.54 (Table 3 and Fig. 1B). For the *Bd*-positive group, the Kaplan-Meier analysis indicated significant differences (chi-square test = 51.1, DF = 4, $P < 0.001$), whereas Cox's proportional risk models showed significant differences with the treatment at 25 °C (LRT = 32.9, DF = 4, $P < 0.001$), with a hazard ratio of 43.54 (Table 3, Fig. 2C).

Infection load cycles and survival. From the first week of temperature treatments to the end of the experiment, 115 salamanders were healthy and 45 were infected (Table 2). Of the 45 infected salamanders, 8 died immediately after manifesting the infection (Fig. 2A); 9 maintained the infection at similar infection loads; 30 exhibited cycles of increasing-decreasing ZGEs once or twice and then presented as *Bd* negative for the remainder of the experiment (Fig. 2B), and 6 showed more than 3 cycles of increasing-decreasing ZGEs during the experiment (Fig. 2C). The Kaplan-Meier analysis of infection loads revealed a significant difference between the No-Cycle group and the animals that fell into one of the two cycle categories. The Cox analysis also detected significant differences between these groups (Table 4 and Fig. 3).

Discussion

Reductions in amphibian populations have frequently been associated with chytridiomycosis, a disease caused by the aquatic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. Globally, forest-associated amphibians that live in or along streams are more likely to present declines compared with species

in other assemblages (Ryan et al., 2008; Stuart et al., 2008; Woodhams & Alford, 2005).

Differences in habitat characteristics and life history traits as well as taxonomic variations in susceptibility to *Bd* could affect the prevalence of *Bd* in these communities.

Although *Bd* has been detected in numerous salamander species (Byrne et al., 2008, Chatfield et al., 2012), fully terrestrial plethodontid salamanders appear to be less susceptible to chytridiomycosis compared with anurans (Rothermel et al., 2008; Timpe et al., 2008). We detected *Bd* in *P. leprosa* from La Malinche, although the overall prevalence of the pathogen was relatively low when compared with other reports for Mexican amphibians. Field studies in Mexico have reported higher prevalence rates: for example, Frías-Álvarez et al. (2008) reported *Bd* in 50-100% of the ambystomatid salamanders and anurans analyzed from different parts of the country, Van Rooij et al. (2011) reported a prevalence between 25 and 100% in plethodontid salamanders in central and southern Mexico, and Luja et al. (2012) also reported a high prevalence of *Bd* in the Baja California tree frog. However, all of these previous studies had small sample sizes, which substantially reduced the probability of an accurate measure for prevalence. Our study provides additional data to the limited number of previous studies that have systematically sampled terrestrial salamander assemblages (Caruso & Lips, 2013; Keitzer et al., 2011; Moffitt et al., 2015; Muletz et al., 2014; Rothermel et al., 2008), and the results are consistent with the proposal that salamanders are less affected by chytridiomycosis and may act as an important vector of the disease (Chatfield et al., 2012; Garner et al., 2005).

Ambient environmental conditions, such as temperature and precipitation, are known to affect the vital physiological processes of amphibians, and these conditions have a strong correlation with the outcome of *Bd* infections (population-level infection prevalence and host mortality rates) (James et al., 2015; Rowley & Alford, 2013). In culture, *Bd* grows best between 17 and 25 °C, with low temperatures retarding the pathogen's growth. The air and substrate temperatures observed at the time of collection (Table S1) and those reported for wild populations of *P. leprosa* (Guisado-Rodríguez & García-Vázquez, 2010) are generally lower than optimal for *Bd* to thrive (Piotrowski et al., 2004); therefore, these less than optimal temperatures may be the

most simple explanation for the observed low prevalence of *Bd* infection and an important factor in the local abundance of this salamander species despite the epidemic wave of chytridiomycosis that has affected several salamander populations (Rovito et al., 2009).

Although environmental conditions in La Malinche are favorable for the survival of *P. leprosa* with a low prevalence of *Bd*, when the salamanders were exposed to temperature experiments and conditions ideal for *Bd* growth, 33 new cases of infection were detected, indicating that these salamanders had subclinical levels of infection in the field. Over the course of the experiments, we observed variations in the infection loads, and the salamanders exhibited cycles of increasing and decreasing ZGEs over time. A similar pattern was described by Shin et al. (2014), who found that the ZGEs of individual frogs significantly varied over a 5-day period because they intermittently released zoospores. Our results might also reflect cycles in the release of *Bd* zoospores; however, we cannot rule out the effects of the defense mechanisms of the 19 individuals that expressed *Bd* once and were then *Bd* negative for the remainder of the experiment.

Elevated host body temperatures have been shown to clear frogs of *Bd* infection. Woodhams et al. (2003) and Rowley and Alford (2013) showed that individual probabilities of infection by *Bd* decreased strongly with an increasing percentage of body temperatures above 25 °C in tropical species. For *P. leprosa*, the three survival analyses revealed that 25 °C is a critical temperature for the survival of these organisms and identified this temperature as the most important factor influencing the survival of the salamanders rather than infection by *Bd*; therefore, both the pathogen and the host are negatively affected by temperatures of 25 °C or higher.

P. leprosa is the most abundant species of plethodontid salamander in Mexico, and its populations currently appear to be stable (García-Vázquez et al., 2006). However, studies of climate change in mountainous ecosystems have predicted an increase of 2 to 3 °C and a decrease in annual precipitation of between 3 and 20% by the year 2050 in the Trans-Mexican Volcanic Belt, where La Malinche National Park is located (Villers-Ruiz & Castañeda-Aguado, 2013).

Furthermore, a loss of 75% of the distributional area of *P. leprosa* has also been predicted by the

year 2050 because of climate change (Parra-Olea et al., 2005). This study provides evidence that a synergistic effect between temperature stress and infection with *Bd* increases mortality in this species, and the results may provide an example of how temperate species of anurans might be affected by climate change.

Acknowledgments

We thank the Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) of Mexico for providing scientific collecting permits (FAUT 0106 and special permit 08657/14 to GP-O.). Laura Marquez and Lidia Cabrera helped with the laboratory work. Funding was provided by PAPIIT-UNAM IN209914 and UC-MEXUS CONACyT (CN-13-614) to GPO. Mirna García-Castillo, Rafael Barzalobre and Mariana Meneses helped with the field work. This article fulfills part of the requirements of the first author to obtain the degree of Doctor of Sciences from the Graduate Studies in Biological Sciences Program of the UNAM. The first author expresses her gratitude to the Graduate Studies in Biological Sciences Program, UNAM for support and CONACyT for awarding a graduate studies scholarship (CVU/Becario, No. 2 05284/202580).

Literature cited

Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A. A., Goggin, C. L., Slocombe, R., Ragan, M. A., Hyatt, A. D., McDonald, K. R., Hines, H. B., Lips, K. R., Marantelli, G., & Parkes, H. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 9031–9036. doi:10.1073/pnas.95.15.9031.

Boyle, D. G., Boyle, D. B., Olsen, V., Morgan, J. A., & Hyatt, A. D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples

using real-time TaqMan PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60, 141–148.

doi:10.3354/dao060141.

Brutyn, M., D’Herde, K., Dhaenens, M., Van Rooij, P. V., Verbrugge, E., Hyatt, A. D.,

Croubels, S., Deforce, D., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Martel, A., & Pasmans, F.

(2012). *Batrachochytrium dendrobatidis* zoospore secretions rapidly disturb intercellular junctions in frog skin. *Fungal Genetics and Biology*, 49, 830–837.

doi:10.1016/j.fgb.2012.07.002.

Byrne, M. W., Davie, E. P., & Gibbons, J. W. (2008). *Batrachochytrium dendrobatidis*

occurrence in *Eurycea cirregera*. *Southeastern Naturalist*, 7, 551–555.

Caruso, N. M., & Lips, K. R. (2013). Truly enigmatic declines in terrestrial salamander

populations in Great Smoky Mountains National Park. *Diversity and Distributions*, 19,

38–48. doi:10.1111/j.1472-4642.2012.00938.x.

