



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA.**

**Laboratorio de Ecología Evolutiva de Anfibios y Reptiles**

**Evaluación de la carga fúngica diferencial de  
*Batrachochytrium dedrobatidis* en anfibios de la reserva  
de Nahá, Chiapas.**

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**BIOLOGO**

PRESENTA:

**Solis Sotelo Octavio\***

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. Hibraim Adán Pérez-Mendoza\*\***

Avenida De Los Barrios N° 1, Colonia Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Estado De México, Cp. 54090.

\*octaviosolis990@gmail.com, \*\*hibraimperez@ciencias.unam.mx.



**Ciudad de México, Septiembre 2017**



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.

## INDICE

Resumen .....	1
1. Introducción.....	2
2. Antecedentes directos .....	6
3. Justificación .....	7
4. Hipótesis .....	9
5. Objetivo general .....	10
5.1 ObjetivosParticulares .....	10
6. Materiales y Método. ....	11
6.1 Fase de campo.....	11
6.1.1 Área de estudios .....	11
6.1.2 Geología .....	12
6.1.3 Fisiografía.....	12
6.1.4 Edafología .....	12
6.1.5 Hidrología.....	13
6.1.6 Climatología .....	13
6.1.7 Vegetación.....	13
6.1.8 Fauna .....	16
6.2 Familia Hylidae.....	17
6.2.1 Subfamilia- Phyllomedusinae .....	18
6.2.2 Genero Agalychnis.....	19
6.2.3 <i>Agalychnis callidryas</i> (Cope-1862).....	20
6.2.3 <i>Agalychnis moreletii</i> (Duméril-1853) .....	21
6.2.4 <i>Tlalocohyla picta</i> (Günther-1901).....	21
6.2.5 <i>Hyalinobatrachium fleishmanni</i> (Boettger-1893) .....	22
6.2.6 <i>Craugastor laticeps</i> (Duméri-1853).....	23
6.2.7 <i>Rhinophrynus dorsalis</i> (Duméril & Bibron-1841).....	23
6.2.8 <i>Bolitoglossa mexicana</i> (Duméril, Bibron & Duméril-1854).....	24
6.2.9 <i>Bolitoglossa rufescens</i> (Cope-1869) .....	25
6.3 Phylum Chytridiomycota .....	25
6.3.1 Clase: Chytridiomicetos .....	26
6.3.2 <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	27

6.3.3 Chytridiomycosis .....	29
6.4 Trabajo de campo y obtención de muestras .....	30
6.5 Trabajo de laboratorio .....	35
6.5.1 Extracción de DNA .....	35
6.5.2 Dilución .....	36
6.5.3 Preparación de primers y sonda .....	36
6.5.4 Estándares de cuantificación .....	36
6.5.5 Ensayo PCR en tiempo real:.....	37
6.5.6 Análisis de PCR .....	39
7. Análisis estadísticos.....	40
8. Resultados.....	41
8.1 Análisis Descriptivo .....	41
8.2 Análisis Estadístico .....	45
9. Discusión .....	47
10. Conclusiones.....	57
11. Recomendaciones .....	58
12. Literatura citada.....	59
13. Apéndice.....	70

## **Agradecimientos**

La vida desde su origen ha buscado siempre el trabajo conjunto, los átomos, moléculas, células, tejidos, organismo, poblaciones, comunidades, ecosistemas, la tierra en sí misma han logrado converger para lograr la mayor de las maravillas, la vida.

Durante mi vida, mi historia de vida (jaja), me ha percatado que trabajar solo y negarse a recibir ayuda, evidentemente no es la mejor opción ni el camino para seguir., no negaré que en ocasiones he dudado que el trabajo en equipo sea lo mejor. Sin embargo, cuando estás solo los errores y caídas son más duras de superar, pero cuando hay personas a tu lado apoyándote todo se vuelve más sencillo.

Por tal motivo hoy quiero agradecer a mis padres, hermanos, familiares, amigos y a mi mejor amiga y compañera por estar a mi lado durante este largo camino, así como por no perder la “fe” en mis habilidades y capacidades y darme todo su apoyo para alcanzar mis sueños.

A mi profesor Hibraim, por darme la confianza y la motivación para confiar en mis ideales a pesar de los obstáculos, por todo su apoyo a lo largo de mi formación, así como por brindarme su amistad y ser mi guía en este proceso. Finalmente quiero hacer un agradecimiento especial a la Doctora Gabriel Parra, Delia Basanti y Tania Garrido por su gran apoyo durante el proceso de investigación y a todas las personas que fueron parte de esta única y formidable experiencia.

Hoy no soy más un alumno de biología, hoy soy un portador de conocimiento, hoy formo parte de los afortunados que destinan su vida a desentrañar los misterios de la vida en su forma más pura, el día de hoy me convierto en BIÓLOGO.

## Resumen

Actualmente los organismos de la clase Amphibia experimentan una reducción en sus poblaciones, resultado de factores como la pérdida del hábitat, introducción de especies, así como enfermedades fúngicas; las cuales son consideradas el factor más importante en la reducción de las poblaciones. Particularmente, la quitridiomycosis causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). Considerando la problemática actual, se vuelve una necesidad conocer la distribución del hongo en las diferentes poblaciones naturales. El presente estudio pretendió determinar la carga fúngica diferencial de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios de la reserva de Nahá, Chiapas. Se obtuvieron muestras con hisopos estériles de la superficie del abdomen, muslos y patas anteriores para las especies: *Craugastor laticeps*, *Agalychnis callidryas*, *Agalychnis moreletii*, *Tlalocohyla picta*, *Hyalinobatrachium freishmanni*, *Rhinophrynus dorsalis*, *Bolitoglossa rufescens* y *Bolitoglossa mexicana* y se analizaron por PCR en tiempo real. Se encontraron resultados positivos ante el Bd para las especies *Agalychnis moreletii* (Adultos y Renacuajos), *A. callidryas* (Adultos) y *Tlalocohyla picta* (Adultos), siendo los resultados negativos para las especies restantes, de igual forma se observó una carga diferencial de zoosporas en las especies mencionadas.

Palabras clave: Amphibia, quitridiomycosis, *Batrachochytrium dendrobatidis*, Nahá, real-time PCR.

## 1. Introducción

Actualmente los anfibios han recibido gran atención debido a que un gran número de especies se encuentran en alguna categoría de riesgo. De acuerdo con la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) es el grupo de vertebrados con mayor riesgo en comparación con otros taxa: con 427 especies (7.4%) listadas en peligro crítico (IUCN), comparada con 179 aves (1.8%) y 184 mamíferos (3.8%) (IUCN, 2003). En 1980 el número de especies de anfibios en riesgo crítico (CR) se encontraba cercano al de mamíferos, sin embargo, desde la década de los 80's el número de especies en riesgo crítico ha aumentado al doble (Stuart *et al.*, 2004). Varios factores como el cambio climático, enfermedades fúngicas y pérdida de hábitat se han identificado como aspectos determinantes en la reducción de las poblaciones de anfibios, generando un incremento de especies en diferentes categorías de riesgo (Wake & Vredenburg, 2008; Guilherme *et al.*, 2007; Berger *et al.*, 2004).

Las enfermedades fúngicas, particularmente la **Chytridiomycosis**, causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), han sido señaladas como la causa más importante en el declive y extinción de poblaciones de anfibios como resultado de cambios epidérmicos (decoloración, hiperqueratinización, malformaciones, desbalance osmótico entre los más importantes) en anuros adultos y pérdida de piezas bucales en renacuajos (Hirschfeld *et al.*, 2016; Berger *et al.*, 1998). Hoy en día el patógeno se encuentra distribuido en casi todo el mundo: América, África, Asia, Europa y Oceanía en 56 de las 82 ciudades analizadas (68%) y en un total de 516 especies (Olson *et al.*, 2013; Berger *et al.*, 1998) (Apéndice 2). A pesar de su distribución, se sabe que el patógeno tiene un óptimo crecimiento a 23°C y su mortalidad aumenta a temperaturas menores a 16°C y mayores a 25°C (Berger *et al.*, 2004).

El primer reporte *in vivo* de Chytridiomicosis en el mundo se dio en Australia durante eventos masivos de mortalidad, fue considerado el primer caso de parasitismo en vertebrados por miembros del phylum Chytridiomycota (Berger *et al.*, 1998).

En América, la infección por Bd ha sido reportada desde 1970 para los estados de Veracruz, Oaxaca e Hidalgo a partir de ejemplares depositados en colecciones (Cheng *et al.*, 2011).

Lips y colaboradores (2003) datan los primeros reportes de Bd en Costa Rica (1993) en las especies *Eleutherodactylus melaneostictus* y *Atelopus chiriquiensis*. Asimismo, Velásquez y colaboradores en el 2008, reportan la presencia de Bd en Colombia desde 1994 siendo el género *Pristimantis*, el que presenta mayor porcentaje de infección. Posteriormente se reportó la presencia de Bd nuevamente en Costa Rica en 1997, donde se encontró que los géneros más afectados eran *Craugastor* y *Bolitoglossa* (Cheng *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de todos los reportes que existían sobre el Bd, no estaba claro cuál era el centro de origen y dispersión del hongo. Durante mucho tiempo se consideró originario de África y que su dispersión se dio a través de *Xenopus laevis* (Weldon *et al.*, 2004) que fue una rana muy utilizada en experimentos de laboratorio en todo el mundo. Sin embargo, existe evidencia de que el hongo ha estado presente antes que el presunto origen africano en los bosques de Brasil (Mata atlántica) al menos desde 1894 (Rodríguez *et al.*, 2014), ante dicho descubrimiento su origen probable (aún no claro del todo) apunta al continente Americano.

Actualmente, se ha reportado la presencia de Bd en las familias Leptodactylidae e Hylidae en Colombia (Vásquez-Ochoa *et al.*, 2012), en Hylidae y Ranidae en Nicaragua y El Salvador (Felger *et al.*, 2007; García-Roa *et al.*, 2014), así como en los géneros: *Craugastor*, *Duellmanohyla*, *Lithobates* y *Plectrohyla* en Honduras (Kolby *et al.*, 2010) y en la especie *Melanophryniscus aff montevicensis* en Argentina (Angostini *et al.*, 2015).

Para México, la infección por Bd se han reportado especies de anfibios silvestres y en cautiverio que presentan la infección del patógeno en regiones de Baja California, Oaxaca y Tabasco (Frías-Álvarez *et al.*, 2008), siendo México el país con el mayor número de reportes de Bd, lo cual se considera un problema grave al ser considerado uno de los cinco países con mayor riqueza de anfibios (Revisión Bibliográfica) (Apéndice 1).

Particularmente en el caso de Chiapas (Istmo de Tehuantepec) se ha reportado la presencia del hongo expresada como promedio de zoosporas por individuo en las especies: *Dendropsophus ebraccatus* (259.44 zoosporas), *Agalychnis moreletii* (191.20 zoosporas), *Smilisca baudinii* (871.36 zoosporas), *Tlalocohyla loquax* (2.20 zoosporas) y *Bolitoglossa rufescens* (427.52 zoosporas) (Muñoz-Alonso, 2010). Asimismo, se reporta la presencia de Bd en *Eleutherodactylus saltator* y *Ptychohyla erythromma*, reportando que el 19% de los renacuajos estudiados carecían de partes bucales, en regiones de Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Lips *et al.*, 2004). De igual forma se reporta la presencia de Bd en cuatro de las cinco áreas cero extinción (Áreas AZE) (Lamoreux *et al.*, 2015) en regiones pertenecientes a Oaxaca y Chiapas (Cabrera, 2012).

Es importante remarcar que en México la familia de anuros con mayor diversidad es Hylidae con 97 especies, la cual posee un alto grado de endemismo con 66 especies que representan el 68% del total de especies de anfibios endémicos (252) en México, por lo cual se considera un grupo clave en la investigación actual (Parra-Olea *et al.*, 2014). De manera paralela la familia Plethodontidae del orden Caudata posee la más alta diversidad con 117 especies. Asimismo, México es considerado el país con mayor número de áreas cero extinción (AZE-68), así como especies (151) dentro de las listas de protección, de las cuales (98-64.9%) son anfibios presentes en el 57.4% de los sitios (39), de los cuales un tercio de la diversidad está presente en los estados de Oaxaca y Chiapas (Lamoreux *et al.*, 2015).

Considerando la elevada diversidad de anfibios en el país es importante considerar los efectos que sobre la adecuación (Fitness) tiene el Bd, de manera general la infección por Bd incide sobre la condición corporal, es decir los organismos infectados poseen tallas menores que los no infectado (Burrowes *et al.*, 2008). Dicha situación podría estar asociado directamente con una modificación del índice corporal (Razón que asocia masa y talla), lo que podría implicar un fenómeno de selección con efectos desconocidos sobre las poblaciones.

En este sentido y considerando la problemática actual que viven los anfibios ante el riesgo del Bd, se vuelve una necesidad la realización de estudios enfocados a determinar la presencia y distribución del patógeno, con el fin de poseer un marco claro del alcance de la Chytridiomycosis en el país, tomando en cuenta su diversidad y la vulnerabilidad de estas especies.

## 2. Antecedentes directos

En el caso de la especie *Dendropsophus microcephalus* se ha reportado la presencia del hongo en la región andina central de Colombia (Vásquez-Ochoa *et al*, 2012), sin embargo, no hay reportes para México, concernientes a la especie.

Posteriormente un estudio realizado por García-Roa *et al* (2014) se reporta por primera vez la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en Nicaragua, en el estudio las especies *Agalychnis callidryas* y *Lithobates brownorum* resultaron positivas para el hongo con un número de zoosporas equivalentes de 0.6 y 0.27 respectivamente, siendo el primer reporte para las especies.

Particularmente en el caso de Chiapas (Istmo de Tehuantepec), se ha reportado la presencia del hongo para las especies expresada como promedio de zoosporas por individuo: *Dendropsophus ebraccatus* (259.44 zoosporas), *Agalychnis moreletii* (191.20 zoosporas), *Smilisca baudinii* (871.36 zoosporas), *Tlalocohyla loquax* (2.20 zoosporas) y *Bolitoglossa rufescens* (427.52 zoosporas) (Muñoz-Alonso, 2010).

Asimismo, se reporta la presencia de Bd en *Eleutherodactylus saltator* y *Ptychohyla erythromma*, reportando que el 19% de los renacuajos estudiados carecían de partes bucales, así como su presencia en cinco zonas cero extinción en regiones pertenecientes a Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Lips *et al.*, 2004; Cabrera, 2012).

De manera paralela para las especies *Tlalocohyla picta*, *Bolitoglossa mexicana* y *Craugastor laticeps* no existen reportes a la fecha de la incidencia del hongo (Muñoz-Alonso, 2010).

Es importante enmarcar la importancia de los estados de Oaxaca y Chiapas en los estudios anteriores, debido a que albergan la mayor diversidad de Herpetofauna de todo el País (Johnson *et al.*, 2015) y por ende es relevante reconocer el riesgo latente ante el Bd que corren las especies que se encuentran en estos estados.

### 3. Justificación

Las regiones tropicales albergan el mayor porcentaje de especies de anfibios (22-59%), sin embargo, también posee el mayor porcentaje de declinación (9-56%), por tal motivo el estudio de dichas zonas se ha vuelto una prioridad para mitigar la declinación de las poblaciones (Stuart *et al.*, 2004) (Suplementaria 3).

En el caso de México es importante resaltar que los estados de Oaxaca y Chiapas albergan la mayor diversidad de Herpetofauna de todo el país (Johnson *et al.*, 2015), y por tanto es relevante conocer el riesgo que corren las especies que se encuentran en estos estados ante el Bd. Es crucial enfatizar que dentro del territorio que conforma Chiapas se encuentra el área natural protegida (ANP) Nahá, que actualmente cuenta aún con zonas de vegetación conservada (CONANP, 2006) que permite el mantenimiento de las poblaciones naturales, siendo zonas con escasa o nula investigación y por ende punto clave para el desarrollo de actuales y futuras investigaciones enfocadas a evitar o disminuir el impacto que por parte del hombre sufren las zonas naturales, con el fin de promover la conservación y protección de los recursos.

A este respecto actualmente la reserva de Nahá presenta problemáticas que implican factores de riesgo para los organismos y en particular para los anfibios como son: incendios forestales, pérdida de paisaje, introducción de especies y manejo de desechos orgánicos. En este sentido el ritmo de destrucción de zonas con vegetación alcanza la tasa anual de 2.5 %, lo cual significa una gran amenaza a la flora y fauna del lugar (CONANP, 2006).