Carver, S., Bell, B. D., & Waldman, B. (2010). Does Chytridiomycosis disrupt amphibian skin

function? *Copeia*, 2010, 487–495. doi:10.1643/CH-09-128.

Chatfield, M. W. H., Moler, P., & Richards-Zawacki, C. L. (2012). The amphibian chytrid fungus,

Batrachochytrium dendrobatidis, in fully aquatic salamanders from southeastern North

America. *PLOS ONE*, 7, e44821. doi:10.1371/journal.pone.0044821.

Cheng, T. L., Rovito, S. M., Wake, D. B., & Vredenburg, V. T. (2011). Coincident mass

extirpation of Neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal

pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, 108, 9502–9507. doi:10.1073/pnas.1105538108.

Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2003). Infectious disease and amphibian

population declines. *Diversity and Distributions*, 9, 141–150.

doi:10.1046/j.1472-4642.2003.00016.x.

Dobson, A., & Foufopoulos, J. (2001). Emerging infectious pathogens of wildlife. *Philosophical*

Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 356, 1001–1012.

doi:10.1098/rstb.2001.0900.

- Frías-Alvarez, P., Vredenburg, V. T., Familiar-López, M., Longcore, J. E., González-Bernal, E., Santos-Barrera, G., Zambrano, L., & Parra-Olea, G. (2008). Chytridiomycosis survey in wild and captive Mexican amphibians. *Ecohealth*, *5*, 18–26. doi:10.1007/s10393-008-0155-3.
- García, E. (2004). *Modificaciones al Sistema de clasificación climático de Köppen*, second ed. México D.F. Instituto de Geografía, UNAM.
- García-Vázquez, U. O., Gutiérrez-Mayén, M. G., Hernández-Jiménez, C. A., & Auriolos-López, V. (2006). Estudio de la densidad poblacional y algunos aspectos ecológicos de *Pseudoeurycea leprosa* en el Parque Nacional la Malinche. Tlaxcala, México. *Boletín de la Sociedad Herpetológica Mexicana*, *14*, 10–17.
- Garner, T. W. J., Walker, S., Bosch, J., Hyatt, A. D., Cunningham, A. A., & Fisher, M. C. (2005). Chytrid fungus in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, *11*, 1639–1641.
- Guisado-Rodríguez, M. A., & García-Vázquez, U. O. (2010). Thermal ecology of *Pseudoeurycea leprosa* (Caudata: Plethodontidae) from Sierra del Ajusco. *The Herpetological Bulletin*, *111*, 15–18.
- Harvell, C. D., Mitchell, C. E., Ward, J. R., Altizer, S., Dobson, A. P., Ostfeld, R. S., & Samuel, M. D. (2002). Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science*, *296*, 2158–2162. doi:10.1126/science.1063699.
- James, T. Y., Toledo, L. F., Rödder, D., da Silva Leite, D., Belasen, A. M., Betancourt-Román, C. M., Jenkinson, T. S., Soto-Azat, C., Lambertini, C., Longo, A. V., Ruggeri, J., Collins, J. P., Burrowes, P. A., Lips, K. R., Zamudio, K. R., & Longcore, J. E. (2015). Disentangling host, pathogen, and environmental determinants of a recently emerged wildlife disease: lesson from the first 15 years of amphibian chytridiomycosis research. *Ecology and Evolution*, *5*, 4079–4097. doi:10.1002/ece3.1672.
- Keitzer, S. C., Goforth, R., Pessier, A. P., & Johnson, A. J. (2011). Survey for the pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in southwestern North Carolina

salamander populations. *Journal of Wildlife Diseases*, 47, 455–458. doi:10.7589/0090-3558-47.2.455.

Lips, K. R., Diffendorfer, J., Mendelson III, J. R., & Sears, M. W. (2008). Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLOS Biology*, 6, 441–454. doi:10.1371/journal.pbio.0060072.

López-Domínguez, J. C., & Acosta, R. (2005). Descripción del Parque Nacional Malinche. In J. A. Fernández, & J. C. López Domínguez (Eds.), *Biodiversidad del Parque Nacional Malinche Tlaxcala, México* (pp.3–20). Tlax. México: Coordinación General de Ecología, Gobierno del Estado de Tlaxcala.

Luja, V. H., Rodríguez-Estrella, R., Ratzlaff, K., Parra-Olea, G., & Ramírez-Bautista, A. (2012). The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in isolated populations of the Baja California tree frog *Pseudacris hypochondriaca curta* in Baja California Sur, Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 57, 323–327. doi:10.1894/0038-4909-57.3.323.

Marcum, R., St-Hilaire, S., Murphy, P.J., & Rodnick, K. (2010). Effects of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection on ion concentrations in the boreal toad *Anaxyrus (Bufo) boreas boreas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 91, 17–21. doi:10.3354/dao02235.

Martel, A., Blooi, M., Adriaensen, C., Van Rooij, P., Beukema, W., Fisher, M. C., Farrer, R. A., Schmidt, B. R., Tobler, U., Goka, K., Lips, K. R., Muletz, C., Zamudio, K. R., Bosch, J., Lötters, S., Wombwell, E., Garner, T. W. J., Cunningham, A. A., Spitzen-van der Sluijs, A., & Salvidio, S. Ducatelle, R., Nishikawa, K., Nguyen, T.T., Kolby, J.E., Bocxlaer, I.V., Bossuyt, F., & Pasmans, F. (2014). Recent introduction of a chytrid fungus endangers western Palearctic salamanders. *Science*, 346, 630–631. doi:10.1126/science.1258268.

Medina-Vogel, G. (2010). Ecología de enfermedades infecciosas emergentes y conservación de especies silvestres. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42, 11–24.

Melo, G. (1977). *Desarrollo de los parques nacionales mexicanos. Tres estudios sobre el mismo Tema*, first ed. México, D. F. Instituto de Geografía, UNAM.

- Mendoza-Almeralla, C., Burrowes, P., & Parra-Olea, G. (2015). La quitridiomycosis en los anfibios de México: una revisión. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *86*, 238–248. doi:10.7550/rmb.42588.
- Moffitt, D., Williams, L. A., Hastings, A., Pugh, M. W., Gangloff, M. M., & Siefferman, L. (2015). Low prevalence of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Southern Appalachian Mountains. *Herpetological Conservation and Biology*, *10*, 123–136.
- Muletz, C., Caruso, N. M., Fleischer, R. C., McDiarmid, R. W., & Lips, K. R. (2014). Unexpected rarity of the pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Appalachian *Plethodon* salamanders: 1957–2011. *PLOS ONE*, *9*, e103728. doi:10.1371/journal.pone.0103728.
- Olson, D. H., Aanensen, D. M., Ronnenberg, K. L., Powell, C. I., Walker, S. F., Bielby, J., Garner, T. W. J., & Weaver, G., The *Bd* Mapping Group, & Fisher, M. C. (2013). Mapping the global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the amphibian chytrid fungus. *PLOS ONE*, *8*, e56802. doi:10.1371/journal.pone.0056802.
- Parra-Olea, G., García-París, M., & Wake, D. B. (1999). Status of some populations of Mexican salamanders (Amphibia: Plethodontidae). *Revista de Biología Tropical*, *47*, 217–223.
- Parra-Olea, G., Martínez-Meyer, E., & Pérez-Ponce de León, G. (2005). Forecasting climate change effects on salamander distribution in the Highlands of central México. *Biotropica*, *37*, 202–208. doi:10.1111/j.1744-7429.2005.00027.x.
- Pessier, A. P., Nichols, D. K., Longcore, J. E., & Fuller, M. S. (1999). Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and white's tree frogs (*Litoria caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *11*, 194–199. doi:10.1177/104063879901100219.
- Piotrowski, J. S., Annis, S. L., & Longcore, J. E. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, *96*, 9–15. doi:10.2307/3761981.