El área natural protegida de Nahá no cuenta con reportes previos de Bd, sin embargo, en el caso de Chiapas existen reportes para las especies *Dendropsophus ebraccatus*, *Tlalocohyla loquax*, *Smilisca baudinii*, *Bolitoglossa rufescens* y *Agalychnis moreletti*, las cuales coexisten con las especies *Agalychnis callidryas*, *Tlalocohyla picta*, *Bolitoglossa mexicana* y *Craugastor laticeps*, las cuales no presentan reportes del hongo en México.

Por lo tanto, considerando la problemática actual que viven los anfibios ante el riesgo del Bd, se vuelve una necesidad la realización de estudios enfocados a determinar la presencia y distribución del patógeno con el fin de poseer un marco claro del alcance de la Chytridiomycosis en el país en especies en riesgo. Por tal motivo el presente estudio busca determinar la presencia, así como la carga fúngica diferencial de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios de la reserva de Nahá, Chiapas.

#### 4. Hipótesis

Considerando los reportes previos de la presencia de Bd para Chiapas en las especies *Dendropsophus ebraccatus*, *Tlalocohyla loquax*, *Smilisca baudinii*, *Bolitoglossa rufescens* y *Agalychnis moreletii* y gracias a un estudio prospectivo que nos permitió dar cuenta de la coexistencia de las especies mencionadas con las especies *Agalychnis callidryas*, *Agalychnis moreletii*, *Tlalocohyla picta*, *Bolitoglossa mexicana* y *Bolitoglossa rufescens*, las cuales no cuentan con reportes de Bd en la reserva de Nahá y considerando los reportes previos donde se determinó la temperatura óptima de crecimiento del hongo (23°C) y siendo las temperaturas promedio de la zona (20-25°C) se esperará una presencia diferencial de Bd en las especies detectadas en la reserva, así como una modificación de la condición corporal de los organismo afectados en función de sus hábitos.

Por lo cual el presente estudio surge como punto de partida para determinar la presencia del hongo en el área natural protegida de Nahá con el fin de contribuir al conocimiento de la distribución del Bd en México.

## 5. Objetivo general

Determinar la carga fúngica diferencial del quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios de la reserva de Nahá, Chiapas.

### 5.1 Objetivos Particulares

Comparar la presencia o ausencia del quitridio en cinco pozas en las especies: *Agalychnis moreletii*, *Agalychnis calidryas*, *Tlalocohyla picta*, *Hyalinobatrachium fleishmanni*, *Rhinophrynus dorsalis*, *Bolitoglossa mexicana* y *Bolitoglossa rufescens* en la reserva de Nahá.

Analizar la relación existente entre la condición corporal de las especies en estudio con respecto al grado de infección.

Determinar la relación de las condiciones ambientales de los cuerpos de agua (temperatura, oxígeno disuelto, materia orgánica y pH) con la presencia o ausencia del quitridio.

## **6. Materiales y Método.**

### **6.1 Fase de campo**

#### ***6.1.1 Área de estudios***

La reserva de Nahá se encuentra ubicada al sureste de México y Noreste de la Lacandona (Chiapas), ocupa una extensión de 3847 a 4159.5 ha, entre los paralelos  $16^{\circ} 56'41''$  y  $17^{\circ} 00'42''$  LN y a  $91^{\circ} 32'52''$  y  $91^{\circ} 37'43''$  LW, con un gradiente altitudinal que oscila de 840-1280 msnm. Colinda con los ejidos El Lacandón al norte, Villa Las Rosas al sur, El Jardín al este y al Oeste con Ignacio Zaragoza, pertenecientes al municipio de Ocosingo (CONANP, 2006) (Figura 1).

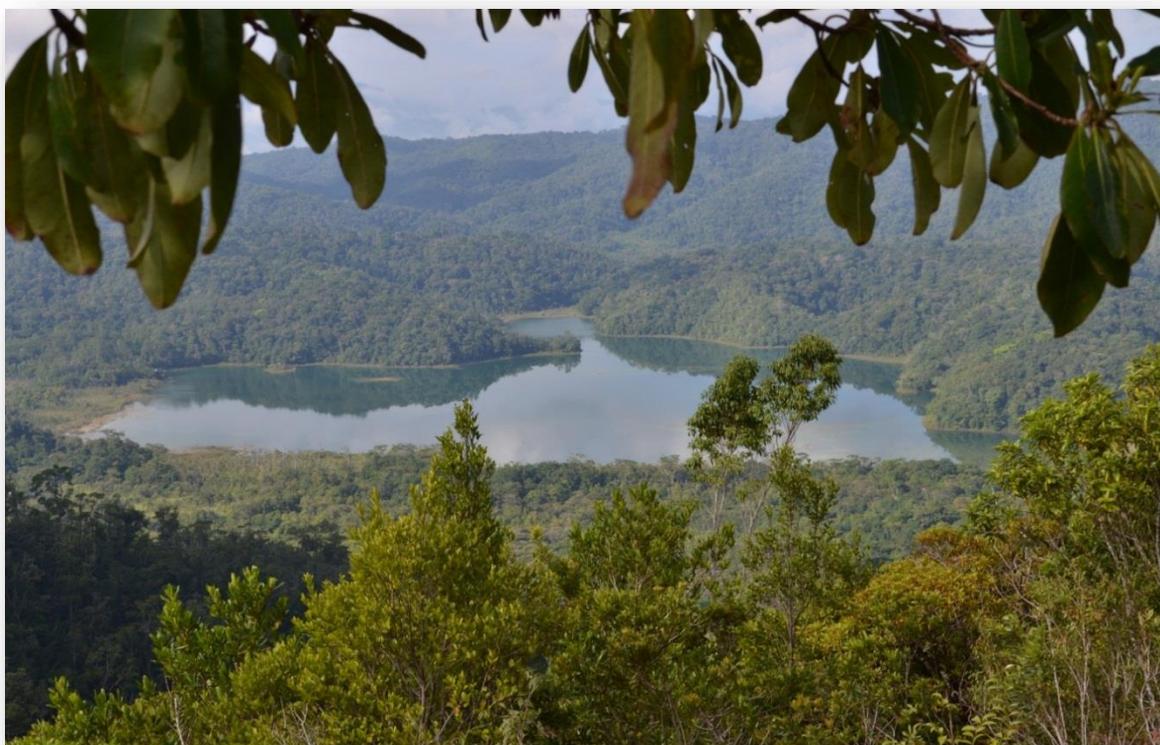


Figura 1. Vista panorámica de la reserva Nahá/ laguna Nahá.

6.1.2 Geología: Se remonta a la era Mesozoica hace 60-70 millones de años, durante el cretácico medio y superior, el basamento donde se encuentra la selva es resultado de movimiento tectónicos, tras estar cubierto de agua. La composición se caracteriza por calizas, en algunos casos calizas dolomíticas y arcillosas (CONANP, 2006).

El poblado de Nahá *per se* presenta lutitas-areniscas continentales del Eoceno por procesos de cementación mecánica (CONANP, 2006).

6.1.3 Fisiografía: La provincia Valle Nacional-Meseta Central de Chiapas, presenta sierras calcáreas plegadas, alargadas y orientadas de Noroeste a Sureste. Al interior se reconocen dos regiones fisiográficas: plegamientos de Simojovel y plegamientos de Bonampak, en los cuales se incluyen los límites del Río Usumacinta y el Sistema Endorreico Lacandón (CONANP, 2006).

6.1.4 Edafología: El área está conformada por una gran variedad de suelos derivados de los diferentes factores físico-ambientales. Con base en la clasificación de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), se presenta el listado de los diferentes tipos de suelo (CONANP, 2006).

- Redzinas (Ek l'um): Amplia distribución sobre las mesetas de origen cárstico, color negro, ligeramente ácidas, poco profundas, alto contenido de arcilla y alta concentración de humus.
- Regosoles (Sac L'um): Presente en los lagos de Nahá y Ocotulito, presentan color claro, textura arenosa, ligeramente ácida y fertilidad moderada.
- Vertisoles (L'um Icat): Se encuentran en las laderas moderadas, color negro, pH neutro, profundidad moderada.
- Litosoles calcáricos (Ha Matzaná): Ubicados en las laderas abruptas, suelos de color negro, con un pH básico y poca profundidad.
- Cambisoles (Chac L'um): Observables sobre algunas laderas y mesetas, son rojizos y amarillos, con un pH ligeramente ácido.

6.1.5 Hidrología: Nahá está situada en la subcuenca del Río Lacanjá; en la porción alta de la cuenca del Río Lacantún. Está integrado por nueve cuerpos de agua permanentes, siendo los lagos Nahá y el Ocotálito los que poseen las mayores dimensiones: 52.26 y 7.41 ha respectivamente (CONANP, 2006).

Los cuerpos de agua ocupan 127 ha, que corresponden al 3.31 % de la superficie del Área. El sistema de lagos de Nahá se encuentra comunicado con el sistema acuífero de Metzabok a través del Río Nahá, lo cual incrementa la importancia hidrológica de ambas Áreas en la recarga de acuíferos, por lo cual Nahá fue integrado a la lista de sitios Ramsar en el 2003 (CONANP, 2006).

6.1.6 Climatología: El clima predominante en la zona es cálido subhúmedo con lluvias en verano (Aw2 (w) (i') g), con una precipitación total anual de 1862 mm, se presenta un periodo húmedo entre mayo y diciembre que representa el 92 % (1616 mm) de precipitación anual, el 8 % (146 mm) restante se presenta entre enero y febrero. La época de secas (Canícula) se presenta en los meses de marzo-Abril (CONANP, 2006).

La temperatura media mensual es de 23.6 °C, siendo enero el mes más frío (20.9° C) y los más cálidos mayo-junio (25.6° C) y una oscilación térmica de 5.6 °C (CONANP, 2006).

6.1.7 Vegetación: El Área se encuentra en la Región Neotropical, lo cual le confiere gran diversidad, riqueza y fragilidad ecológica. El listado de Flora incluye 779 especies de plantas vasculares que pertenecen a 452 géneros de 116 familias siendo el 51 % de las especies pertenecientes a las familias: Rubiaceae, Fabaceae, Orchidaceae, Bromeliaceae, Melastomataceae, Euphorbiaceae, Lauraceae, Araceae, Moraceae, Meliaceae y Arecaceae. Los géneros con mayor riqueza son: *Psychotria*, *Tillandsia*, *Maillaria*, *Chamaedorea* y *Miconia* (IHN, 2000).

La vegetación del área está compuesta principalmente por bosque tropical perennifolio, bosque mesófilo de montaña, bosque pino-encino y vegetación secundaria (acahuales), que en 1988 fueron afectados por incendios forestales (CONANP, 2006) (Tabla 1).

Bosque tropical perennifolio: Una comunidad biológica compleja tri-estratificada: a) el estrato superior, hasta 60 m de altura, con árboles rectos no ramificados y con contrafuertes en la base (Miranda, 1998), b) el estrato medio que forma un dosel continuo entre los 25 y 40 m c) el estrato bajo, lo conforman pequeños árboles de 10 y 20 m de altura, siendo los arbustos y herbáceas prácticamente ausentes. Las epífitas son abundantes y se presentan en el estrato superior (Breedlove, 1981). Los árboles permanecen siempre verdes sin embargo no todos sus componentes son estrictamente perennifolios (Rzedowski, 1978).

Ocupa la mayor parte del APFF Nahá, localizada en las proximidades del pueblo, en dirección Este-Noreste, en altitudes de 780 a 1,300 msnm. Las especies arbóreas presentes en este ecosistema son: karop'che (*Billia colombiana*), guaité (*Dipholis stevensonii*), atzoyoc'che (*Aspidosperma megalocarpon*), bamax (*Pseudolmedia oxiphyllaria*), ya' (*Manilkara achras*). Son frecuentes especies de helechos: *Didymochlaena truncatula*, *popo shibi* (*Ardisia paschalis*), *metché ca* (*Carludovica labela*), *kiplum* (*Helosis cayanensis* var. *mexicana*), *kini baru* (*Rhacoma eucymosa*), *Iron* (*Monstera* sp) (CONANP, 2006).

Bosque Mesófilo de Montaña: Presente en el norte y noreste en elevaciones de hasta 1,300 msnm. La presencia de vientos húmedos del norte juega un papel muy importante en la presencia de especies propias, que se estima ocupa 127 ha de la superficie total del ANP (CONANP 2006).

En estas asociaciones los árboles dominantes no sobrepasan los 30 m de altura. Las especies más frecuentes son *Oecopetalum mexicanum*, *Podocarpus matudai*, *Calatola laevigata*, *Billia colombiana*, *Quercus corrugata* y *Q. skinneri* (CONANP, 2006).

A pesar de la existencia organismos epifitos como orquídeas, bromelias y helechos, carecen de helechos arborescentes y desaparece la exuberancia de los bosques mesófilos de otras latitudes del Estado de Chiapas (CONANP, 2006).

Bosque de Coníferas: Los pinares representados por el pinar de taj'té (*Pinus tenuifolia*) se observan en los alrededores de los lagos Nahá y El Ocotálito llaman a 800 msnm, incluso por debajo del límite superior del bosque tropical perennifolio con una extensión de 202 ha de la superficie total del ANP (CONANP 2006).

Vegetación secundaria (Acahuales): Al este y noreste, existen comunidades sucesionales de composición diversa. Los acahuales maduros se caracterizan por la presencia de árboles de 15 y hasta 20 m de altura, entre los que predominan las especies: tao (*Belotia mexicana*), jarom (*Heliocarpus appendiculatus* y *Heliocarpus donnell-smithii*), tzu'toc (*Hampea stipitata*), así como co'och (*Cecropia peltata* y *Cecropia obtusifolia*).

Tabla 1. Superficie ocupada por tipo de vegetación hasta 2005 (CONANP 2006).

TIPOS DE VEGETACIÓN	2005 SPOT SUPERFICIE (HA)
Agricultura	16 - 221 - 81.54
Asentamientos Humanos	19 - 44 - 00.55
Bosque de pino	115 - 43 - 83.81
Bosque de pino con vegetación secundaria arbustiva	7 - 08 - 86.7964
Bosque mesófilo de montaña	140 - 52 - 40.46
Cuerpo de agua	105 - 58 - 43.55
Pastizales	5 - 08 - 48.7397
Popal-tular	29 - 46 - 24.527
Selva alta y mediana perennifolia	2,526 - 89 - 09.50
Selva alta y mediana perennifolia con vegetación secundaria arbustiva	346 - 40 - 60.62
Selva alta y mediana perennifolia con vegetación secundaria herbácea	125 - 59 - 69.60
Selva baja perennifolia	222 - 77 - 82.21
Sin vegetación aparente	25 - 27 - 74.63
Sombras	1 - 41 - 26.43

6.1.8 Fauna: Concerniente a la Fauna de la zona se ha registrado la presencia de 326 especies: 7 pertenecientes a la ictiofauna, 48 a la herpetofauna (22 anfibios y 22 de reptiles), 226 de avifauna y 45 de mastofauna (CONANP, 2006).

Para 2006, 70 especies de fauna se encontraban bajo alguna categoría de riesgo de acuerdo con la NOM-059-SEMANART-2001 Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.

De las especies con estatus de riesgo 13 están en Peligro de Extinción, 13 Amenazadas y 44 bajo Protección Especial, lo que representa el 21% de las especies (CONANP, 2006).

La ictiofauna se compone de ocho especies de peces dentro de cinco Familias: Characidae, Cichlidae, Cyprinidae, Pimelodidae y Poecilidae (CONANP, 2006).

Las aves representan el grupo faunístico de mayor riqueza y abundancia en el Área, registradas hasta el 2006, 47 Familias, compuestas por 220 especies, nueve Amenazadas, 32 bajo Protección Especial y tres en Peligro de Extinción (CONANP, 2006).

La mastofauna se compone de 19 familias, distribuidas en 44 especies, 13 se encuentran bajo alguna categoría de riesgo; 10 en Peligro de Extinción, dos bajo Protección Especial y una Amenazada (CONANP, 2006).

La herpetofauna se compone de ocho familias de anfibios y 16 de reptiles. De las 22 especies de anfibios, cinco tienen Protección Especial, en el caso de los reptiles se han identificado 31 especies, de las cuales, cinco poseen Protección Especial y dos se encuentran Amenazadas (CONANP, 2006). En la visita realizada durante el presente proyecto se identificaron 2 especies más de anfibios y 16 de reptiles sin reportes previos para la zona, para un total de 24 anfibios y 47 reptiles para la reserva de Nahá. De igual

forma cabe destacar el uso tradicional que se hace de la herpetofauna en la reserva Nahá (Tabla 2).

Tabla 2. Usos tradicionales de la herpetofauna.

<i>Uso tradicional</i>	<b>Especies</b>
<i>Alimento</i>	Guaqueques ( <i>Dasyprocta punctata</i> , <i>D. mexicana</i> y <i>Smilisca baudini</i> ) pava cojolita ( <i>Penelope purpuransces</i> , <i>Rana</i> spp, <i>Rhinophrynus dorsalis</i> , <i>Ameiva undulada</i> y <i>Trachemys scripta</i> ).
<i>Control de plagas y alimento</i>	<i>Bufo</i> spp, <i>Corytophanes</i> spp y <i>Boa constrictor</i> .
<i>Obtención de piel, plumas y ornamentos</i>	Cocodrilo de pantano ( <i>Crocodylus moreletti</i> ).

Es importante remarcar que en México la familia de anuros con mayor diversidad es Hylidae con 97 especies, la cual posee un alto grado de endemismo con 66 especies que representan el 68% del total de especies de anfibios endémicos (252) en México, por lo cual se considera un grupo clave en la investigación actual (Parra-Olea *et al.*, 2014).

### 6.2 Familia Hylidae

Grupo altamente heterogéneo, con amplia distribución en la región Norte centro y sur de América, Eurasia y Norte de África. Posee cerca de 900 especies de ranas arborícolas distribuidas en tres subfamilias: Hylinae (637 spp), Pelodyadinae (186 ssp) y Phyllomedusinae (59 ssp). La mayoría son de hábitos nocturnos y arborícolas y en menor medida terrestres y fosoriales (Duellman 1970, 2001).

Dentro de las características de la familia se encuentran: discos adhesivos en la punta de los dedos y pupila vertical elíptica (Phyllomedusinae) u horizontal elíptica (Hylinae) (Duellman 1970, 2001).

#### 6.2.1 Subfamilia- Phyllomedusinae

Dentro de la familia Hylidae se encuentra la subfamilia Phyllomedusinae, endémica de la zona neo tropical, posee cinco géneros con 59 spp. Se encuentra distribuida en el sur de México, Centro y Sur de América. Las especies de la región central se encuentra agrupadas en tres géneros: Agalychnis (5 spp) con dos especies distribuidas dentro de la reserva de Nahá, Cruziohyla (1 spp) y Phyllomedusa (1 spp), presentes principalmente en bosque lluvioso (Rainforest) (Duellman 1970, 2001; Savage & Myers, 2002).

De manera habitual durante el día se encuentran en la copa de los árboles y bajan durante la noche principalmente debido a la presencia de humedad en las zonas bajas (Kubicki 2004).

La época de reproducción se da en la temporada de lluvias, las hembras depositan los huevos en hojas, ramas, raíces o troncos sobre el agua, con lo cual al eclosionar los renacuajos caen en el cuerpo de agua (Figura 2 a-c). Los renacuajos de Phyllomedusinae se observan comúnmente con la cabeza orientada hacia la superficie del agua, moviendo solo la punta de la cola con rápidos movimientos (Savage & Myers, 2002; Kubicki, 2004).



Figura 2. Puesta de *A. moreletii* en diferentes sustratos: a) Helecho, b) Tronco, c) Epifitas.

### 6.2.2 Genero *Agalychnis*

Consiste en un grupo formado por 14 especies, distribuidas en el sur de Sonora, México, Sur de América central, norte y sur, en ambas laderas andinas, así como en los bosques costeros del Atlántico en Bahía y Pernambuco, Brasil (Faivovich *et al.*, 2010).

Durante el día y generalmente en la temporada seca buscan refugio en el dosel. El canto de los machos presente durante todo el año y en mayor medida en temporada de lluvias se caracteriza por un "wo-or-op".

Presentan amplexo axilar, tras el cual la hembra deposita los huevos en hojas, ramas o madera presente en cuerpos lenticos (Pyburn 1963,1964, Jungfer & Weygoldt 1994).

Posterior a la eclosión la cual sucede de cinco a seis días después de la puesta, los renacuajos caen al agua por efecto de la lluvia (Kubicki, 2004). Los renacuajos se observan comúnmente orientados 45° hacia la superficie, moviendo solo la punta de la cola con rápidos movimientos (Savage & Myers, 2002; Kubicki, 2004).

### 6.2.3 *Agalychnis callidryas* (Cope-1862)

Localidad tipo: Panamá. Distribuida a lo largo del Atlántico, desde el sur de Veracruz hasta el norte de Oaxaca, Sudeste y centro de Panamá, sur de Costa Rica y Colombia. Presente a nivel del mar hasta los 1325 msnm (Köhler, 2011).

Párpado poco reticulado, flancos de color azul, púrpura o café con líneas verticales blancas, iris rojo en vida. SLV de 39-59 mm en machos adultos y 52-71 mm en hembras (Figura 3).



Figura 3. Ejemplar de *Agalychnis callidryas*.

### 6.2.3 *Agalychnis moreletii* (Duméril-1853)

Localidad tipo: “Vera Paz” Guatemala. Amplia distribución: nor-este de Puebla, centro-sur de Veracruz, nor-oeste de Honduras, sur-centro de Guerrero y dentro del El Salvador. Presentes desde los 200 msnm hasta 2130 msnm (Köhler, 2011).

Los flancos anterior y posterior de color rosa naranja en vida, iris marrón a negro, Longitud Hocico Cloaca (LHC) 51-66 mm en machos adultos y 71-83 mm en hembras adultas (Köhler, 2011) (Figura 4).



Figura 4. Ejemplar de *A. moreletii*.

### 6.2.4 *Tlalocohyla picta* (Günther-1901)

Localidad tipo: Jalapa (Veracruz). Presente desde el sur de San Luis Potosí, Norte de Guatemala. Belice y Honduras. A elevación desde el nivel del mar a 1300 msnm (Köhler, 2011).

Distintiva línea lateral (Amarilla o blanca) lateral o dorsal, a nivel de la axila e ingle. Superficie dorsal uniformemente amarilla, LHC en machos adultos 19-21 mm y 19-22 mm en hembras (Figura 5).



Figura 5. Ejemplar de *Tlalocohyla picta*.

#### 6.2.5 *Hyalinobatrachium fleishmanni* (Boettger-1893)

Localidad Tipo: Costa Rica. Presente en los estados de Guerrero, Veracruz y Colombia. A elevaciones desde el nivel del mar hasta 1750 msnm. LHC 28 mm en machos y 32 mm en Hembras. Tímpano distintivo, pericardio decolorado, nostrilo protuberante (Figura 6) (Köhler, 2011).



Figura 6. Ejemplar de *Hyalinobatrachium fleishmanni*. Foto: Daniel Joaquín Sánchez Ochoa.

#### 6.2.6 *Craugastor laticeps* (Duméri-1853)

Localidad tipo: Yucatán (México). Presente desde el sureste de Veracruz, Tabasco y Chiapas, así como la región sureste de Belice, Guatemala y Norte de Honduras. A elevaciones desde el nivel del mar hasta 1600 msnm. LHC 34.8 mm en Machos y 67.7 mm en Hembras (Figura 7) (Köhler, 2011).



Figura 7. Ejemplar de *Craugastor laticeps*. Foto: Daniel Joaquín Sánchez Ochoa.

#### 6.2.7 *Rhinophrynus dorsalis* (Duméril & Bibron-1841)

Localidad tipo: Veracruz. Distribuido a lo largo del sur de Texas, noreste de Nicaragua, así como río Balsas (México) y Costa Rica. Presente desde el nivel del mar a 700 msnm. Única especie dentro del género (Köhler, 2011).

Presenta una cabeza en forma de cono y cuatro pequeñas pero robustas patas, ojos pequeños y tímpano no visible (Trueb & Gans, 1983). Organismos fosoriales, permanecen inactivos (madrigueras subterráneas) hasta por un año y emergen durante la época de lluvias para la reproducción en pozas temporales creadas por la lluvia (James, 1966) (Figura 8).



Figura 8. Ejemplar de *Rhinophrynus dorsalis*.

6.2.8 *Bolitoglossa mexicana* (Duméril, Bibron & Duméril-1854)

Localidad tipo: Oaxaca y Veracruz. Distribuida a lo largo de la región de Chiapas, sur y centro de Belice, norte de Guatemala, noreste de Honduras y poblaciones aisladas en la península de Yucatán, de 0 msnm a 1900 msnm (Köhler, 2011).

Coloración dorsal negra con franjas medio dorsales de color rojo-naranja en vida, SVL máximo: 64.1 mm en machos y 71.6 mm en hembras, razón longitud de la cola/LHC: 0.96-1.10 machos y 0.81-1.09 hembras (Figura 9).



Figura 9. Ejemplar de *Bolitoglossa mexicana* Foto: Daniel Joaquín Sánchez Ochoa.

### 6.2.9 *Bolitoglossa rufescens* (Cope-1869)

Localidad tipo: Orizaba (Veracruz). Distribuida en el borde atlántico de San Luis Potosí y Veracruz, Guatemala, Belice y noroeste de Honduras a elevaciones de hasta 1500 msnm (Köhler, 2011).

Patatas altamente palmeadas, SVL máximo en machos 40.5 mm y 45.0 hembras, radio (longitud de la cola/SVL): 0.78-0.95 (Machos) y 0.74-0.85 (Hembras) (Figura 10).



Figura 10. Ejemplar de *Bolitoglossa rufescens*. Foto: Daniel Joaquín Sánchez Ochoa.

### 6.3 Phylum Chytridiomycota

Son los únicos miembros del reino Fungi que poseen estadios móviles (esporas flageladas) durante su desarrollo. Exhiben características que otros miembros del reino presentan en menor medida: a) un talo con estructura ceconicita, ovoide o globosa, estructuras hifales simples o un micelio desarrollado b) la conversión del cigoto dentro de esporas, esporangios o talos diploides. Las paredes de los integrantes poseen: quitina, glucano y celulosa, así como una división nuclear intranuclear y céntrica (Alexopoulos *et al.*, 1996).

El grupo posee alrededor de 100 especies, distribuidas dentro de 100 géneros, la mayor parte de los integrantes del phylum son saprobios, dentro de su alimentación se encuentran: plantas vasculares, fitoplancton, nemátodos, tardígrados, rotíferos, incluso otros quitridos e integrantes del reino: Ascomycetos y Basidiomicetos.

La importancia del grupo radica en formar parte de los invasores primarios y descomponedores de la materia orgánica (quitina, queratina, celulosa y hemicelulosa) (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Las zoosporas se caracterizan por presentar un segundo quinetosoma no funcional, estructuras fibrilares (rizoplastos) los cuales se extienden y conectan los organelos, asimismo los cuerpos lipídicos se encuentran asociados con otros microcuerpos formado lo que se conoce como: microbody-lipid globule complex (MCL), otro organelo único es la partícula gama (inclusión de proteínas), así como una agregación de ribosomas que rodea al núcleo (Nuclear Cap) (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Poseen medios de reproducción sexual y asexual: el asexual esta mediado por zoosporas flageladas que se desarrollan dentro de un esporangio, por otro lado, la reproducción sexual posee varios mecanismos: 1) Conjugación de planogametos isogamos, 2) Conjugación de planogametos anisogamos, 3) Fertilización por anterozoides y oogonios, 4) Copulación gametangial y 5) Somatogamia (Alexopoulos *et al.*, 1996).

### 6.3.1 Clase: Chytridiomycetos

Son un grupo de hongos comúnmente presentes como parásitos de plantas, algas, protistas e invertebrados y recientemente también presentes en vertebrados. Son cosmopolitas y ubicuos, se distribuyen desde desiertos hasta selvas tropicales, siendo los ambientes acuáticos el sitio de mayor preferencia de los mismos. Su alimentación deriva de la degradación de la quitina, celulosa y/o queratina. Como característica más importante del grupo se encuentran: esporangios sin opérculo (Bosch, 2003; Powell, 1993).

### 6.3.2 *Batrachochytrium dendrobatidis*

El quitridio Bd ubicado en el phylum Chytridiomycota orden Chytridiales, es la única especie capaz de infectar vertebrados en particular anfibios (Berger *et al.*, 1998), se caracteriza por presentar dos fases de infección en el ciclo de vida: la fase móvil o de dispersión llevada a cabo a través de una zoospora flagelada (esférica o ameboidea de 3-5  $\mu\text{m}$  de diámetro cuyo flagelo mide de 19 a 20  $\mu\text{m}$  de largo. Poseen un flagelo con ases triples en un acomodo 9-1, los cuales se extiende de manera paralela al cinetosoma, dentro de una agregación de ribosomas) (Figura 11a) y una fase sésil una vez instalada en el hospedero. Regularmente las células de Bd se ubican en el estrato corneo de la epidermis del huésped en el cual prolifera, al ser la queratina su principal fuente de nutrientes (Longcore *et al.*, 1999; Berger *et al.*, 2005).

El ciclo de vida (Figura 12) inicia con un periodo de motilidad o dispersión (24 hrs.), posterior al periodo mencionado la zoosporas se enquistan en el hospedero (principalmente la piel de los anfibios, partes bucales de renacuajos), una vez que la zoospora se enquista el flagelo se absorbe y finos rizoides surgen de la misma para dar lugar a un esporangio joven (“germling”) (Figura 11b), conforme el talo crece y madura el citoplasma se vuelve más complejo, el interior se divide y se forman nuevas zoosporas flageladas (Figura 11c), el zoosporangio mantendrá las zoosporas dentro de si hasta que se presente suficiente humedad. Finalmente, las zoosporas son liberadas a través de un tubo de descarga que rompe la pared del cuerpo para la liberación de las zoosporas bajo las condiciones óptimas (23°C y suficiente humedad), quedando el esporangio vacío (Figura 11d) iniciando nuevamente el ciclo (Longcore *et al.*, 1999; Berger *et al.*, 2005; Bosch., 2003).

Las habilidades de supervivencia de Bd en ausencia de hospedero depende principalmente de las condiciones del medio: en agua de grifo y desionizada la sobrevivencia es de alrededor de 3 y 4 semanas respectivamente, en agua de lago la infección se observa incluso 7 semanas después de la introducción del hongo (Johnson & Speare, 2003).

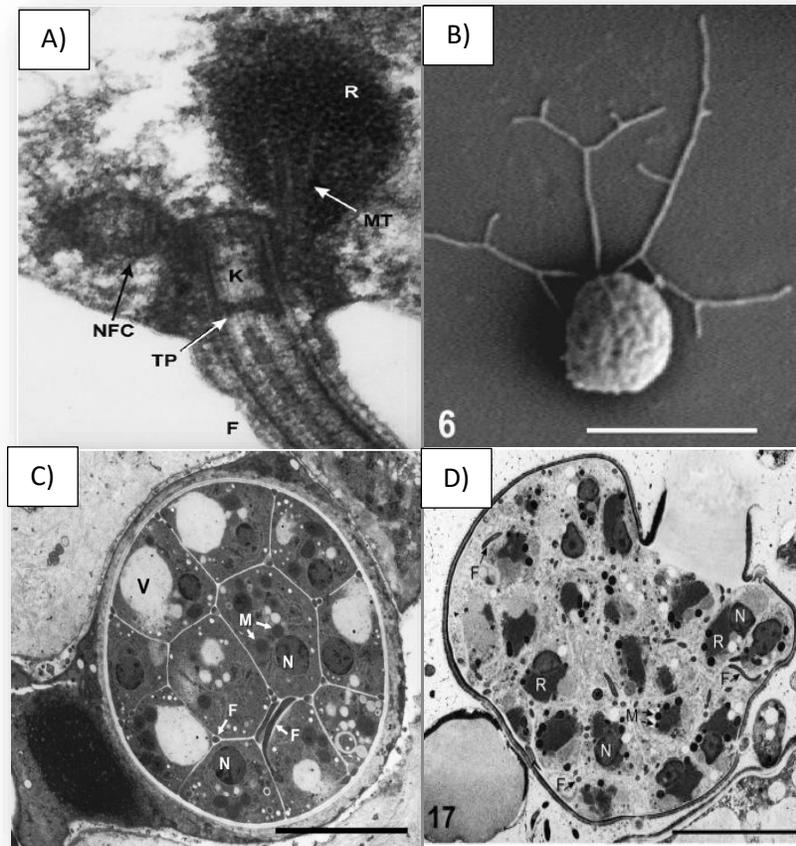


Figura 11. Morfología estructural de los estadios del ciclo de vida: a) zoospora flagelada, b) esporangio con desarrollo de rizoides, c) talo maduro con zoosporas en el interior, d) tubo de descarga (liberación de zoosporas) (Berger *et al.*, 2005)

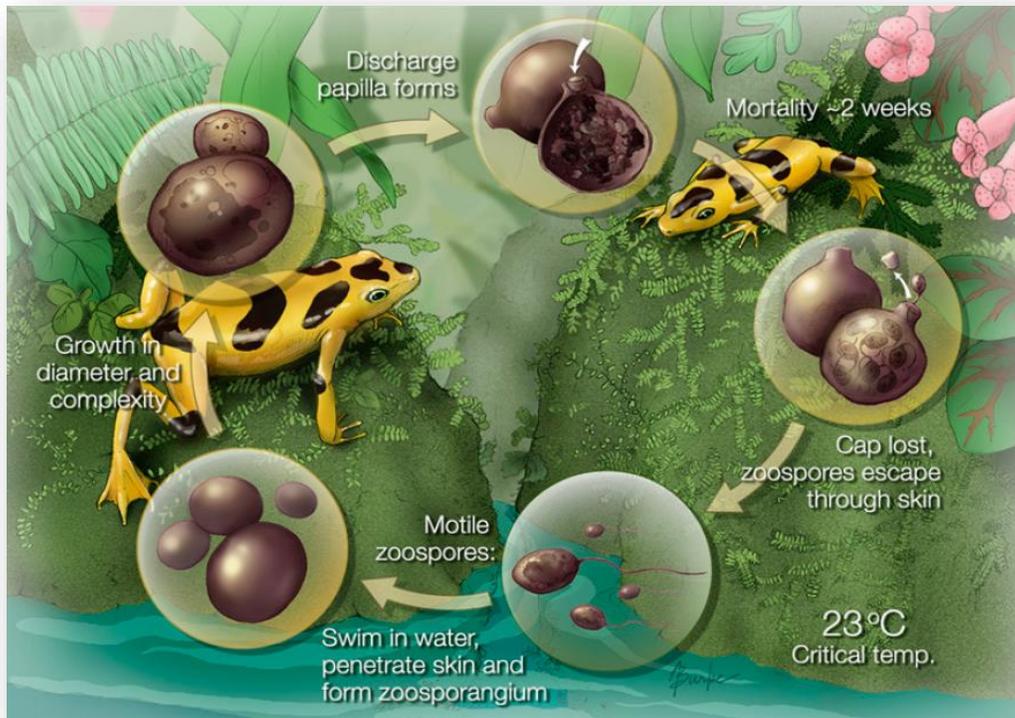


Figura 12. Ciclo de vida de *Batrachichytrium dendrobatidis*. (© Burke E. A) (<http://www.alisonburke.com>).