- Pounds, J. A., & Crump, M. L. (1994). Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Conservation Biology*, 8, 72-85.
doi:10.1046/j.1523-1739.1994.08010072.x.
- Ron, S. R. (2005). Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the new world. *Biotropica*, 37, 209–221. doi:10.1111/j.1744-7429.2005.00028.x.
- Rothermel, B.B., Walls, S.C., Mitchell, J.C., Dodd, C.K., Irwin, L.K., Green, D.E., Vazquez, V.M., Petranka, J.W., & Stevenson, D. J. (2008). Widespread occurrence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in the southeastern USA. *Diseases of Aquatic Organisms*, 82, 3–18. doi:10.3354/dao01974.
- Rovito, S. M., Parra-Olea, G., Vásquez-Almazán, C. R., Papenfuss, T. J., & Wake, D. B. (2009). Dramatic declines in Neotropical salamander populations are an important part of the global amphibian crisis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 3231–3236. doi:10.1073/pnas.0813051106.
- Rowley, J. J. L., & Alford, R. A. (2013). Hot bodies protect amphibians against chytrid infection in nature. *Scientific Reports*, 3, 1515. doi:10.1038/srep01515.
- Ryan, M. J., Lips, K. R., & Eichholz, M. W. (2008). Decline and extirpation of an endangered Panamanian stream frog population (*Craugastor punctariolus*) due to an outbreak of chytridiomycosis. *Biological Conservation*, 141, 1636–1647.
doi:10.1016/j.biocon.2008.04.014.
- Shin, J., Bataille, A., Kosch, T. A., & Waldman, B. (2014). Swabbing often fails to detect amphibian chytridiomycosis under conditions of low infection load. *PLOS ONE*, 9, e111091. doi:10.1371/journal.pone.0111091.
- Skerratt, L. F., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., McDonald, K. R., Phillott, A. D., Hines, H. B., & Kenyon, N. (2007). Spread of Chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *Ecohealth*, 4, 125–134. doi:10.1007/s10393-007-0093-5.

- Stuart, S. N., Hoffman, M., Chanson, J. S., Cox, N. A., Berridge, R. J., Ramani, P., & Young, B. E. (2008). *Threatened amphibians of the world*. Barcelona: International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources, Gland, Switzerland; Conservation International, Arlington, VA. Lynx Editions.
- Therneau, T. (2014). A package for survival analysis in S. R package version 2.37-7 Retrieved on July 9th 2014 Retrieved from <http://cran.rproject.org/web/packages/survival/index.html>.
- Timpe, E. K., Graham, S. P., Gagliardo, R. W., Hill, R. L., & Levy, M. G. (2008). Occurrence of the fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Georgia's amphibian population. *Herpetological Review*, 39, 447–449.
- Van Rooij, P., Martel, A., Nerz, J., Voitel, S., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F., & Pasmans, F. (2011). Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Mexican bolitoglossine salamanders using an optimal sampling protocol. *Ecohealth*, 8, 237–243. doi:10.1007/s10393-011-0704-z.
- Villers-Ruiz, L., & Castañeda-Aguado, D. (2013). Species and plant community reorganization in the Trans-Mexican Volcanic Belt under climate change conditions. *Journal of Mountain Science*, 10, 923–931. doi:10.1007/s11629-013-2719-0.
- Voyles, J., Berger, L., Young, S., Speare, R., Webb, R., Warner, J., Rudd, D., Campbell, R., & Skerratt, L.F. (2007). Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. *Diseases of Aquatic Organisms*, 77, 113–118.
- Voyles, J., Rosenblum, E. B., & Berger, L. (2011). Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity. *Microbes and Infection*, 13, 25–32. doi:10.1016/j.micinf.2010.09.015.
- Wake, D. B., & Vredenburg, V. T. (2008). Colloquium paper: are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 11466–11473.

Woodhams, D. C., & Alford, R. A. (2005). Ecology of chytridiomycosis in rainforest stream frog assemblages of tropical Queensland. *Conservation Biology*, 19, 1449–1459.

doi:10.1111/j.1523-1739.2005.004403.x.

Woodhams, D., Alford, R.A., & Marantelli, G. (2003). Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55, 65–67.

doi:10.3354/dao055065.

Table 1. *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) prevalence in the field and after temperature treatments. The ZGE (zoospore genomic equivalent) range represents the infection load range. Prevalence is measured as the number of infected salamanders divided by the total number of organisms collected.

Collection date	No. of salamanders collected	No. of infected salamanders in the field (ZGE range)	Prevalence %	95% CI for prevalence	S.D.
June 2011	4	0	0		
July 2011	35	6 (410–7,812)	0.17	(0.047, 0.296)	2937.7 6
August 2011	21	0	0	--	--
September 2011	21	2 (372.8, 1,264)	0.10	(0.000, 0.221)	630.17
December 2011	25	4 (3,460–3,700)	0.16	(0.016, 0.304)	98.95
January 2012	19	0	0	--	--
February 2012	8	0	0	--	--
March 2012	9	0	0	--	--
April 2012	3	0	0	--	--
September 2012	15	0	0	--	--

Table 2. Results of the temperature treatments. N = Number of organisms in the experiment. Prevalence is measured as the number of infected salamanders divided by the total number of organisms in the experiment. The ZGE range is the zoospore genomic equivalent loads or the infection load. Mortality is the percentage of dead salamanders divided by the total number of organisms exposed to each treatment.

Treatment °C	N	<i>Bd</i>- Positives after treatment	Prevalence %	95% CI for prevalence	ZGE range	Mortality
10	30	8	26	(0.108, 0.425)	80–7,022	63%
15	30	9	30	(0.136, 0.464)	87–9,679	40%
20	30	8	26	(0.108, 0.425)	39– 41,390.40	73%
23	30	15	4.0	(0.225, 0.575)	8.3–6,037	70%
25	30	5	13	(0.012, 0.255)	156–9,798	100%
28	10	0				
TOTAL	160	45				

Table 3. Summary of the survivorship analyses that measured the probability of death associated with each temperature treatment. Cox's proportional risk models used the 10 °C treatment as a reference. For the analyses, each temperature treatment was considered a *level*, and the collection month was considered a *stratum*.

Kaplan-Meier test		Cox's proportional risks model			
Analysis model	Test of significance	Analysis model	Test of significance	Comparisons	Hazard ratio (Significance)
All individuals	$\chi^2 = 59.4$ DF = 4 P < 0.001	all individuals	LRT = 68.8 DF = 4 P < 0.001	15 °C 20 °C 23 °C 25 °C	0.73 1.95 3.29 63.50*
Bd negatives	$\chi^2 = 46.8$ DF = 4 P < 0.001	negatives	LRT = 57.2 DF = 4 P < 0.001	15 °C 20 °C 23 °C 25 °C	0.91 3.59 2.79 160.54*
Bd positives	$\chi^2 = 51.1$ DF = 4 P < 0.001	positives	LRT = 32.9 DF = 4 P < 0.001	15 °C 20 °C 23 °C 25 °C	0.27 1.91 0.47 43.54*

Table 4. Summary of the survivorship analyses that measured the relationship between the infection load and survival in *Pseudoeurycea leprosa*.

Kaplan-Meier test		Cox's proportional risks model			
Formula of the model	Test of significance	Formula of the model	Test of significance	Comparisons	Hazard ratio (Significance)
Cycle groups + strata (Month), rho = 1, data = positives	$\chi^2 = 6.2$ DF = 2 P = 0.046	Cycle groups + \log_{10} (total load + 0.1) data = positives reference = No cycle	LRT = 27.5 DF = 3 P < 0.001	>3 cycle group 1-2 Cycle group \log_{10} (total load + 0.1)	0.02*** 0.32* 2.55***