### 6.3.3 Chytridiomycosis

La infección producida por el Chytridio Bd conocida como Chytridiomycosis, resulta en un aumento de la mortalidad de los anfibios. Infecciones experimentales muestran que existe una relación inversamente proporcional entre el número de zoosporas y la velocidad de mortalidad (días) (Berger *et al.*, 1999).

Los síntomas principales relacionados con la infección son: Hiperqueratinización, hiperplasia epidermal, letargo, ausencia de respuesta al tacto, posturas anormales (patas traseras aducidas y patas anteriores extendidas), síntomas menos comunes incluyen úlceras en la piel, hemorragias (piel, músculos y ojos), decoloración y afectación de piezas bucales en renacuajos (Berger *et al.*, 1999; Pessier *et al.*, 1999; Fellers *et al.*, 2001).

Dentro de las afecciones provocadas por la enfermedad y que están relacionadas con la mortalidad de los organismos son: En primer lugar, desequilibrio osmótico a través de la pérdida de electrolitos originado por las perforaciones de la piel o debido a la hiperqueratinización, impidiendo la respiración. 2) un bloqueo del intercambio de gases resultado de la hiperplasia. Finalmente, la liberación de enzimas proteolíticas u otras sustancias activas (Berger *et al.*, 1998; Pessier *et al.*, 1999; Voyles *et al.*, 2007).

Asimismo, se ha visto que algunas sustancias secretadas por el hongo (al parecer compuestas de elementos de la pared del mismo) inhiben la proliferación de linfocitos e inducen la apoptosis, esta evasión del sistema inmune del hospedero podría explicar el por qué este patógeno ha devastado poblaciones en todo el mundo (Fites *et al.*, 2013).

#### **6.4 Trabajo de campo y obtención de muestras**

El muestreo se llevó a cabo en la temporada de lluvias (debido a que coincide con el pico de actividad de las especies de anfibios), aplicando el método de revelo por encuentro visual (REV) (Rueda-Almonacid *et al.*, 2006) durante la noche.

Se tomaron un total de 91 muestras (10 de adultos de *A. moreletii*, en tres de cinco sitios, así como 10 muestras aleatorias de diferentes especies por sitio y un total de 10 renacuajos de *A. moreletii*) utilizando guantes de polietileno y bolsas de plástico de 2 kg, para evitar contaminación cruzada entre las diferentes especies.

Fueron consideradas seis pozas: Hach-haru (16°58'10.3"N-91°35'11.9"W, 922msnm), Hoch-há (16°57'48.2"N-91°35'20"W, 890msnm), Patch-há (16°59'41"N-91°35'43.4"W, 842msnm), Me-hon-té (16°58'25.1"N-91°33'31.3"W, 1022msnm), Centro (16°58'48.05"N-91°35'6.72"W, 840msnm) y Sanja (16°58'27.7"N-91°34'53.1"W, 900 msnm) (Figura 13 a-e) (Figura 14).

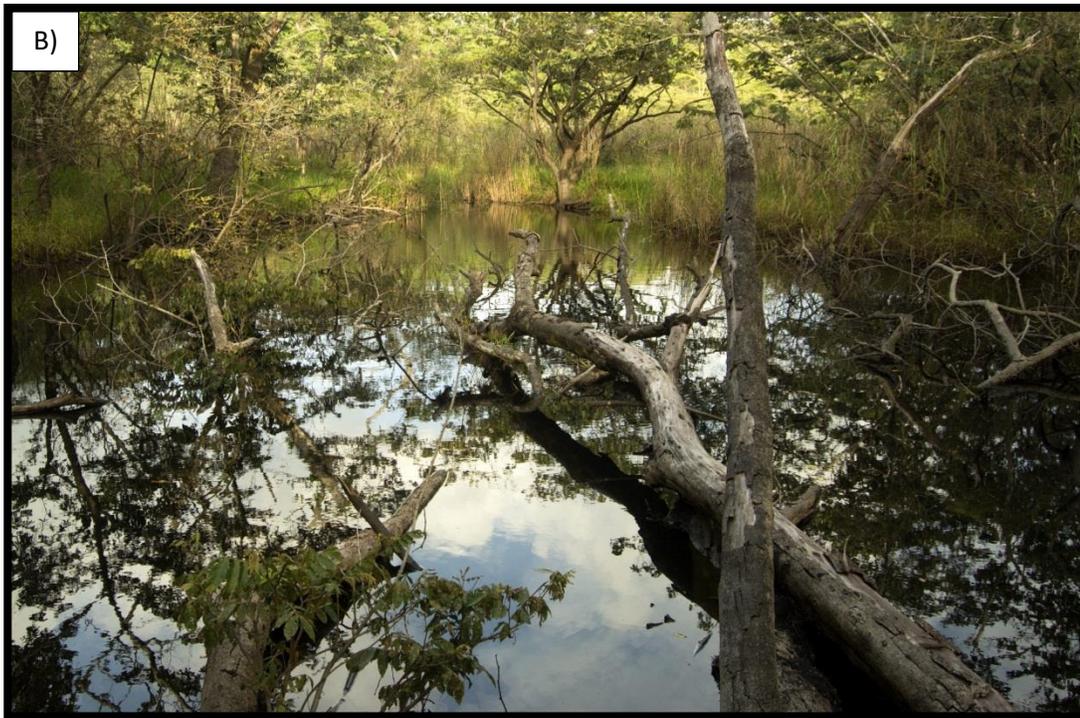
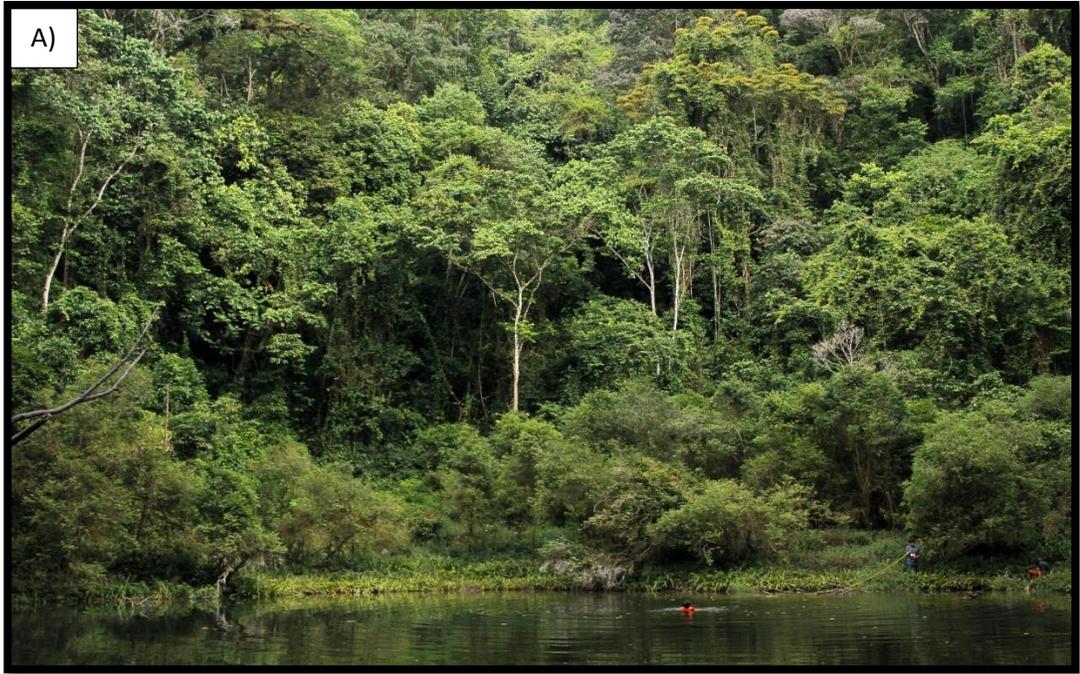






Figura 13. Sitios de muestreo: a) Hoch-Há, b) Me-hon-té, c) Hach-haru, d) Patch-há (Foto: Daniel Joaquín Sánchez Ochoa y e) Sanja.



Figura 14. Posicionamiento satelital de los sitios de muestreo.

Posterior a la captura se realizaron raspados utilizando hisopos estériles de madera en las zonas: superficie ventral del abdomen, superficie ventral de muslos y patas anteriores, al ser las zonas con mayor exposición a los cuerpos de agua, cinco raspados por duplicado de cada área, siguiendo el protocolo propuesto por Brem et al. (2007) (Figura 15a-b).

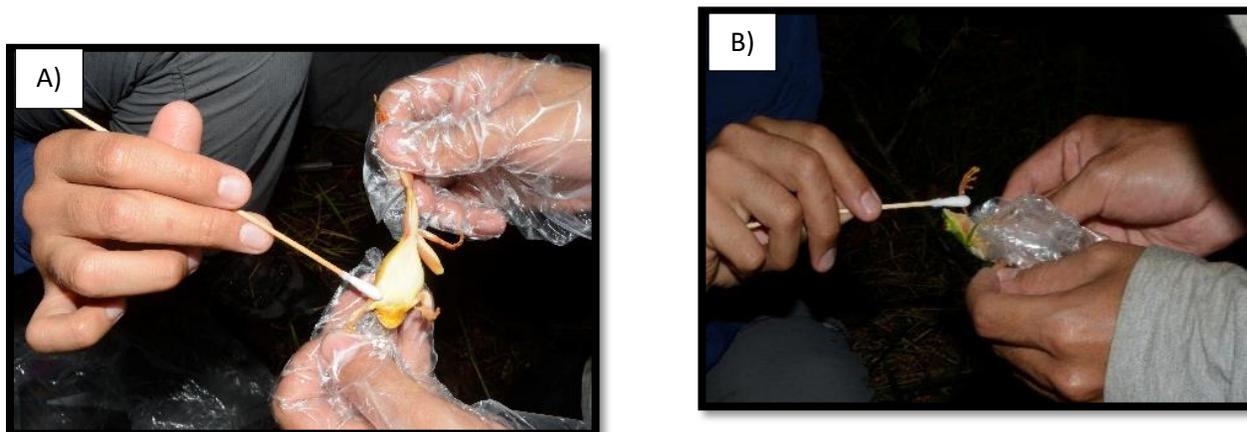


Figura 15. Toma de muestra (Hisopados). Foto: Daniel Joaquín Sánchez Ochoa.

Una vez tomada la muestra, los hisopos fueron colocados en tubos de 2 ml con Etanol (EtOH 96%-2 ml) para evitar la pérdida de DNA, las muestras fueron etiquetadas con fecha, localidad, nombre de la especie y número de organismo hasta la realización del análisis molecular (Brem *et al.*, 2007).

Los organismos sometidos a raspados fueron manipulados para obtener datos de peso, longitud hocico cloaca (LHC) (con el uso de un vernier) (Figura 16) y sexo. De igual forma se tomaron mediciones de los siguientes parámetros: temperatura del agua, oxígeno disuelto, demanda bioquímica de Oxígeno y pH. Con el uso de tiras de pH y Oxímetro.

Es importante resaltar que durante la presente investigación se siguieron los protocolos establecidos de manipulación para evitar la dispersión de Bd que implicaban: el uso de guantes y bolsas de polietileno para la captura y toma de muestras de cada organismo (Mendez *et al.*, 2008).



Figura 16. Medición de LHC (Longitud Hocico Cloaca de *A. moreletii*).

## 6.5 Trabajo de laboratorio

El trabajo de laboratorio se llevó a cabo en el Instituto de Biología de la UNAM con la profesora Gabriela Parra Olea en el laboratorio de Biología molecular (Zoología).

### 6.5.1 Extracción de DNA

Inicialmente se dejó evaporar el EtOH de los tubos que contienen las muestras tomadas a temperatura ambiente en una cabina de extracción durante un lapso de 30 a 48 horas (Vásquez-Ochoa *et al.*, 2012).

A cada muestra se le adicionó 50  $\mu$ l de PrepMan Ultra (Apendice 5), posteriormente la muestra fue homogeneizada usando el aparato TissueLyser 30osc/seg 3 min, se centrifugó 30 s 13200xg en una micro-centrifuga, se repitieron los pasos anteriores. Se configuró la incubadora a 100°C, la muestra se colocó 10 minutos y enfrió por 2 minutos a temperatura ambiente, finalmente se centrifugó 3 min más a 13200xg, 20  $\mu$ l de sobrenadante fueron recuperados y almacenados a -20 °C hasta su uso (Hyatt *et al.*, 2007).

### 6.5.2 Dilución

Se crearon alícuotas de 1ml de agua inyectable en tubos eppendorf de 2ml. Posteriormente 16 $\mu$ l fueron colocados en otro tubo de 0.6 ml y se etiquetó con “di” de dilución. Los tubos de extracción fueron colocados en un Vortex por 5 seg. Finalmente se colocaron 4  $\mu$ l de extracción en el tubo de dilución y se agitaron en un Vortex por 5 seg. Obteniendo un factor de dilución de 5x y se almacenaron a -20 hasta la realización del ensayo.

### 6.5.3 Preparación de primers y sonda

Se preparó una solución de primer 100 $\mu$ M, para lo cual se adicionaron 100 $\mu$ l de agua inyectable a los primers (5.8S e ITS-1) (Apendice 5) cuya concentración liofilizada era: 10000 pM. Se colocaron en el vortex por 5 segundos. y almacenar a -20°C. En el momento de realización del ensayo PCR se preparó un tubo con 82 $\mu$ l de agua inyectable y 18 $\mu$ l de solución de primer del cual se tomó el volumen de acuerdo con la Tabla 2.

En el caso de la sonda (Taq Man MGB probe) (Apendice 5) cuya concentración inicial era 100 $\mu$ M, se busca una concentración de 5 $\mu$ M. Para lo cual se tomaron 95 $\mu$ l de agua inyectable o para PCR y 5 $\mu$ l de sonda. Es importante no colocar en vortex y mantener esta solución y la sonda en un lugar obscuro o con papel aluminio ya que es termosensible y fotosensible.

### 6.5.4 Estándares de cuantificación

Para la detección se utilizó la tecnología IDT (Integrate DNA Tehnologies) con el sistema gBlocks® (Synthetic Standards For BD). Inicialmente se ordenó el Haplotipo concerniente al Bd (Bd-Hap01 de Longo *et al.*, 2013) en: <http://www.idtdna.com/pages/products/genes/gblocks-gene-fragments>. con un fragmento de 146 bp.