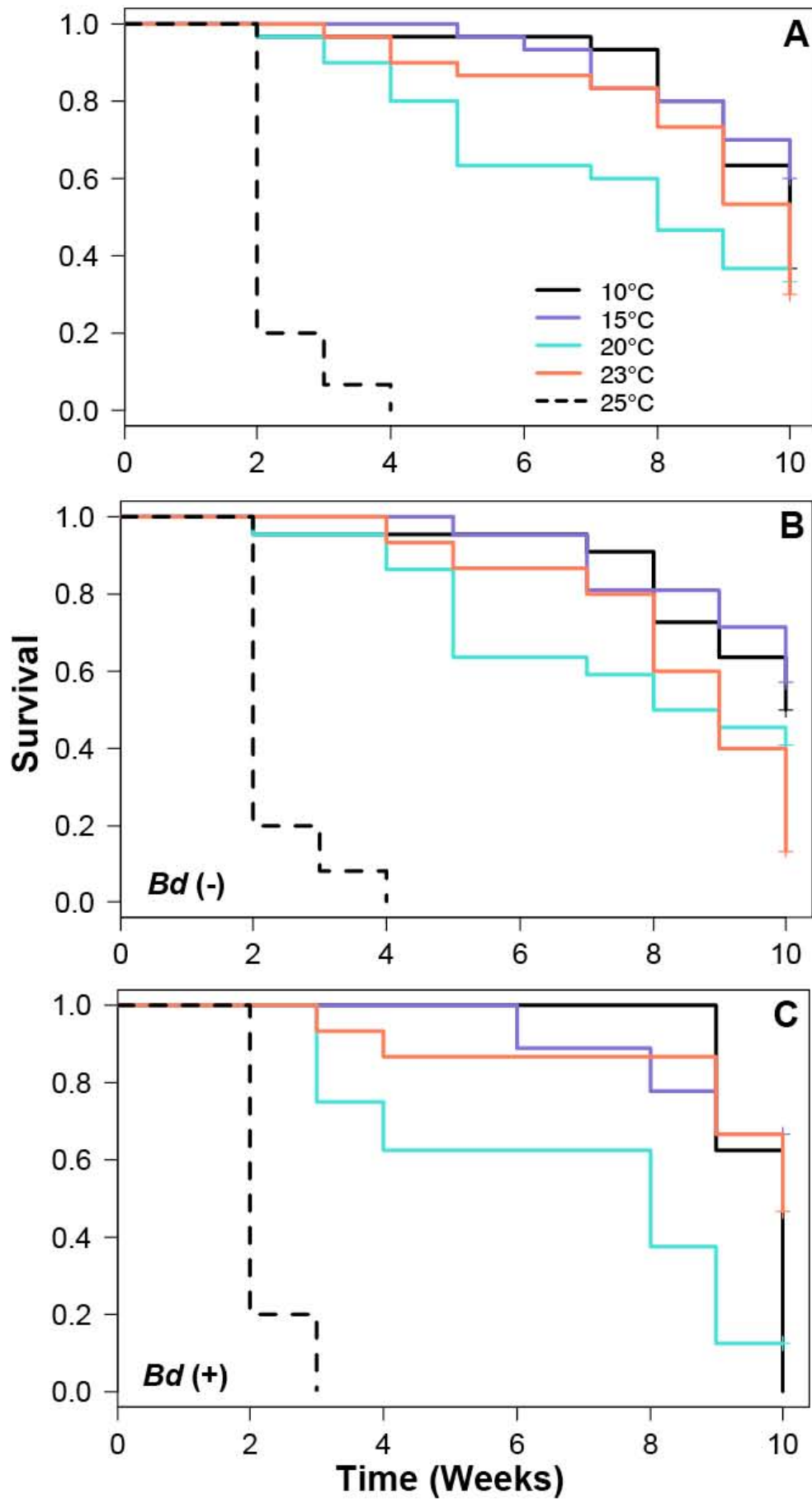


Figure 1. Probability of survival for three analyses, including A) all salamanders, B) uninfected salamanders, and C) salamanders infected at some time during the treatment.

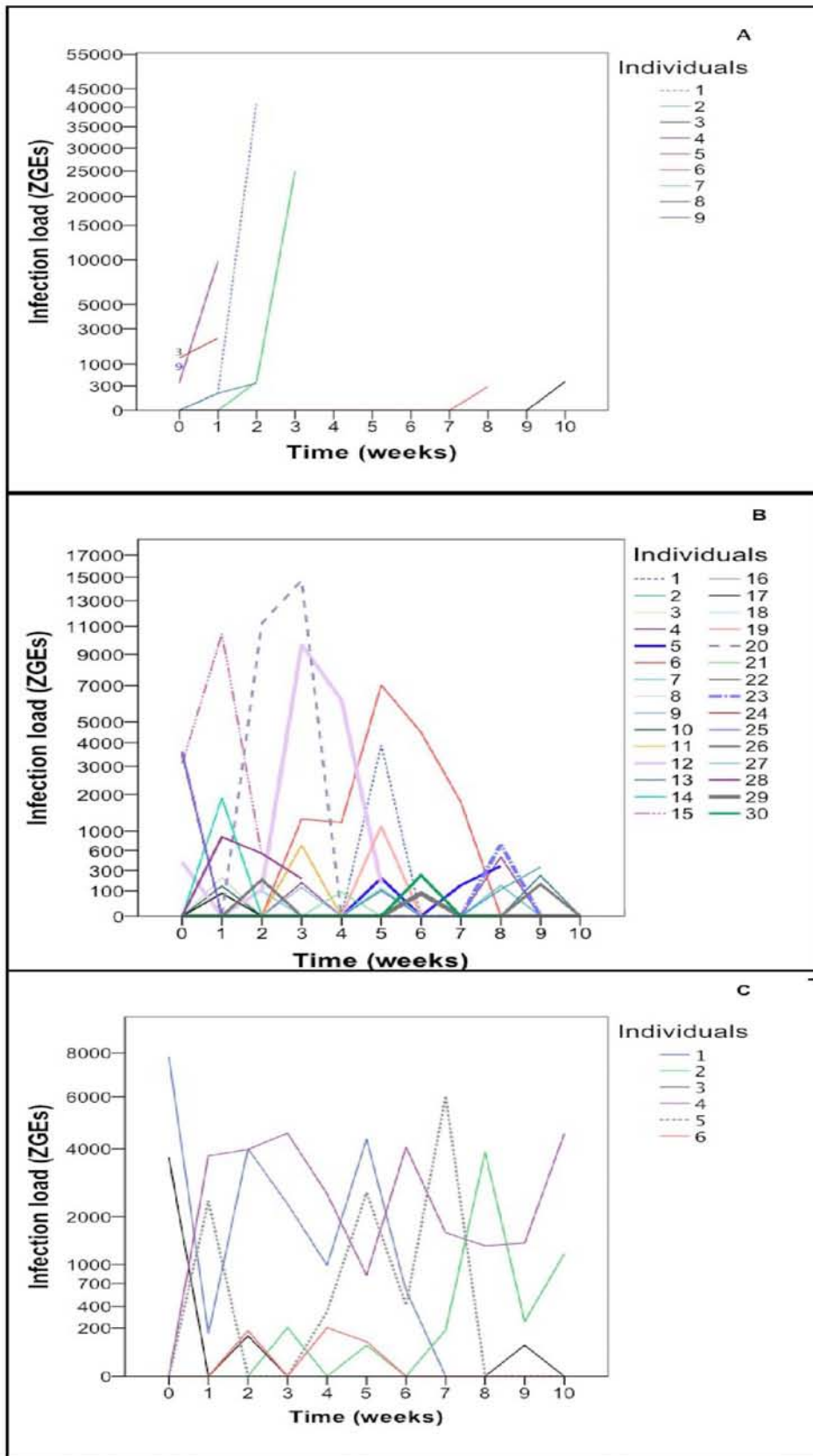


Figure 2. *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) infection loads. (A) No Cycle: animals in which the infection load was either maintained or increased over time. Individuals 3 and 9 died before one week of treatment. (B) 1-2 Cycles: animals in which the infection load decreased/increased once or twice. (C) >3 Cycles: animals in which the infection load decreased/increased three or more times.

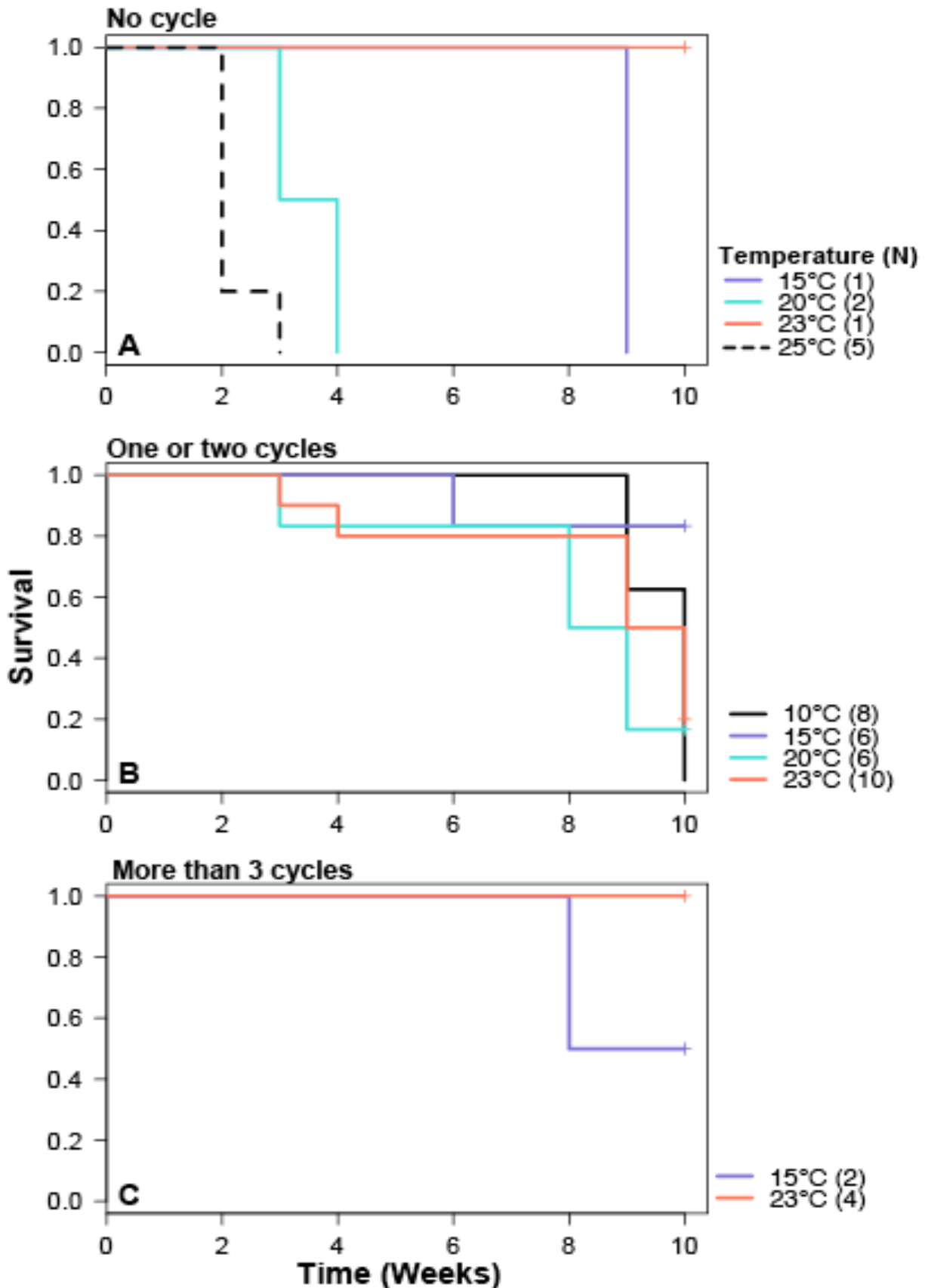


Figure 3. Probability of survival. A) No Cycle: animals in which the infection load was either maintained or increased over time. Individuals 3 and 9 died before one week of treatment. (B) 1-2 Cycles: animals in which the infection load decreased/increased once or twice (C) >3 Cycles: animals in which the infection load decreased/increased three or more times.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN GENERAL

Una vez que se detectó al hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) como agente causal del declive de anfibios en todo el mundo, se dio inicio a la búsqueda y detección de éste en diversos países, incluido México. Diversos estudios llevaron a la detección de *Bd* en 13 estados de la República, desde el Norte del país en los estados de Sonora y Baja California (Luja et al., 2012; Global Bd-Mapping Project, 2013) hasta Chiapas (Lips et al., 2004, Hale, 2005; Frías et al., 2008; Muñoz- Alonso, 2010, Cheng et al., 2011; Van-Roijj et al., 2011), en los que están representadas 50 especies de anfibios (Lips et al., 2004, Hale, 2005; Frías et al., 2008; Muñoz- Alonso, 2010; Cheng et al., 2011; Van-Roijj et al., 2011). Uno de los resultados de esos trabajos (Cheng et al., 2011) indica que el patógeno infectó a especies de la familia Plethodontidae desde la década de 1972, sugiriendo que el brote epidemiológico de la quitridiomycosis en México surgió en ese grupo y que su declive reportado desde 1999 fue ocasionado por dicha interacción (Parra et al., 1999).

Hasta la fecha, todos los estudios realizados con la quitridiomycosis en México habían realizado muestreos de manera aleatoria para comprobar su presencia a lo largo de la República. El presente trabajo contribuyó al conocimiento sobre *Bd* en México en cuatro diferentes vertientes. 1) El estado de conocimiento de *Batrachochytrium dendrobatidis* en México, 2) la modificación del método utilizado para aislamiento y cultivo de *Bd* en anfibios mexicanos, 3) la confirmación del problema en la obtención de cuantificaciones no equivalentes entre cepas, debido las diferencias en el número de copias de la región ITS, la que se ha usado para la detección mediante PCR en tiempo real, y 4) la detección, cuantificación y dinámica de infección por *Bd* en *Pseudoeurycea leprosa* bajo determinadas condiciones de temperatura.

Este trabajo determino que hasta el momento se ha registrado la infección en 50 especies. La mayoría de estas se distribuyen en las regiones montañosas del noroeste, centro y sur del país. Es importante señalar que las especies *Agalychnis moreletii*, *Plectrohyla ixil*, *Ambystoma granulosum*, *Bolitoglossa rufescens*, *Pseudoeurycea nigromaculata*, *Pseudoeurycea smithi*, y *Thorius pennatululus* se encuentran en peligro crítico de acuerdo con la UICN (2013), por lo que se deben de tomar medidas para conservar sus poblaciones infectadas por *Bd* en los estados de Chiapas, Guerrero, Michoacan, Veracruz y Oaxaca.

Por otra parte, se ha documentado que el cambio climático global ha provocado la presencia de brotes epidemiológicos en varias regiones. Con respecto a México. el cambio

significativo de temperatura fue evaluado a partir de 1970, lo que coincide con el inicio de la oleada epidémica de *Bd* en el sur del país. El registro de la temperatura en los sitios con declive y prevalencia del patógeno sugiere que la temperatura permitió su supervivencia, pero no hay una asociación clara con el incremento en la prevalencia de *Bd*. Aún no se puede comprobar que el cambio climático global se encuentre relacionado con la aparición y virulencia de *Bd* en México, debido a que no se cuenta con datos suficientes de número de individuos infectados y grado de infección en los sitios monitoreados por Parra-Olea et al. (1999) y Rovito et al. (2009). Por lo anterior, es necesario realizar un análisis de detección histológica de *Bd* en los anfibios colectados durante el siglo XX, con el fin de determinar la relación entre las condiciones ambientales que se presentaron después del cambio climático y la prevalencia del patógeno.

La familia Plethodontidae es importante para el análisis de la quitridiomycosis, ya que refleja el efecto de la enfermedad en las poblaciones de anfibios completamente terrestres y porque se ha determinado que toleran altos grados de infección, por lo que pueden ser vectores del patógeno y causantes de la prevalencia de la infección en los ecosistemas.

Recientemente se descubrió un nuevo quitridio, *Batrachochytrium salamandrivorans* (Martel et al., 2013) de elevada virulencia con especificidad aparente a los caudados en Europa. Este nuevo descubrimiento trae consigo varias incógnitas; por ejemplo, dada la especificidad a los caudados, emerge la necesidad de revisar si éste estuvo involucrado en las extinciones y declinaciones observadas en México. Por otro lado, plantea la posibilidad de nuevas cepas emergentes en los diferentes grupos o en las diferentes regiones geográficas, por tanto, hay que estudiar a detalle las características genéticas y morfológicas de la cepa de *Bd* que infecta a las poblaciones naturales de anfibios de México.