Posteriormente a la recepción de los fragmentos, estos fueron rehidratados (IDT DNA recomienda rehidratar con 1x de TE (20-700  $\mu$ l), para determinar el número de zoosporas en el tubo es posible ingresar a: <http://cels.uri.edu/gsc/cndnanhtml>. Se designó la concentración (200 ng) y largo de templado de 146 bp:

= $1.27 \times 10^{12}$  copias de ITS/700  $\mu$ l

= $1.81 \times 10^9$  copias/ $\mu$ l a partir del cual se creó un estándar de  $10^6$

La construcción de la curva para el qPCR consistió en partir del estándar de  $2 \times 10^6$  copias/ $\mu$ l, a partir del cual se realizaron diluciones seriadas: se tomaron 2  $\mu$ l del estándar anterior y 18  $\mu$ l de agua para obtener el siguiente estándar. Se realizaron 6 diluciones usando el procedimiento anterior ( $2 \times 10^5$  copias/ $\mu$ l,  $2 \times 10^4$  copias/ $\mu$ l,  $2 \times 10^3$  copias/ $\mu$ l,  $2 \times 10^2$  copias/ $\mu$ l,  $2 \times 10^1$  copias/ $\mu$ l,  $2 \times 10$  copias/ $\mu$ l) (Parrot *et al.*, 2016; Rebollar *et al.*, 2017).

#### 6.5.5 Ensayo PCR en tiempo real:

Se realizó la preparación por triplicado una solución de 25 $\mu$ l por muestra, así como para los estándares positivos (Cuantificación) y negativos (Agua) (51 muestras en total-Tabla 3), la cual estuvo compuesta por: 12.5 $\mu$ l Taqman Master Mix (Apendice 5), primers en una concentración de 100 $\mu$ M (1.25 $\mu$ l de ITS y 1.25 $\mu$ l de 5.8 S), la sonda MGB a concentración de 5 $\mu$ M (1.25 $\mu$ l) y 3.75 $\mu$ l de Agua para PCR (Conocido En conjunto como “Master Mix”) (Tabla 3)

<b>Reactivo</b>	<b>Muestra X1 (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Muestra Xn (51)</b>
Agua	3.75	198.75
Taqman	12.5	662.5
ITS	1.25	66.25
5.8 S	1.25	66.25
Sonda	1.25	66.25
Total	20	1060

Tabla 3. Cantidad ( $\mu$ l) por reactivo requerida por número de muestras.

Tabla 4. Organización de muestras estándares y controles negativos (CN) y positivos (CP) en la placa de PCR.

<i>Col</i>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>A</b>	1000	1000	1000	100	100	100	10	10
<b>B</b>	10	1	1	1	0.1	0.1	0.1	<b>CN</b>
<b>C</b>	168	168	168	170	170	170	198	198
<b>D</b>	198	217	217	217	239	239	239	251
<b>E</b>	251	251	262	262	262	<b>100CP</b>	<b>100CP</b>	100CP
<b>F</b>	<b>100CP</b>	<b>100CP</b>	<b>100CP</b>	<b>10CP</b>	<b>10CP</b>	<b>10CP</b>	<b>1CP</b>	1CP

Para la organización de la placa de 48 pozos (8x6) se procederá de la siguiente manera (Tabla 4).

Se utilizó una placa de 48 pozos (FG-FAST OPTICAL 48-WELL RXN 1) (Apéndice 5) a la cual se adicionaron 20 µl de “MM” a cada pozo (usando la misma punta por fila) y agitando la “MM” por cada fila. Se colocaron 5 µl de cada muestra al pozo correspondiente (usar una punta por pozo) de igual forma se agitaron las muestras antes de colocar en el pozo (Tabla 4). Al finalizar el llenado de las placas se colocó el FILM (48-WELL OPTICAL ADHESIVE FILM 1) (Apéndice 5) y se selló adecuadamente (Applied Biosystems, 2010a).

En caso de que los tubos contuvieran burbujas se centrifugaron para lo cual se calibró la placa con otra vacía y se centrifugó 2 min 4000 rpm.

El ensayo y análisis se llevó a cabo en el laboratorio de secuenciación genómica del instituto de biología de UNAM.

Para ello se inició el programa Step One de 48 pozos en la computadora, el cual está conectado al Real Time PCR System 2.2.3, se seleccionó la opción Quantitation-Estándar Curve y se le dio nombre al experimento (Todo en la opción ADVANCE SETUP) (Applied Biosystems, 2010a).

En la opción PLATE SETUP, se indicó el reporter-FAM y el quencher-Ninguno, posteriormente se asignaron las muestras y control positivo y marcar como desconocido (Unknown), estándares con S y controles negativos (N) en el orden en que se presentan en la placa de acuerdo con la Tabla 4 y revisar el orden adecuado en la pantalla.

Las condiciones de amplificación del sistema Real Time PCR System, 2.2.3 fueron: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, seguido de 15 s a 95°C y finalmente 1 min a 60°C durante 50 ciclos finalmente la emisión fue detectada a 520 nm para el valor de R (Boyle *et al.* 2004; Livak *et al.*, 1995). Esto en la opción RUN METHOD colocando la opción 25 µl por pozo.

#### 6.5.6 Análisis de PCR

El software Step one 2.3. Real Time PCR System utilizado determina los cambios en la señal de fluorescencia de las sondas marcadas ( $\Delta Rn$ ) durante la reacción contra los ciclos PCR (Figura 17).

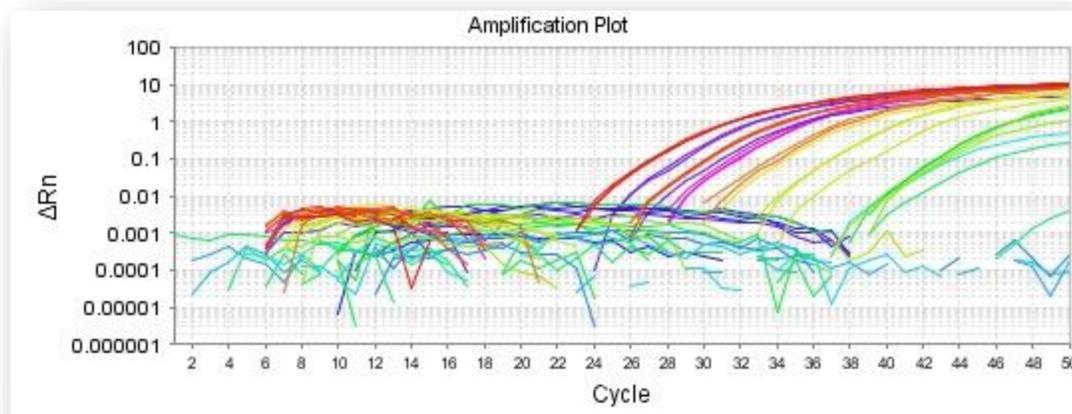


Figura 17. Curva de amplificación PCR tiempo real (Ciclos vs Intensidad de fluorescencia).

La  $\Delta R_n$  fue calculada utilizando a siguiente ecuación:

$$\Delta R_n = (R_{n+}) - (R_{n-})$$

Donde  $R_{n+}$  es la señal de fluorescencia en la fase logarítmica y  $R_{n-}$  es la señal de emisión base al no detectar señales. Los resultados del ensayo fueron expresados como número de zoosporas equivalentes (Boyle *et al.* 2004).

Se verificaron los valores una vez transcurrido el tiempo, se verificó que el control negativo (CN) sea 0, se verificó la curva y el valor de ajuste mediante  $R^2$  (la cual debe ser superior a 0.80 u 80% de confiabilidad del ajuste) y una pendiente de -3-32.

Al valor obtenido de cada muestra multiplicarlo por 20 ya que se tomaron 4  $\mu$ l de muestra (siendo el factor de dilución 5, por lo tanto  $5 \times 4=20$ ). Cuyo resultado será expresado como el número de Zoosporas equivalentes (Número de copias de ITS-1) al interpolar los valores experimentales en una curva estándar.

## **7. Análisis estadísticos**

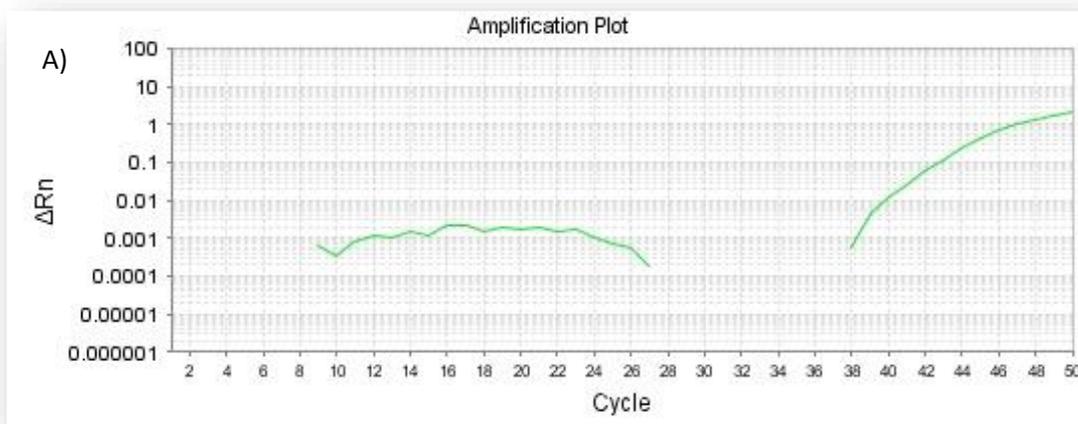
Se utilizaron modelos lineales generalizados múltiples para analizar la relación entre las variables ambientales (Temperatura, Oxígeno disuelto y materia orgánica) y la condición corporal con respecto al número de zoosporas equivalentes. De manera paralela se realizó un análisis ANOVA de un factor para evaluar si existen diferencias entre los diferentes sitios de muestreo con respecto a las variables ambientales y al número de zoosporas equivalentes y en caso de encontrar diferencias se aplicó un análisis LSD para determinar el sitio con mayor grado de infección.

## 8. Resultados

### 8.1 Análisis Descriptivo

Se detectó la presencia del quitridio en las seis localidades de estudio en 10.44% de las 67 muestras analizadas durante el mes de agosto, reportando por tanto una prevalencia de 10.44% para la reserva de Nahá, Chiapas. El patógeno fue detectado en las especies: *Agalychnis moreletti*, *Agalychnis callidryas*, *Tlalocohyla picta* lo cual se observa en la Figura 18 a, en donde se ejemplifica la curva de amplificación de las regiones 5.8 S e ITS 1, concernientes a DNA perteneciente al quitridio, resultado en un cambio en la intensidad de la fluorescencia con respecto al control (Figura 18b) y por tanto evidencia de la presencia de Bd en las especies en estudios. En el caso de *A. moreletti* el quitridio fue detectado tanto en individuos adultos como en renacuajos los cuales en promedio poseen el mayor número de zoosporas (4.10). Las especies *Craugastor laticeps*, *Hyalinobatrachium fleishmani* y *Tlalocohyla picta* no presentaron resultados positivos para Bd.

El promedio de zoosporas de *B. dendrobatidis* en los organismos infectados fue 2.012293403 ( $\pm 2.140979918$ ) zoosporas. Asimismo, el sitio con el mayor número de casos positivos fue Me-Hon-Te con reportes de Bd en tres individuos, situación similar al sitio seis (Tabla 5).



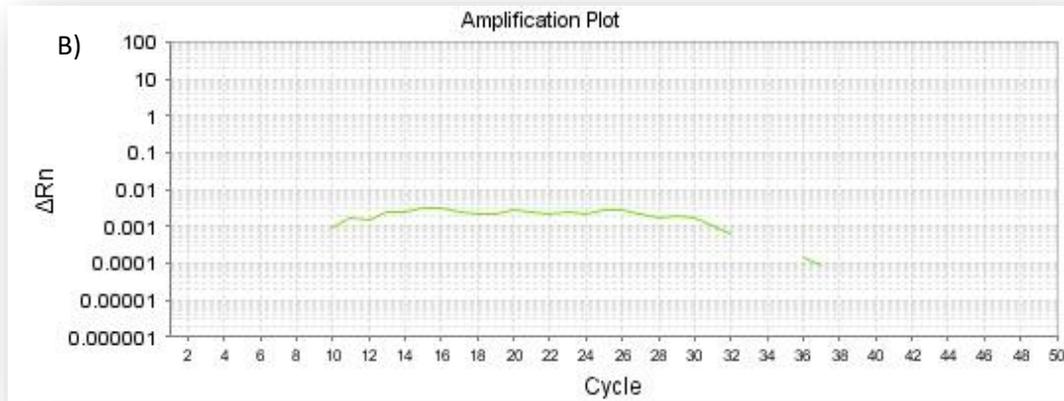


Figura 18. a) Amplificación de DNA de Bd (ciclos 42-50). Eje X (Ciclos de PCR), Eje Y (Intensidad de fluorescencia), b) Amplificación del control negativo.

Asimismo, se observa una carga fúngica diferencial en las especies en estudio. La mayor carga se presenta en individuos de la especie *Agalychnis callidryas* (3.069688765), lo que representa una prevalencia del 40% mientras las especies *Agalychnis moreletii* y *Tlalocohyla picta* presentaron 1.587753182 y 1.146230273 zoosporas respectivamente, con una prevalencia correspondiente a 50 y 40% (Figura 19). Siendo la familia Hylidae la que presentó mayor número de casos positivos.

Tabla 5. Resultados número de zoosporas por sitio y especie.

Sitio de Estudio	Especie	Numero de Muestras (+)	Ciclo de amplificación (Ct)	Numero de Zoosporas
<b>Hach-haru/922 msnm</b>	<i>Agalychnis moreletii</i>	168	43.403	0.48964746
		168	42.374	0.936470165
		198	44.961	0.18257
		198	43.013	0.625323842
<b>Me-hon-té/1022 msnm</b>	<i>Agalychnis moreletii</i>	No Hay Casos de Bd (+)		
	<i>Agalychnis callidryas</i>	2	39.664	5.19181
		2	41.356	1.782003662
		2	40.541	2.982668543
	<i>Tlalocohyla picta</i>	1	48.411	0.020629739
		1	44.989	0.17936766
		2	43.449	0.474716443
		2	41.775	1.367426333
		2	41.384	1.750746702
<b>Patch-há/842 msnm</b>	<i>Agalychnis moreletii</i>	No Hay Casos de Bd (+)		
	<i>Agalychnis callidryas</i>	6	40.937	2.322272853
<b>Centro/840 msnm</b>	<i>Renacuajos</i>	8	40.499	3.062900626
		8	39.91	4.444246703
		8	40.175	3.758915121
<b>Sitio 6 /900 msnm</b>	<i>Agalychnis moreletii</i>	11	38.865	8.602478712
		18	42.412	0.914247811
		18	42.438	0.899347646
		18	46.95	0.051939816
	<i>Tlalocohyla picta</i>	75	43.994	0.336392174
	76	40.119	3.894332862	

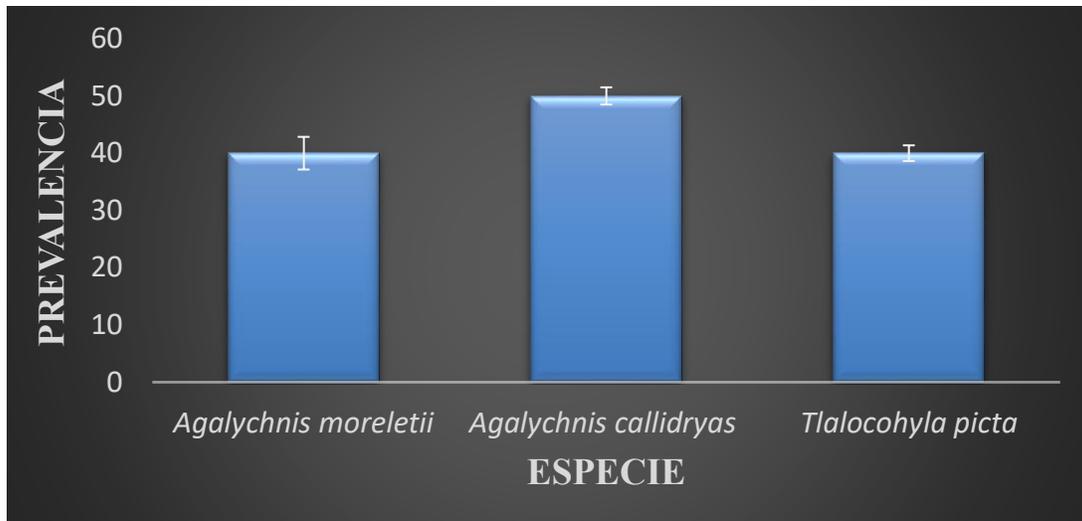


Figura 19. Porcentaje de Prevalencia por especie.

Asimismo, se puede observar que el sitio con mayor prevalencia de infección es el centro con un 40% de prevalencia, de manera paralela el sitio con menor prevalencia fue Hach-Jara (5%) y el sitio con ausencia de Bd fue Hoch-Há (Figura 20).