Adicionalmente, este trabajo sugiere que la dispersión del patógeno en México fue facilitada por la introducción y desplazamiento de *L. catesbeiana* ocurrido en la primera mitad del siglo XX. Es necesario obtener el cultivo de cepas de *Bd* provenientes de este anuro, con el fin de determinar los genotipos, conocer su virulencia y las posibles rutas de entrada y dispersión del patógeno. El estudio de dinámica de infección por *Bd* en *L. catesbeiana* en México es importante porque se ha señalado que esta especie ha sido la causante de su elevada dispersión. por lo que

Finalmente, en México, los estudios futuros sobre la quitridiomycosis deberían centrarse en: 1) aislar las cepas de *Bd* de poblaciones de anfibios silvestres, ya que sólo se cuenta con la

cepa MexMkt que fue aislada de anfibios de comercio (Longo et al., 2013); 2) determinar las diferencias en la virulencia de las cepas del patógeno en una muestra representativa de las especies y poblaciones de anfibios, con el fin de establecer las zonas y poblaciones que son más susceptibles a la enfermedad; 3) identificar el impacto de la variabilidad ambiental en la virulencia de *Bd* y en las especies de anfibios; 4) identificar las estrategias que los anfibios pudieran estar realizando para combatir la infección y 5) estudiar detalladamente la respuesta inmune entre parásito-hospedero, con el fin de encontrar vías que beneficien los mecanismos que promuevan resistencia a la infección por *Bd*. Adicionalmente, se debe alertar e informar a la población acerca de las medidas de prevención y de desinfección de los materiales utilizados en el cautiverio de los anfibios. Es prioritario realizar estas medidas en los estados de Oaxaca, Chiapas y Veracruz, ya que son los estados con mayor diversidad y endemismos de anfibios en México.

Aislamiento y cultivo de *Bd* en anfibios mexicanos

Este trabajo se derivó como producto del análisis de piel para detectar, aislar y cultivar a *Batrachochytrium dendrobatidis* en ejemplares de *Pseudoeurycea leprosa* e *Hyla eximia*, debido a que fue necesaria la creación de muestras con la cantidad de ADN en 0.1, 1, 10, 100, 1000 y 10,000 equivalentes zoosporas para la realización de detección y cuantificación de grado de infección con la técnica de PCR en tiempo real (qPCR).

Posterior a varios intentos para obtener el aislamiento del patógeno siguiendo la técnica de Longcore et al. (1999) se modificaron pasos cruciales para extraer la última capa de piel en cada especie y definir el tamaño adecuado de tejido a inocular, con el fin de evitar el crecimiento y propagación de bacterias y hongos no deseados. También se encontró una técnica de limpieza cuando los tejidos de piel inoculados sufrieron contaminación por otros patógenos. Mediante esta técnica se obtuvo la cepa silvestre de la población de *Pseudoeurycea leprosa* en el Parque Nacional La Malinche y la cepa Mex Mkt proveniente de ejemplares de *Hyla eximia* obtenidos de un comercio en el distrito Federal. Esta cepa fue utilizada para realizar el artículo publicado presentado en el capítulo 3 de esta tesis. La técnica reportada será de utilidad debido a que algunos herpetólogos no han podido aislar al patógeno (Burrowes 2002, com. pers.) , posiblemente por la ausencia de conocimientos técnicos utilizados por los micólogos.

Amplificación desigual de la región ITS1 entre cepas de *Batrachochytrium dendrobatidis* y su implicación en la detección y cuantificación del nivel de infección por qPCR

Esta investigación se realizó como una colaboración con el laboratorio de ecología y evolución de la Universidad de Cornell, NY, EU, debido a la necesidad de conocer la

diferencias en la genética y virulencia de las cepas mexicanas con respecto a las presentes en otras regiones. Es importante realizar estudios de este tipo debido a que en el país 50 especies de anfibios se encuentran infectadas, distribuyéndose desde el norte hacia el sur de México, lo cual demuestra la gran dispersión del patógeno.

Este trabajo encontró diferencias genéticas en el número de amplificaciones de la región ITS1 entre ocho cepas de *Bd* encontradas en Norteamérica, Sur América, el Caribe y Australia. También se determinó que la cepa de Mexico (Mex Mkt) presenta diferencias con respecto a la otras siete cepas de estudio, ya que exhibe menor número de copias (10) amplificadas en una zoospora en la región ITS en comparación con las cepas de las otras regiones que presentan de 39 a 144 copias. Los resultados de este trabajo indican que se ha presentado una evolución en la talla del genoma de *Bd* ocurriendo inserciones o deleciones que provocaron diferencias en la región ITS1. Sin embargo, se encontró que no hay variación en la secuencia de ITS1 debido a que el sitio de unión a la sonda y los cebadores han sido conservadas en todas las cepas, por lo que el método de qPCR se puede seguir utilizando pero se sugiere que los investigadores reporten el número de copias de la región ITS1 por zoospora de la cepa utilizada para realizar los estándares que modelan la curva estándar del qPCR.

Aunque el método por PCR en tiempo real ha permitido distinguir niveles de infección menores a una zoospora, los resultados de esta índole pueden ser subestimados. Lo anterior puede presentar repercusiones si los investigadores eliminan la posibilidad de posibles epidemias debido a resultados de infección ínfimos con respecto a los umbrales de infección cercanos a 10,000 equivalentes zoosporas, los que han sido asociados a epidemias de quitridiomycosis (Briggs et al., 2010; Vredenburg et al., 2010; Kinney et al., 2011). También debe de considerarse que en los ecosistemas de anfibios pueden prevalecer diferentes cepas del patógeno provocando distintos niveles de infección, por lo que se debe eliminar el sesgo realizando ensayos de la técnica de qPCR para cada cepa.

Este conocimiento debe tomarse en cuenta en los análisis de detección del quitridio en especies de anfibios que no presentan niveles de infección detectables en campo o que exhiben bajas cargas del patógeno. Un ejemplo son las salamandras pletodóntidas de Norteamérica (Keitzer et al., 2011) y algunas especies de anfibios de Asia. Al respecto Shin et al. (2014) recomiendan la aplicación de un método para que los anfibios con posibles resultados falsos negativos a la infección por *Bd* liberen las zoosporas en un medio acuático para después obtener el ADN de las zoosporas y determinar con precisión la presencia o ausencia del patógeno. Los autores también señalan que este método puede realizarse para monitorear y evaluar la infectividad de cada cepa.

Respuesta a la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Pseudoeurycea leprosa* bajo estrés de temperatura

Los resultados de este trabajo determinaron que la población de *P. leprosa* en el Parque Nacional La Malinche presenta la infección por *Bd* con niveles de valores bajos de prevalencia (0.17 en julio, 0.09 en septiembre y 0.16 en diciembre de 2011), en comparación a otras especies de anuros y salamandras acuáticas como *Eleutherodactylus coqui*, *E. portoricensis*, *Amphiuma means*, *A. pholeter*, *A. tridactylum*, *Necturus alabamensis*, *N. beyeri*, *Pseusobranchus axanthus*, *P. striatus*, *Siren intermedia* y *Siren lacertina*, en las que se presentan valores mayores de 0.34 de prevalencia en vida silvestre y que son considerados como elevados (Longo et al., 2010; Chatfield et al., 2012).

Los valores de prevalencia obtenidos en campo sugieren que *Pseudoeurycea leprosa* presenta resistencia a la infección por *Bd*. Al respecto, estudios de detección del quitridio en poblaciones silvestres de salamandras terrestres confirman valores bajos de prevalencia (0.1 a 0.3) y señalan que las salamandras terrestres presentan factores que combaten la infección por *Bd* (Göçmen et al., 2013). Por ejemplo en siete de las ocho especies del género *Spelomantes* se ha determinado que las secreciones de su piel combaten la infección por *Bd* (Pasmans et al., 2013) de igual manera se ha encontrado que los pletodóntidos *Plethodon cinereus* y *Hemidactylum scutatum* presentan bacterias en la piel que inhiben el crecimiento de *Bd* (Harris et al., 2006; Lauer et al., 2007; Lauer et al., 2008). Esta información infiere que algunos pletodóntidos presentan estrategias para resistir la infección por el quitridio y que por lo tanto *P. leprosa* puede exhibirlas.

Por otra parte al someter a los mismos individuos a una temperatura continua de 10, 15, 20 o 23 °C se determinaron 33 casos nuevos de infección, lo que indica que esos individuos presentaban la infección antes del experimento pero en valores no detectables, es decir los valores de la infección eran falsos negativos. Debido a la baja prevalencia, a la detección de resultados falsos negativos y al comportamiento de la infección durante los experimentos se indica que la especie en vida silvestre presenta resistencia a la infección.

Otros estudios también confirman que los pletodóntidos suelen presentar resultados negativos en lugares con alta probabilidad de presencia de *Bd*. Por ejemplo Keitzer et al. (2011) reportaron un total de 100% resultados negativos a la infección por *Bd* en 273 individuos de seis

especies de pletodóntidos en algunas vertientes de los ríos de los Montes Apalaches de Carolina del Norte en Estados Unidos, cuya región se ha registrado probable para la infección con *Bd* (Chatfield et al., 2009; Chinnadurai et al., 2009; Muletz et al., 2014), por lo que, los autores explicaron que la no detección del patógeno pudo ser causada por que el patógeno no estaba presente en ese momento o porque los valores de infección son muy bajos en esos pletodóntidos. Asociado a esto no se ha detectado la infección en poblaciones de otras especies de pletodóntidos como las de los géneros *Luciasalamandra* e *Hydromantes* (Göçmen et al., 2013; Pasmans et al., 2013). Lo anterior sugiere que si algunos pletodóntidos no exhiben grados de infección elevados es posible que no lo haga *P.leprosa*.

En lo correspondiente al análisis para cada tratamiento de temperatura, los resultados señalaron diferencias significativas entre los valores de prevalencia de *Bd* obtenidos en campo y después del experimento, lo que demuestra que el estrés por temperatura provoca susceptibilidad en *P. leprosa* y mayor oportunidad para el crecimiento del patógeno. Además se determinó que el factor temperatura fue el causante de la mortalidad en cada tratamiento; encontrando que temperaturas mayores de 25 °C afectan la supervivencia de *P. leprosa*. Además se encontró que *P. leprosa* presenta capacidad de recuperación cuando alcanza niveles de infección de 80.86 hasta 14733.60 equivalentes zoosporas.

Con respecto a la infección máxima en *P. leprosa* los resultados señalan que la especie llega a presentar hasta 41,390 equivalentes zoosporas. Este grado de infección se obtuvo en el tratamiento de 20 °C, sin embargo, el número de individuos infectados fue mayor en el tratamiento de 23 °C. Esto coincide con lo reportado en el trabajo de Piotrowski et al. (2004) en el que se menciona que la temperatura óptima para el crecimiento del patógeno se encuentra entre 17 a 23 °C. Además este trabajo corroboró lo mencionado en Cheng et al. (2011) ya que el grado máximo de infección se encuentra en el intervalo de $37,841 \pm 7,111$.

Por otra parte, de acuerdo al trabajo de Cheng et al. (2011) la oleada epidémica de *Bd* inicio en México en 1970 y avanzó a Centroamérica en 1980, por lo que, el declive de poblaciones de anfibios particularmente de salamandras pletodontidas en el país ya debió de haber ocurrido. Tomando en cuenta el número de organismos colectados para este trabajo y el registrado por García-Vázquez et al. (2010) sugieren que *P. leprosa* es una especie abundante y que la presencia de *Bd* podría no estar provocando el declive de sus poblaciones. No obstante, debe considerarse que el cambio climático global podría favorecer un estrés por temperatura en los individuos, por lo que la población de *P. leprosa* en el Parque Nacional la Malinche podría mostrar un declive si las condiciones ambientales se modifican. Tomando en cuenta el trabajo de

Villers-Ruiz y Castañeda-Aguado (2013) en ese sitio las condiciones de temperatura para el año 2020 tendrán un incremento de entre 1.1 a 1.7 °C, mientras que para el 2050 se incrementará entre 2 y 3 °C. Por lo anterior los datos del presente trabajo predicen que entre los años 2020 y 2050 la población de *Pseudoeurycea leprosa* exhibirá probablemente estrés por la temperatura, la que el podría actuar en sinergia con el factor infección por *Bd* provocando elevadas tasas de mortalidad en esta especie.

CONSIDERACIONES FINALES

Ante la amenaza para la sobrevivencia de los anfibios que representa la infección por *Bd*, es crucial encontrar estrategias de conservación y manejo eficientes para estos vertebrados tomando en cuenta las características de cada región. Hasta ahora los investigadores han sugerido dos formas principales de combatir la enfermedad. 1) La realización del monitoreo y la detección temprana de quitridiomycosis en poblaciones silvestres (Australian Government, 2006; Lips et al., 2003; Lips et al., 2006) y 2) la protección mediante la colecta y exposición a tratamientos clínicos para su reintroducción (Briggs et al., 2010).

Además de estas estrategias, algunos investigadores proponen que frenar actividades antropogénicas que propaguen al patógeno y promover la crianza en cautiverio de las especies susceptibles a la infección, son medidas alternativas que pueden limitar el efecto de declive por quitridiomycosis en poblaciones silvestres (Australian Government, 2006; Young et al., 2007). Sin embargo, son complicadas y costosas, por lo que hasta el momento científicos de países latinoamericanos han enfocado grandes esfuerzos en la detección de nuevos brotes de quitridiomycosis y/o someter a los organismos enfermos a tratamiento de desinfección (Lips, 1999; Young et al., 2001; Lips, et al., 2003; Lips et al., 2004; Lips et al., 2006; Lips et al., 2008; Young et al., 2007; Burrowes et al., 2008; Muñoz-Alonso, 2010).

En México las medidas que inicialmente deben realizarse son: 1) el monitoreo y detección temprana de quitridiomycosis en poblaciones silvestres, para lo cual, se debe de tomar en cuenta las áreas potenciales de distribución de *Bd* que propuso Ron (2005), los lugares en los que se ha detectado la infección, 2) Conocer y determinar la distribución de las diferentes cepas así como sus niveles de virulencia para vacunar las especies vulnerables a la infección, 3) alertar e informar acerca de las medidas de prevención y de desinfección a la población encargada de criar, comercializar y mantener en cautiverio a los anfibios. Asimismo es conveniente alertar a los científicos que continuamente exploran las zonas silvestres, de que ellos pueden ser una vía de

diseminación del agente patógeno a través de su vestuario de campo como el calzado u otros materiales (Santos-Barrera, 2004). Por esta razón, una medida inicial de prevención para la diseminación de la enfermedad es desinfectar todo el equipo de campo con las sustancias que eliminan eficazmente al patógeno (Santos-Barrera, 2004; Pessier y Mendelson, 2010).

LITERATURA CITADA

Australian Government. 2006. Background document for the threat abatement plan: infection of amphibians with chytrid fungus resulting in chytridiomycosis. Department of Environment and Heritage, Canberra. http://deh.gov.au/biodiversity/threatened/publications/tap/chytrid/pubs/chytrid_background.pdf; última consulta: 21.I. 2015.

Briggs, C.J., Knapp RA y V.T. Vredenburg. 2010. Enzootic and epizootic dynamics of the chytrid fungal pathogen of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107: 9695–9700.

Burrowes, P. A., A.V. Longo y R L. Joglar. 2008. Geographic distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Puerto Rico. *Herpetological Review*, 39:321-324.

Chatfield, M. W. H., B. B. Rothermel, C. S. Brooks y J. B. Kay. 2009. Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians from the Great Smoky Mountains of North Carolina and Tennessee, USA. *Herpetological Review*, 40: 176–179.

Chatfield, M.C., P. Moler y C. L. Richards-Zawacki. 2012. The amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, in fully aquatic salamanders from southeastern North America. *PLoS ONE*, 7: e44821.