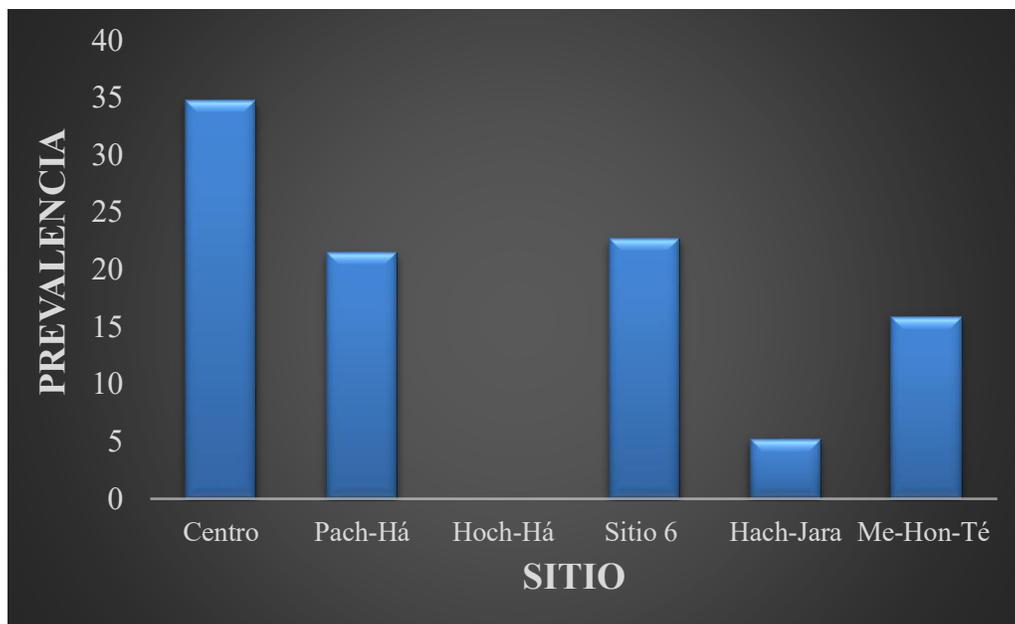
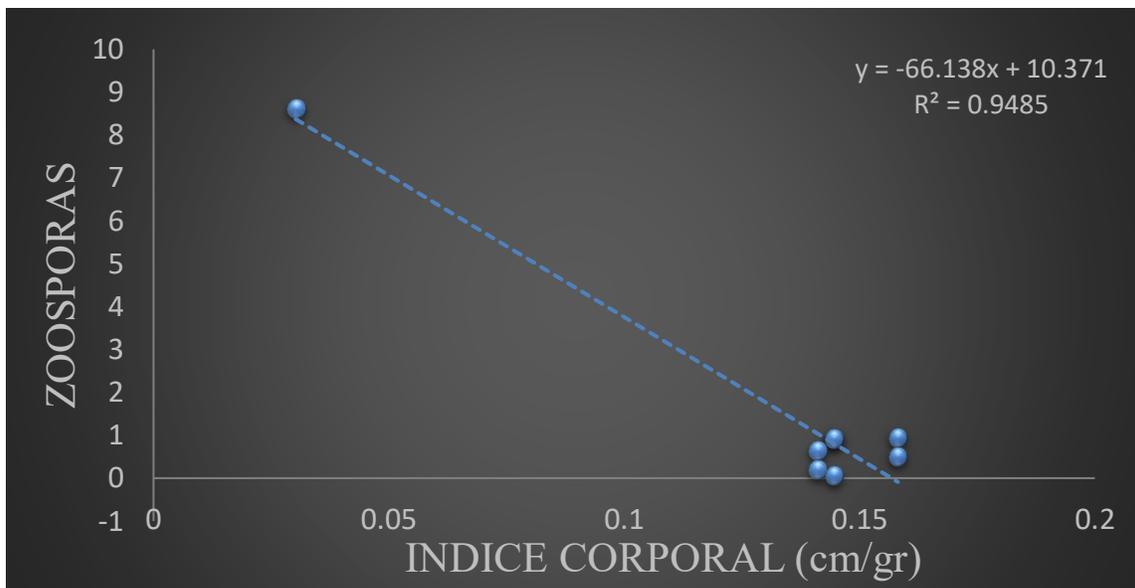


Figura 20. Relación entre la prevalencia Bd y el sitio de estudio

## 8.2 Análisis Estadístico

Se realizó un análisis entre el número de zoosporas y la condición corporal mediante una regresión lineal para cada especie. El resultado mostró una tendencia lineal para la especie *A. moreletii*  $R=0.95$  (Figura 21a), al igual que para *A. callidryas* sin embargo no es significativa  $R=0.78$  (Figura 21b). Dicha tendencia no se observa en *T. picta* (Figura 21c). Por lo tanto, los resultados muestran que al aumentar el índice corporal el “grado de infección” por Bd es menor en términos de número de zoosporas en comparación con índices corporales menores en donde la presencia del quitridio comienza a ser importante (Figura 19 a-b).

*Es importante hacer un paréntesis con respecto a dicho resultado puesto que la tendencia se observa sólo si se conserva el valor extremo que se observa en la esquina superior derecha del gráfico, ya que si es eliminado del análisis no se observa una tendencia, por tal motivo podría ser inexistente.*



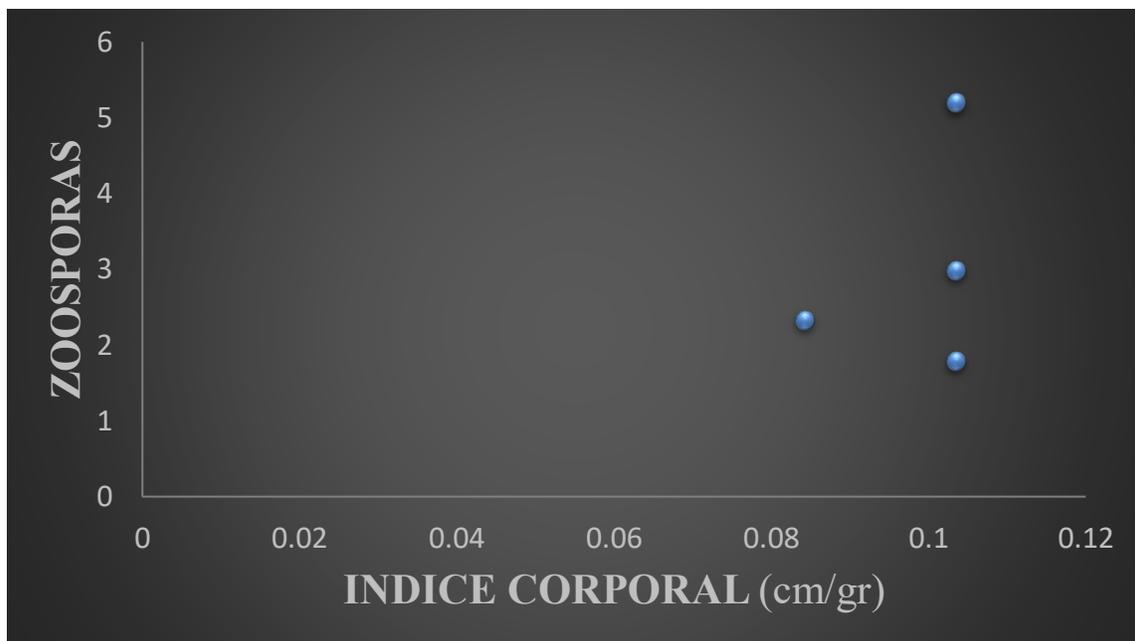
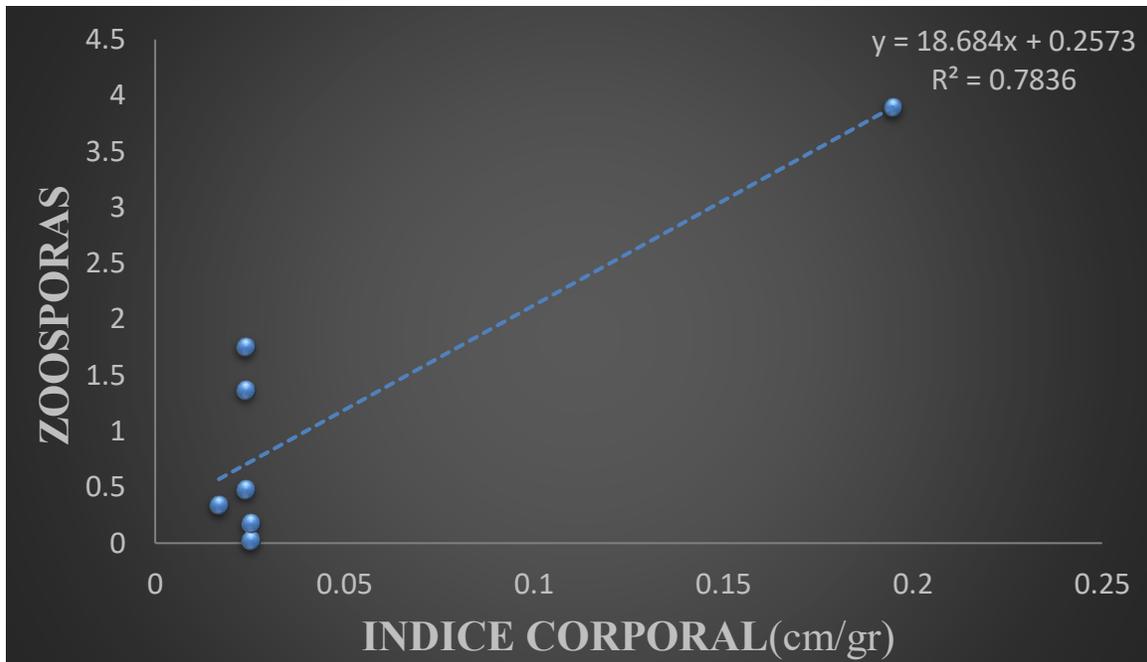


Figura 21. Relación entre el número de Zoosporas y el Índice de masa corporal: a) *A. moreletii*, b) *A. callidryas*, c) *T. picta*.

En el caso de la influencia de los factores fisicoquímicos en la presencia del quitridio no se realizó análisis estadístico debido a la falta de datos con respecto al número de casos positivos por sitio.

## 9. Discusión

El riesgo potencial que implica la presencia del Bd para los anfibios no es un proceso meramente azaroso, tal como se observó en el presente estudio existe una susceptibilidad diferencial ante la infección por Bd. La presencia de una carga fúngica diferencial fue previamente reportada por García-Ro et al. (2014) y Muñoz-Alonso (2010). La mayor o menor probabilidad de infección depende en última instancia de sus atributos biológicos, dentro de los cuales las comunidades de microorganismo que viven sobre la piel de los anfibios (Microbioma-el cual es adquirido durante su desarrollo) juega un papel clave en la respuesta ante el Bd (Kueneman *et al.*, 2013; Bataille *et al.*, 2015). Por lo tanto, al ser diferentes los nichos que ocupan las especies en estudio y por ende diferentes las condiciones a las que se encuentran expuestas durante su desarrollo, se plantea una composición diferencial del microbioma, forjando una respuesta diferencial ante la infección por el patógeno, siendo ésta una posible explicación de la carga fúngica diferencial y a la observación de especies no infectadas en el presente estudio.

La carga fúngica promedio presente en *A. callidryas* (3 zoosporas) resultó ser más alta en comparación con García-Roa et al (2014) quienes reportan un número de zoosporas equivalentes de 0.6 para la especie. Por otra parte, se ha reportado la presencia del hongo para la especie *Agalychnis moreletii* en Chiapas (Istmo de Tehuantepec), sin embargo, el número de zoosporas observado anteriormente fue de 191.20 (Muñoz-Alonso, 2010), valor que es considerablemente superior a lo reportado en este estudio (1.6 zoosporas).

En ambos casos el promedio de zoosporas es considerado bajo para las especies *A. moreletii* y *A. callidryas*, ausente en el caso de *Craugastor laticeps*, *Hyalinobatrachium freishmanni*, *Bolitoglossa rufescens*, y *Bolitoglossa mexicana*. Para *Tlalocohyla picta* se reporta por primera vez la infección por Bd en México, la cual también tiene un número bajo de zoosporas equivalentes (1.2 zoosporas). Estos datos contrastan con lo propuesto por Berger et al, (1999), quienes probaron infecciones experimentales en donde se observó que existe una relación inversamente proporcional entre el número de zoosporas y la velocidad de mortalidad (días).

La baja tasa de infección o la ausencia de la mismas puede estar asociada con las temperaturas promedio de la zona (22.5 °C) con máximos de 26 °C y mínimos de 14°C, tal como lo reportan previamente Woodhams et al. (2003), donde enfatizan que los regímenes termales afectan el progreso de la Chytridiomycosis, manifestando que la exposición a periodos cortos de altas temperaturas elimina el patógeno de su hospedero. De igual forma Berger et al. (2004) reportan que temperaturas superiores o iguales a 27°C reducen la progresión de la infección, siendo la temperatura optima de crecimiento 16°C. De igual forma se reporta que la mayor prevalencia del quitridio se da en la época de primavera mientras su prevalencia se reduce, incluso llegando a ser nula en verano y otoño (Kriger & Hero 2006). Lo dicho antes es de vital importancia puesto que las altas temperaturas ambientales presentes en los trópicos durante los meses de verano pueden disminuir la prevalencia del quitridio hasta erradicarlo de las poblaciones (Woodhams *et al.*, 2003).

Esta situación se debe a que durante la época de verano particularmente a altas temperaturas se incrementa el recambio de la piel de los anfibios y se incrementa la secreción de mucosidades y la producción de sustancias antimicrobianas, limitando la progresión del patógeno sobre los organismos (Berger *et al.*, 2004). Por tal motivo la temperatura se vuelve un factor clave en la infección por Bd, con respecto al estudio al ser las temperaturas de la zona relativamente altas (22°C) y haberse llevado a cabo en verano, es posible que el recambio de piel, el aumento de defensas ante infecciones y la temperatura son los factores que promovieron una reducción o eliminación en el número de zoosporas de las especies de estudio, limitando así la distribución y proliferación del quitridio en la región.

De manera paralela para las especies *Craugastor laticeps*, *Bolitoglossa rufescens* y *Bolitoglossa mexicana* la ausencia de casos positivos de Bd puede estar determinada por las diferencias en el ciclo de vida que presentan respecto a las otras especies estudiadas. La primera gran diferencia se da en que las especies infectadas tienen larvas de vida libre asociadas con cuerpos de agua, mientras que los Craugastóridos y Pletodóntidos tienen desarrollo directo (Twining & Cossel, 2017; Wake & Hanken 1996). Además, estas

especies tienden a encontrarse en la hojarasca y estar en general más alejados de los cuerpos de agua (Weinstein, 2003).

Tal situación también se observa en el caso de *Rhinophrynus dorsalis*, el cual al ser un organismo fosorial (James, 1966) se encuentra fuera del marco de alcance de la infección por Bd, situación que explica la ausencia de Bd en tales organismos, sin embargo, al estar en contacto con los cuerpos de agua durante la reproducción no se encuentran exentos de la infección, puesto que están presentes en sitios con reportes de infección (Sanja). Es importante resaltar la importancia del estudio de la influencia de Bd sobre dicha especie al ser la única representante del género (Savage, 2002).

En el caso de *Bolitoglossa rufescens* y *mexicana* en la cuales no se observa presencia del quitridio contrasta con los resultados observados por Parrott et al (2016) en los cuales se muestra una prevalencia del 1-20% de Bd y una ausencia de *Batrachochytrium salamandrivorans*.

Por tal motivo en el caso de las especies terrestres o fosoriales al no estar asociados de manera permanente a cuerpos de agua las probabilidades de infección se reducen considerablemente, sin embargo, no se excluye la posibilidad de infección resultado de la interacción con factores exógenos como: el hombre, aves u otros organismos que estén en contacto con los cuerpos de agua contaminados con el patógeno. Sin embargo, la presencia de Bd en salamandras no es considerando un riesgo potencial ya que algunas especies son capaces de reducir y eliminar el Bd de sus sistemas (Longo V. A. comunicación personal), por lo tanto, es factible pensar que la ausencia de Bd en las salamandras del presente estudio puede estar asociado a su capacidad potencial de eliminar el patógeno.

De igual forma se ha demostrado (Longo & Burrowes, 2010) que en especies de desarrollo directo (*Eleutherodactylus coqui*), los estadios juveniles fueron identificados como los más susceptibles ante la infección por Bd, por tal motivo la infección de estadios juveniles en organismo de desarrollo directo se convierte en una de las causas de declinación de las poblaciones al evitar que se alcance la etapa reproductiva y por ende la posibilidad de mantener estable (demográficamente hablando) la población.

En el caso de *Hyalinobatrachium freishmanni* se encuentra asociado a cuerpos de agua lóxicos (Constante recambio de agua) (Acosta-Galvis, 2012), tal situación podría ser la causa de la ausencia de Bd en la especie ya que al estar en contacto con un constante flujo de agua, la posibilidad de la permanencia de zoosporas en el agua se reduce y por ende se reduce la probabilidad de que se encuentren en el mismo sitio las esporas y el hospedero de forma simultánea.

Asimismo, es importante destacar la presencia de Bd en renacuajos ya que se convierten en los reservorios y medios de distribución potenciales del quitridio, lo cual es observado en el estudio de Rachowicz & Vredenburg (2004) en el cual los renacuajos infectados con Bd permanecen sanos y los organismos post-metamórficos se ven infectados.

Esta situación convierte a los renacuajos en vectores ideales para la dispersión del hongo y al estar regularmente en congregaciones con otras especies la escala de dispersión se magnifica. En el presente estudio los renacuajos infectados se encontraban en una fosa aislada, sin embargo, coexistían con individuos adultos de *A moreletii* y *A callidryas*, no obstante, el hongo no se encuentre en altas tasas en organismo adultos, es probable que los renacuajos sean realmente la fuente de infección más que la interacción entre los organismos adultos, jugando un papel clave en la ampliación de la distribución del patógeno en la zona de estudio.

La familia con el mayor número de casos de Bd fue Hylidae lo cual es importante destacar puesto que nivel mundial está dentro de las cuatro familias cuya declinación a causa del Bd aumenta rápidamente (Stuart *et al.*, 2004.) (Apéndice 3-4). En el presente estudio 3 especies de la familia presentan Bd: *A moreletii*, *A callidryas* y *T. picta* para la cual no se había reportado previamente casos positivos. Como lo menciona Familiar-López (2010), es probable que las poblaciones de Hylidae en México también estén declinando o en riesgo de declinar, lo cual aunado con el hecho de que poseen un ciclo de vida fuertemente asociado a cuerpos de agua aumenta la susceptibilidad a la infección.

Es importante remarcar que en México la familia Hylidae posee la mayor diversidad en el grupo con 97 especies, el cual posee un alto grado de endemismo con 66 especies endémicas (68%) de un total de 252 especies de anfibios endémicos en México, por lo cual se considera un grupo clave en la investigación actual (Parra-Olea *et al.*, 2014).

Independientemente de la forma de desarrollo de los organismos, se sabe que existe transmisión vertical de Bd en organismos de desarrollo directo (Longo and Burrowes Unpublished data; huevos de *E. coqui*). Lo cual resalta que incluso organismos que habitan en la hojarasca o que tienen desarrollo directo pueden ser susceptibles de ser infectados por el BD. Sin embargo, es necesario evaluar si estos mismos fenómenos ocurren en el área de estudio o si las especies estudiadas tienen algún mecanismo específico que les permite evitar la infección en Nahá.

En el caso de la relación entre la condición corporal y el grado de infección se observó una tendencia a presentar menor condición corporal mientras mayor era el número de zoosporas para la especie de *A. moreletii* (machos), situación que coincide con lo reportado por Burrowes *et al.* (2008), en donde los organismos infectados con Bd (*Eleutherodactylus coqui*) eran significativamente más pequeños que los no infectados, lo que de acuerdo con los autores representa un costo en términos de adecuación. Este fenómeno genera un aumento en la demanda metabólica para combatir al Bd, la cual normalmente es usada para el desarrollo, es decir el resultado de la disminución del índice corporal está determinado por un compromiso (trade-off) entre la fisiología y la respuesta inmune, tal como se observa cuando los recursos energéticos son desplazados de la reproducción hacia la inmunocompetencia (McCallum & Trauth, 2007). Sin embargo, estos resultados, como se mencionan, debe ser tomados con cautela debido a la presencia de casos extremos.

Considerando todo lo dicho anteriormente, el quitridio podría fungir como una fuerza selectiva que está modificando las poblaciones naturales, más importante aún si consideramos la transmisión vertical de Bd, su efecto está no en la población parental sino directamente en la descendencia, lo cual implica que puede estar modificando el desarrollo embrionario de los organismo generando dos alternativas: por un lado alterar y disminuir

las poblaciones al eliminar la descendencia y por otro lado seleccionar aquella descendencia potencialmente inmune al Bd, lo cual en última instancia podría llevar a un proceso de especiación a nivel embrionario.

Por otro lado, dentro de los síntomas de la infección por Bd se encuentran la pérdida de coloración, factor que puede tener importantes implicaciones, puesto que en algunos estudios entre los que se encuentra el realizado por Desprat et al (2017), se observa que existe un relación entre la coloración y la inmunocompetencia (cuando el color se pierde a causa de alguna infección) al grado que esta situación se convierte en un fenómeno que genera selección sexual (Desprat et al., 2015), donde la hembras usan el color como indicador de la capacidad inmune de los machos y aquellos con menor color son menos elegidos. Por tal motivo es factible pensar que el Bd actúa como una presión selectiva a través de la pérdida de coloración, reduciendo la adecuación de aquellos organismos infectados evitando así su reproducción y probablemente a través de este mecanismo de selección sexual por parte de las hembras es posible evitar la transmisión vertical discutida en el párrafo anterior y evitar así la declinación masiva de las poblaciones naturales.

Los efectos sobre la condición corporal también se han visto relacionados con la vocalización de los organismos. Estudios previos han demostrado que organismos infectados y con una óptima condición corporal poseen una tasa de canto, duración, frecuencia e intervalos similares a los no infectados e incluso mayores que los no infectados, sin embargo, cuando los organismos poseen condiciones corporales deficientes su tasa de canto disminuye y por ende la probabilidad de dejar descendencia. Esa situación implica que lo machos incrementan su inversión de recursos en la atracción como un mecanismo de compensación ante el potencial riesgo de una desventaja reproductiva, promoviendo la selección de organismo tolerantes, capaces de limitar el daño causado por la infección (Roznik *et al.*, 2015; Greenspan *et al.*, 2016).

De igual forma se ha observado una reducción en los niveles de infección en organismos expuestos a depredadores, probablemente resultado de una respuesta inmune inducida por estrés lo que implica una modificación de la respuesta epidemiológica del hospedero. De manera paralela la hipótesis de los “rebaños sanos” sugiere que los depredadores reducen el riesgo de infección a través de una reducción denso-dependiente de la transmisión (Groner & Relyea, 2015) a través de la depredación de organismo infectados, los cuales carecen de respuesta al tacto, así como letargo que reduce considerablemente su probabilidad de supervivencia y con ello la probabilidad de infección dentro de la población.

La aparente ausencia y la baja tasa de infección por Bd en las especies en estudio, no implica necesariamente que el hongo tenga un bajo margen de distribución o infección dentro de la zona ya que el riesgo se vuelve latente y constante al considerar que la infección puede tardar en aparecer hasta siete semanas después de la introducción (Johnson & Speare, 2003). Esto podría dar pie a pensar que probablemente la introducción de Bd al ambiente en estudio es relativamente reciente, por lo cual se observan pocos casos positivos y en ciertas especies no se presenta ya que su distribución es aún “limitada”, por lo cual si las condiciones cambiaran se podría plantear la posibilidad de un aumento de casos positivos, así como una ampliación de distribución de la infección lo cual puede asociarse a la acción humana.

En última instancia el número de zoosporas puede estar asociado al tamaño del genoma y al número de copias de ITS en las cepas. Particularmente la cepa Mexicana (MexMk) reporta un bajo número de réplicas de ITS, lo que se ha interpretado como un bajo número de zoosporas (Longo et al., 2013), sin embargo, los estándares que se utilizan, se hacen con otras cepas, por lo que el número de zoosporas puede estar subestimado. Esto a su vez sugiere que en el sitio de estudio está presente la cepa mexicana y es la que se está detectando, por lo que los estimados de número de zoosporas serían resultado de un bajo número de copias de ITS en el genoma.

Asimismo, el hecho de poseer un bajo número de copias de ITS podría ser una de las razones por la cuales las curvas de amplificación poseen una amplificación retardada (por encima de los 40 ciclos) a diferencia de la amplificación de los controles (ciclo 30-37) en cuyo caso una amplificación en ciclos superiores se considera negativa. Por lo tanto, es lógico pensar (probabilísticamente hablando) en una amplificación retardada, resultado de una baja cantidad de templado. De igual forma un factor importante durante el proceso de amplificación es la optimización de primers y la sonda, es decir a concentraciones bajas (50nM) el ciclo de amplificación (Ct) es mayor, en cambio al aumentar la concentración (300nM) el Ct disminuye y aumenta la  $\Delta Rn$  obteniendo así mejores rendimientos, por lo tanto una amplificación en un ciclo mayor no necesariamente implica un resultado negativo, sino es únicamente el resultado de un menor rendimiento de la reacción de amplificación (Applied Biosystems, 2010b).

De manera general la supervivencia de los anfibios depende en última instancia del grado de infección y la etapa en la que se encuentre, la cual a su vez está determinada por su historia de vida (Garner et al., 2009). Por lo tanto, cada organismo es dotado de una capacidad diferencial de respuesta ante las infecciones, resultados de diferentes tradeoffs a lo largo de su desarrollo. Resultado que se puede observar en la respuesta diferencial que ante el Bd posee cada especie y organismo dentro de la misma.

Respecto a la presencia del Bd en Nahá y su prevalencia en diferentes organismos, hay que considerar que uno de los factores claves implicados en la dispersión y emergencia del Bd es el comercio de anfibios o el transporte incidental de zoosporas por cualquier actividad humana (incluido el ecoturismo), el cual ha probado tener una fuerte relación con la dispersión del patógeno (Fisher & Garner, 2007). Esto permitiría explicar la mayor prevalencia en el sitio “Centro” (Figura 20) en el cual el contacto humano-ambiente es más directo y representa el mayor riesgo de dispersión y en un inicio introducción del Bd., por lo cual se vuelve una necesidad la creación y seguimiento de regulaciones concernientes con la entrada y salida de especies y/o visitantes, con el fin de evitar la dispersión del quitridio y disminuir así probabilidad de infección en organismos y áreas libres de la misma. Otras alternativas comprenden la desinfección adecuada del equipo (botas, ropa,

calibradores, etc.), área de trabajo, así como vehículos antes y después de estar en contacto con los organismos para prevenir y evitar la dispersión (Phillott *et al.*, 2010) así como un manejo adecuado de los organismos (Guantes) (Mendez *et al.*, 2008). Estas medidas deben ser aplicadas especialmente por personas que están en constante contacto con los diferentes ambientes y organismos (exploradores de la vida silvestre, fotógrafos, investigadores, agricultores, turistas) con las regulaciones pertinentes, ya que el uso inadecuado e imprudente de desinfectantes (hipoclorito de sodio) en dosis elevadas causa la muerte de los renacuajos y zooplancton (Schmidt *et al.*, 2009).

Actualmente se ha planteado diferentes estrategias para mantener las poblaciones naturales y controlar la Chytridiomycosis basadas en tres pasos primordiales: identificación de mecanismo de supresión de la enfermedad; realizar pruebas en condiciones semi-naturales para estandarizar modelos epizootiológicos y dinámicas poblaciones y realizar ensayos de manejo adaptativo con poblaciones naturales (Woodhams *et al.*, 2011), cuyo seguimiento permitiría en última instancia la prevalencia de las poblaciones.

Considerando lo dicho anteriormente el riesgo potencial que representa el Bd para las especies de estudio se enfatiza al considerar que la especie *A. moreletii* se encuentra en riesgo crítico de acuerdo con la IUCN (2003) y dentro del apéndice II del CITES (2010), resultado de su exposición a factores como el comercio, degradación y destrucción de hábitat, el uso de agroquímicos y actualmente enfermedades fúngicas (Bd) (Frías-Álvarez *et al.*, 2008) y considerando la problemática actual que viven los anfibios ante el riesgo del Bd, el presente estudio se convierte en un apoyo en la determinación de la presencia y distribución del patógeno, con el fin poseer un marco claro del alcance de la Chytridiomycosis en el país en especies en riesgo y permitir con ello la realización y seguimiento de planes de manejo adecuados, para detener y evitar la distribución del patógeno reduciendo así la declinación de las poblaciones de anfibios en México, situación que se vuelve de vital importancia al ser considerado uno de los cuatro países con mayor diversidad de anfibios y el país con mayor número de áreas cero extinción (AZE-68), así como especies (151) dentro de las listas de protección.

Finalmente es importante mencionar que en la actualidad no se cuentan con campañas de capacitación enfocadas a la enseñanza adecuada del manejo de organismos y prevención de dispersión de enfermedades. Por tal motivo aunado a la realización del presente estudio se busca la difusión del conocimiento (reuniones informativas) con respecto a las medidas de seguridad para evitar la dispersión de Bd en la reserva de Nahá y posteriormente en reservas protegidas de Chiapas. De igual forma se vuelve una necesidad la realización de talleres a nivel escolar (nivel medio y superior) con el fin de crear una conciencia social del riesgo que representa el Bd y los métodos más adecuados de reducir el mismo y evitar así la pérdida de diversidad que México posee.

“La responsabilidad está en nuestras manos y de nosotros depende tomar la decisión de actuar o dejar de lado el futuro de la vida en el planeta”

## 10. Conclusiones

-Existe una carga diferencial de Zoosporas de *Batrachochytrium dedrobatidis* en las especies: *A. moreletii*, *A. callidryas* y *Tlalocohyla picta*,

-El presente reporte de Bd para *Tlalocohyla picta* (1.2 zoosporas) es el primero para la especie en México.

-El quitridio se encuentra presente en estadios juveniles de los organismos, lo cuales pueden tener un importante papel en la distribución del patógeno al comportarse como vectores potenciales de Bd.

-Las especies terrestres al no estar fuertemente asociadas a cuerpos de agua poseen una menor probabilidad de infección.

-La ausencia de Bd en las salamandras del presente estudio puede estar asociado a su capacidad potencial de eliminar el patógeno.

-La familia con el mayor número de casos de Bd fue Hylidae lo cual está asociado con un ciclo de vida fuertemente asociado a cuerpos de agua.

-Las condiciones de los cuerpos de agua, así como el hábitat (altas temperaturas) pueden actuar como factores limitantes de la presencia del quitridio.

-La tasa de infección de BD en los organismos estudiados fue baja, lo cual puede estar asociado con que la cepa mexicana es poco virulenta o tiene relativamente pocas copias de ITS, generando curvas de amplificación reatardadas. g

-En última instancia la supervivencia de los anfibios depende del grado de infección y la etapa en la que se encuentre, la cual está determinada por su historia de vida, creando una respuesta diferencial ante las infecciones.

## 11. Recomendaciones

El presente estudio se convierte en el punto de partida para lograr el cambio de paradigma y pasar de la etapa descriptiva a la etapa explicativa con respecto a la Quitrimiomycosis, por tal motivo se presenta una serie de recomendaciones enfocadas a lograr dicha transición.

Determinar si existen diferencias entre la cepa de Bd presente en México con la presente en el resto del mundo.

Se sugiere evaluar el microbioma de los organismos infectados para poder identificar las especies biológicas presentes en la piel de los organismos.

Realizar ensayos *in vitro* para evaluar el efecto del Bd sobre el microbioma.

Evaluar la posibilidad de un tratamiento biológico basado en la aplicación de algún componente del microbioma de organismos resistentes.

Identificar los posibles efectos del Bd en el desarrollo embrionario de los organismos.

Evaluar el costo de adecuación que implica la infección por Bd y determinar la presencia de mecanismo de compensación ante la infección (Tamaño de puesta, tiempo de desarrollo, esfuerzo reproductivo, condición corporal, etc).

Identificar de manera precisa el mecanismo de acción del Bd sobre los organismos a través de la realización de metabólica.

## 12. Literatura citada.

**Acosta-Galvis R. A. 2012.** First record of *Hyalinobatrachium fleischmanni* (Boettger, 1893) (Anura: Centrolenidae) from the Caribbean region of Colombia. Check List. 8(4): 794–795 pp.

**Agostini M. G., Cortelezzi A., Berkunsky I., Soler G., Burrowes P. 2015.** First record of *Batrachochytrium dendrobatidis* infecting threatened populations of Tandilean Red-belly toad (*Melanophryniscus aff. montevidensis*) in Argentina. Revista Mexicana de Biodiversidad 86: 826–828 pp

**Alexopoulos J. C., Mims W. C., Blackwell M. 1996.** Introductory Mycology. Jhon Wiley & Sons INC. United States of America. 86-107 pp.