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

Chinnadurai, S. K., D. Cooper, D. S. Dombrowski, M. F. Poore y M. G. Levy. 2009. Experimental infection of native North Carolina salamanders with *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Journal of Wildlife Diseases*, 45: 631-636.

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

García-Vázquez O., M.G. Gutiérrez-Mayén, C.A.Hernández-Jiménez y V. Auriol-López. 2010. Estudio de la densidad poblacional y algunos aspectos ecológicos de *Pseudoeurycea leprosa* en el Parque Nacional La Malinche, Tlaxcala, México. *Boletín de la Sociedad Herpetológica Mexicana* 14 (1): 10-17.

Global *Bd* mapping project. 2013. Recuperado el 05 diciembre 2013, de http://www.bdmaps.net/surveillance/s_country.asp?country=MX

Göçmen, B., M. Veith, N. İğci, B. Akman, O. Godmann y N. Wagner. 2013. No detection of the pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in terrestrial Turkish salamanders (*Lyciasalamandra*) despite its occurrence in syntopic frogs (*Pelophylax bedriagae*). *Salamandra* 49: 51-55.

Hale, S. F., Rosen, P. C., Jarchow, J. L. y G. A. Bradley. 2005. Effects of the chytrid fungus on the Tarahumara frog (*Rana tarahumarae*) in Arizona and Sonora, Mexico. *USDA Forest Service Proceedings*, 36, 407–411.

Harris, R. N., T. Y. James, A. Lauer, M. A. Simon y A. Patel. 2006. The amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. *EcoHealth*, 3:53-56.

Lauer, A., M. A. Simon, J. L. Banning, E. Andre, K. Duncan y R. N. Harris. 2007. Common cutaneous bacteria from the eastern red-backed salamander can inhibit pathogenic fungi. *Copeia*, 3: 630-640.

Lauer, A., M.A. Simon, J.L. Banning, B.A. Lam y R.N. Harris. 2008. Diversity of cutaneous bacteria with antifungal activity isolated from female four-toed salamanders. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 2:145-57.

Lips, K.R. 1999. Mass mortality and population declines of anurans at an upland site in western Panama. *Conservation Biology*. 13: 117-125.

- Lips, K.R., D.E. Green y R. Papendick. 2003. Chytridiomycosis in wild frogs from Southern Costa Rica. *Journal of Herpetology*, 37: 215-218.
- Lips, K. R., Mendelson III, J. R., Muñoz-Alonso, A., Canseco-Márquez, L. y Mulcahy, D. G. 2004. Amphibian population declines in montane Southern Mexico: resurveys of historical localities. *Biological Conservation*, 119, 555–564.
- Lips, K.R., F. Brem, R. Brenes, J.D. Reeve, R.A. Alford y J. Voyles. 2006. Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 102:3165-3170.
- Lips, K.R., J. Diffendorfer, J.R. Mendelson III y M.W. Sears. 2008. Riding the wave: Reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *Plos Biology*, 6: 441-454.
- Longcore, J. E., Pessier, A. P. y Nichols, D. K. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91, 219–227.
- Longo, A. V., P. A. Burrowes, y R. L. Joglar. 2010. Seasonality of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in direct-developing frogs suggests a mechanism for persistence. *Diseases of Aquatic Organisms*, 92: 253–260.
- Longo, A. V., Rodríguez, D., Da Silva-Leite, D., Toledo, L. F., Mendoza-Almeralla, C., Burrowes, P. A. et al. 2013. ITS1 copy number varies among *Batrachochytrium dendrobatidis* strains: implications for qPCR estimates of infection intensity from field-collected amphibian skin swabs. *PLoS One*, 8, e59499.
- Luja, V. H., R. Rodríguez-Estrella, K. Ratzlaff, G. Parra-Olea y Ramírez-Bautista, A. 2012. The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in isolated populations of the Baja California tree frog *Pseudacris hypochondriaca curta* in Baja California Sur, Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 57: 323–327.
- Keitzer, S.C., R. Goforth, A.P. Pessier y A.J. Johnson. 2011. Survey for the pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in southwestern North Carolina salamander populations. *Journal Wildlife Diseases*, 47: 455–458.
- Kinney, V.C., J.L. Heemeyer, A.P. Pessier, M.J. Lannoo. 2011. Seasonal pattern of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and mortality in *Lithobates areolatus*. Affirmation of Vredenburg's '10,000 Zoospore Rule'. *PLoS ONE*, 6: e16708. 92, 253–260.
- Martel, A., A. Spitzen-Van der Sluijs, M. Blooi, W. Bert, R. Ducatelle, M. C. Fisher, A. Woeltjes, W. Bosman, K. Chiers, F. Bossuyt y F. Pasmans. 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 15325–15329.
- Muletz, C., N. M. Caruso, R. C. Fleischer, R. W. McDiarmid y K R. Lips. 2014. Unexpected Rarity of the Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Appalachian *Plethodon* Salamanders: 1957–2011. *PLoS ONE*, 9(8): e103728.
- Muñoz-Alonso, L. A. 2010. Riqueza, diversidad y estatus de los anfibios amenazados en el sureste de México; una evaluación para determinar las posibles causas de la declinación de las poblaciones. San Cristóbal de las Casas, Chiapas: Colegio de la Frontera Sur.
- Parra-Olea, G., García-Paris, M. y Wake, D. B. 1999. Status of some populations of Mexican salamanders (Amphibia: Plethodontidae). *Revista de Biología Tropical*, 47, 217–223.
- Pasmans, F., P. Van Rooij, M. Blooi, G. Tessa, S. Bogaerts, T.W. Garner, M. Fisher, B.R. Schmidt, T. Woeltjes, W. Beukema, F. Oneto y D. Ottonello. 2013. Resistance to Chytridiomycosis in European Plethodontid Salamanders of the Genus *Speleomantes*. *PLoS ONE*, 8(5): e63639.
- Pessier, A.P. y J.R. Mendelson. 2010. A Manual for Control of Infectious Diseases in Amphibian Survival Assurance Colonies and Reintroduction Programs. IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group. Apple Valley, California. 229 p.

Piotrowski, J.S., S.L Annis y J.F. Longcore. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96: 9-15. Ron, S. R. 2005. Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the new world. *Biotropica*, 37:209-221.

Ron, S. R. 2005. Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the new world. *Biotropica*, 37, 209–221.

Rovito, S. M., G. Parra-Olea, C.R. Vásquez-Almazán, T. J. Papenfuss y D. B. Wake. 2009. Dramatic declines in neotropical salamander populations are an important part of the global amphibian crisis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 3231-3236.

Santos-Barrera, G. 2004. Enfermedades infecciosas y su papel en la declinación mundial de las poblaciones de anfibios. *Biodiversitas, CONABIO* 56:1-6.

Shin J, A. Bataille, T.A. Kosch y B. Waldman. 2014. Swabbing Often Fails to Detect Amphibian Chytridiomycosis under Conditions of Low Infection Load. 20014. *PLoS ONE*, 9(10): e111091.

UICN (Union Internacional para la Conservación de la Naturaleza). 2013. Recuperado el 05 diciembre 2013, de <http://www.iucnredlist.org>.

Van-Rooij, P., Martel, A., Nerz, J., Voitel, S., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F. Pasmans. 2011. Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in mexican Bolitoglossine salamanders using an optimal sampling protocol. *EcoHealth*, 8:237-243.

Villers-Ruiz, L y D. Castañeda-Aguado. 2013. Species and Plant Communities Reorganization in the Trans-Mexican Volcanic Belt under Climate Change Conditions. *Journal of Mountain. Science*, 10(6): 923-931.

Vredenburg, V.T., R.A. Knapp, T.S. Tunstall y C.J. Briggs. 2010. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 9689–9694.

Young, B. E., K.R. Lips, J.K. Reaser, R. Ibañez. A.W.Salas, S. R.Cedeño, L. A. Coloma, S. Ron, E. La Marca, J. R. Meyer, A. Muñoz, F. Bolaños, G. Chaves y D. Romo. 2001. Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conservation Biology*, 15:1213-1223.

Young, S., L. Berger y R. Speare. 2007. Amphibian chytridiomycosis: strategies for captive management and conservation. *International Zoo Yearbook*, 41:85-95.