**Applied Biosystems. 2010a.** Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Relative Standard Curve and Comparative CT Experiments. Getting Started Guide. Recuperado de: [<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4376357>]. Consultado 30 agosto del 2017. 287 p.

**Applied Biosystems. 2010b.** Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems. Reagent Guide. Recuperado de: [<https://thermofisher.com/order/catalog/product/4376357>]. Consultado 30 agosto del 2017. 148 p.

**Bataille A., Lee-Cruz L., Tripathi B., Kim H., Waldman B. 2015.** Microbiome Variation across Amphibian Skin Regions: Implications for Chytridiomycosis Mitigation Efforts. Microbiology Ecology. DOI 10.1007/s00248-015-0653-0. 13 p.

**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 U. S. A. 95 (15): 9031-9036 pp.

**Berger L., Speare R., Hines H. B., Marantelli G., Hyatt A. D., McDonald K. R., Skerratt L. F., Olsen V., Clarke J. M., Gillespie G., Mahony M., Sheppard N., Williams C., Tyler M. J. 2004.** Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to Chytridiomycosis. *Australian Veterinary Journal* 82 (7): pp 31-36 pp.

**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 pp.

**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.

**Boettger O., 1893.** Ein neuer Laubfrosch aus Costa Rica. *Berichte der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft in Frankfurt am Main*. 251-252 pp.

**Bosch J., Martínez-Solano I., García-París M. 2001.** Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation* 97: 331-337 pp.

**Bosch, J. (2003).** Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. *Munibe*, 16, 56–73.

**Boyle, D.G., D.B. Boyle, 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 pp.

**Burke E. A. S/A.** Life cycle of Chytrid Fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. Recuperado de [<http://www.alison-burke.com/works-lifescience.html>]. Consultado: 13 Julio 2017.

**Burrowes A. P., Longo V. V., Rodríguez A. C. 2008.** Potential fitness cost of *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Eleutherodactylus coqui*, and comments on environment-related risk of infection. *Herpetotropicos*. 4 (2):51-57 pp.

**Brem F. J. R. Mendelson III, and K. R. Lips. 2007.** Field-Sampling Protocol for *Batrachochytrium dendrobatidis* from Living Amphibians, using Alcohol Preserved Swabs. Version 1.0 (18 July 2007). Electronic document accessible at <http://www.amphibians.org> Conservation International, Arlington, Virginia, USA.

**Cabrera H. R. 2012.** Evaluación de la presencia del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, en poblaciones de anfibios en área cero extinción (AZE) en Oaxaca y Chiapas, México. *Lacandonia* 6 (1): 7-16 pp.

**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 PNAS* 108 (23): 9502-9507 pp.

**CONANP. 2006.** Programa de conservación y manejo área de protección de flora y fauna Nahá. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, México City. p 178.

**Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres (CITES). CoP15 Prop. 13.** Decimoquinta reunión de la Conferencia de las Partes Doha (Qatar), 13-25 de marzo de 2010. Tomado de [<https://www.cites.org/esp/cop/15/prop/S-15%20Prop-13.pdf>]

**Cope E. D. 1862.** Catalogue of the reptiles obtained during the explorations of the Parana, Paraguay, Vermejo, and Uruguay Rivers, by Capt. Thos. J. Page, U.S.N., and of those procured by Lieut. N. Michler, U.S. Top. Eng., Commander of the expedition conducting the survey of the Atrato River. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia.* (14): 346-359 pp.

**Cope E. D. 1869.** A review of the species of the Plethodontidae and Desmognathidae. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia.* (21): 93-118 pp.

**Desprat L. J., Lengagne T., Dumet A., Desouhant E., Mondya N. 2015.** Immunocompetence handicap hypothesis in tree frog: trade-off between sexual signals and immunity? *Behavioral Ecology.* 26 (4): 1138–1146 pp.

**Desprat L. J., Lengagne T., Mondy N. 2017.** Immune challenges and visual signalling in tree frogs. *The Science of Nature.* 104 (21): 10 p.

**Duellman W. E. 1970.** The hylid frogs of Middle America. University of Kansas Museum of Natural History. Lawrence. Kansas.

**Duellman W. E. 2001.** The Hylid Frogs of Middle America. 2nd ed. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. Ithaca, New York, USA.

**Duméril A. H. A. 1853.** Mémoire sur les batraciens anoures, de la famille des hylaeformes ou rainettes, comprenant la description d'un genre nouveau et de onze especes nouvelles. Annales Des Sciences Naturelles, Zool. 3 (19): 135-179 pp.

**Duméril A. M. C. & Bibron G. 1841.** Erpétologie générale ou Histoire naturelle complète des reptiles. (8):1-792 pp. Paris. Librarie Encyclopedique de Roret.

**Duméril A. M. C., Bibron G., Duméril A. H. A. 1854.** Erpétologie générale ou Histoire naturelle complète des reptiles. (9): 1-440 pp.

**Faivovich J., Haddad C. F. B., Baêta D., Jungfer K. H., Alvares G. F. R., Brandão R. A., Sheil C. A., Barrientos L. S., Barrioamorós C. L., Cruz C. A. G. D., Wheeler W. C. 2010.** The phylogenetic relationships of the charismatic poster frogs, Phyllomedusinae (Anura, Hylidae). Cladistics 26 (3): 227-261 pp.

**Familiar L. M. 2010.** Influencia de los Factores Ambientales y Geográficos en la Incidencia y Prevalencia de la Quitridiomycosis en la Anfibios de las Zonas Montañosas de Guerrero, México. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Biología Ambiental. Instituto de Ecología UNAM. México D.F. 56 p.

**Felger J., Enssle J., Méndez D., Speare R. 2007.** Chytridiomycosis in El Salvador. Salamandra 43 (2): 122-127 pp.

**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 pp.

**Frías-Álvarez, 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. *Ecology & Health*. (5): 18–26 pp.

**Fisher C. M. & Garner J. W. T. 2007.** The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biology Reviews*. (21):2 – 9 pp.

**García-Roa R., Sunyer J, Fernández-Loras A., Bosch J. 2014.** First record of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Nicaragua. *Herpetological Journal*. (24): 65-68 pp.

**Garner T. W. J., Walker S., Bosch J., Leech S., Rowcliffe J. M., Cunningham A. A., Matthew C. F. 2009.** Life history tradeoffs influence mortality associated with the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *OIKOS, Synthesising Ecology*. 118: 783–791 pp.

**Global *Bd*-Mapping Project. S/A. Bd-Maps. Recuperado [http://www.bd-maps.net/maps/] Consultado 13 Julio 2017.**

**Greenspan E. S., Roznik A. E., Schwarzkopf L., Alford A. R., Pike A. D. 2016.** Robust calling performance in frogs infected by a deadly fungal pathogen. *Ecology and Evolution*. 6 (16): 5964-5972 pp.

**Groner L. M. & Relyea A. R. 2015.** Predators reduce *Batrachochytrium dendrobatidis* infection loads in their prey. *Freshwater Biology*. doi:10.1111/fwb.12602. 7 p.

**Guilherme B. C., Roberto F. C., Baptista H. C. F., Fernandes B. R., Inácio P. P. 2007.** Habitat Split and the Global Decline of Amphibians. *Science*. (318): 1775-1777 pp.

**Günther A., 1885-1902.** *Biologia Centrali Americana. Reptilia and Batrachia*. Taylor and Francis. London. 326 p.

**Hirschfeld M., Blackburn D. C., Doherty-Bone T. M., Gonwouo L. N., Ghose S., Mark-Oliver R. 2016.** Dramatic Declines of Montane Frogs in a Central African Biodiversity Hotspot. *PLOS ONE* | DOI: 10.1371/journal.pone.0155129.

**Hyatt A.D., Boyle D. G., Olsen V., Boyle D. B., Berger L., Obendorf D., Dalton A., Kriger K., Hero M., Hines H., Phillott R., Campbell R., Marantelli G., Gleason F., Colling A. 2007.** Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. Diseases of aquatic organisms. (73): 175–192 pp.

**IUCN—The World Conservation Union. 2003** IUCN Red List of Threatened Species. Tomado de [<http://www.redlist.org> (2003)].

**James P. 1966.** The Mexican burrowing toad, *Rhinophrynus dorsalis*, an addition to the vertebrate fauna of the United States. Texas Journal of Science (18): 272-276 pp.

**Johnson J. D., Mata-Silva V., García P. E., Wilson L. D. 2015.** The herpetofauna of Chiapas, Mexico: composition, distribution, and conservation. Mesoamerican Herpetology 2 (3): 272-329 pp.

**Johnson, M. L. & Speare, R. 2003.** Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and disease control implications. Emerging Infectious Diseases. (9): 922-925 pp.

**Jungfer K. H. & Weygoldt P. 1994.** The reproductive biology of the leaf frog *Phyllomedusa lemur* BOULENGER 1882, and a comparison with other members of the Phyllomedusinae. Revue Française d'Aquariologie. (21): 57-64 pp.

**Köhler G. 2011.** Amphibians of Central America. 1 ed. Expetan, Verlag Elke Köhler. Alemania. 374p.

**Kolby J. E., Padgett-Flohr G. F., Field R. 2010.** Amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Cusuco National Park, Honduras. Diseases of Aquatic Organisms. (92): 245–251 pp

**Kubicki B. 2004.** Leaf-frogs of Costa Rica. Editorial INBio, San Jose, Costa Rica.

**Kueneman G. J., Parfrey W.L., Woodhams C.D., Archer M.H., Knight R., Mckenzie J.V. 2013.** The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages. Molecular Ecology. Doi: 10.1111/mec.12510. 1-13 pp.

**Kruger M. K & Hero M. J. 2006.** Large-scale seasonal variation in the prevalence and severity of Chytridiomycosis. *Journal of Zoology*. DOI: 10.1111/j.1469-7998.2006.00220. x.1-8 pp.

**Lamoreux J. F., McKnight M. W., Hernandez C. R. 2015.** *Amphibian Alliance for Zero Extinction Sites in Chiapas and Oaxaca*. Gland, Switzerland: IUCN. xxiv + 320pp.

**Lips K. R., Green D. E., Papendick R. 2003.** Chytridiomycosis in Wild Frogs from Southern Costa Rica. *Journal of Herpetology*. 37(1): 215-218 pp.

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

**Livak J. K., Flood J.A.S., Marmaro J., Giusti W., Deetz Karin. 1995.** Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Ends Provide a Quenched Probe System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization. *Research*. (4): 257-362 pp.

**Longo V. A. & Burrowes A. P. 2010.** Persistence with Chytridiomycosis Does Not Assure Survival of Direct-developing Frogs. *EcoHealth*. DOI: 10.1007/s10393-010-0327-9. 11 p.

**Longo V. A., Rodriguez D., da Silva Leite D., Toledo L. F., Mendoza A. C., Burrowes A. P., Zamudio R. K. 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 (10): 10.1371/annotation/e4c527e6-4b6f-4c12-970c-a9e2e6ed8f79.

**Mendez D., Webb R., Berger L., Speare R. 2008.** Survival of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* on bare hands and gloves: hygiene implications for amphibian handling. *Diseases of Aquatic Organisms*. (82): 97–104 pp.

**McCallum L. M. & Trauth E. S. 2007.** Physiological trade-offs between immunity and reproduction in the northern cricket frog (*Acris crepitans*). *Herpetológica*. 63 (3): 269–274 pp.

**Muñoz-Alonso, L. A. 2010.** Riqueza, diversidad y estatus de los anfibios amenazados en el sureste de México; una evaluación para determinar las posibles causas de la declinación de las poblaciones. Colegio de la Frontera Sur, Departamento de Fauna Silvestre. San Cristóbal de las Casas, Chiapas. 44 p.

**Olson D. H., Aanensen D. M., Ronnenberg K. L., Powell C. L., Walker S. F., Bielby J., Garner T. W. J., Weaver G., & Fisher M. C. 2013.** Mapping the Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the Amphibian Chytrid Fungus. Plos One. (8): 1-13 pp.

**Parrott C.J., Shepack A., Burkart D., LaBumbard B., Scimè P., Baruch E., Catenazzi A. 2016.** Survey of Pathogenic Chytrid Fungi (*Batrachochytrium dendrobatidis* and *B. salamandrivorans*) in Salamanders from Three Mountain Ranges in Europe and the Americas. Eco Health. DOI: 10.1007/s10393-016-1188-7. 8 p.

**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 pp.

**Phillott D. A., Speare R., Hines B. H., Skerratt F. L., Meyer E., McDonald R. K., Cashins D. Mendez D., Berger L. 2010.** Minimising exposure of amphibians to pathogens during field studies. Diseases of Aquatic Organisms. (92): 175–185 pp.

**Powell, M. J. 1993.** Looking at mycology with a Janus face: A glimpse at chytridiomycetes active in the environment. Mycology. (85): 1-20 pp.

**Pyburn W. F. 1963.** Observations on the life history of the treefrog, *Phyllomedusa callidryas* (Cope). Texas Journal of Science. (15): 155-170 pp.

**Pyburn W. F. 1964.** Breeding behavior of the leaf-frog, *Phyllomedusa callidryas*, in southern Veracruz. The American Philosophical Society Yearbook. (1964): 291-294 pp.

**Rachowicz J. L., Vredenburg T. V. 2004.** Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. Diseases of Aquatic Organisms. (61): 75–83 pp.

**Rebollar E. A., Woodhams D. C., LaBumbard B., Kielgast J., Harris R. N. 2017.** Prevalence and pathogen load estimates for the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* are impacted by ITS DNA copy number variation. *Diseases of Aquatic Organisms*. 21:123 (3): 213-226 pp.

**Rodriguez D., Becker C. G., Pupin N. C., Haddad C. F. B., Zamudio K. R. 2014.** Long-term endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic Forest of Brazil. *Molecular Ecology*. (23): 774–787 pp.

**Roznik A. E., Sapsford J. S., Pike A. D., Schwarzkopf L., Alford A. R. 2015.** Condition-dependent reproductive effort in frogs infected by a widespread pathogen. *Proceedings of the Royal Society of London B*.282. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2015.0694>

**Rueda-Almonacid, J.V., F Castro y C. Cortez. 2006.** Técnicas para el inventario y muestreo de anfibios: Una compilación. *En: Angulo, A., J.V. Rueda-Almonacid, J.V. Rodríguez-Mahecha y E. La Marca (eds.). Técnicas de Inventario y Monitoreo para los Anfibios de la Región Tropical Andina. Conservación Internacional. 299 p.*

**Savage J. M. 2002.** *The Amphibians and Reptiles of Costa Rica: A Herpetofauna between two Continents, between two Seas.* University of Chicago Press. Chicago.

**Savage J. M. & Myers C. W. 2002.** Frogs of *the Eleutherodactylus biporcatus* Group (Leptodactylidae) of Central America and northern South America, including rediscovered, resurrected, and new taxa. *American Museum Novitates*. (3357): 1-48 pp.

**Schmidt R. B., Geiser C., Peyer N., Keller N., von Rütte M. 2009.** Assessing whether disinfectants against the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* have negative effects on tadpoles and zooplankton. *Amphibia-Reptilia*. (30): 313-319 pp.

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

**Toledo L. F., Britto B. F., Araújo S. G. O., Giasson O. M. L., Haddad B. F. C. 2006.** The Occurrence of *Batrachochytrium Dendrobatidis* in Brazil and the Inclusion of 17 New Cases of Infection. *South American Journal of Herpetology*. 1(3): 185-191 pp.

**Trueb L. & Gans C. 1983.** Feeding specialization of the Mexican burrowing toad, *Rhinophrynus dorsalis* (Anura: Rhinophrynidae). *Journal of Zoology, London*. (199): 189-208 pp.

**Twining E. J. & Cossel O. J. Jr. 2017.** Temporal and spectral analysis of the advertisement call of *Craugastor stejnegerianus* (Anura: Craugastoridae) in Costa Rica. *Mesoamerican Herpetology*. 4 (1): 129-136 pp.

**Vásquez-Ochoa A., Bahamón C. P., Prada S. L. D., Franco-Correa M. 2012.** Detección y Cuantificación De *Batrachochytrium dendrobatidis* En Anfibios De Las Regiones Andina Central, Oriental, Orinoquia Y Amazonia De Colombia. *Herpetotropicos* 8 (1-2): 13-21 pp.

**Velásquez-E. B.E., Castro F., Bolívar-G W., Herrera M. I. 2008.** Infección por el Hongo Quitrido *Batrachochytrium Dendrobatidis* en Anuros de la Cordillera Occidental de Colombia. *Herpetotropicos*. 4(2):65-70 pp.

**Vieria A. C., Almeida N. L. C. H., Lambertini C., Leite D. S. D., Toledo L. F. 2012.** First Record of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Paraná, Brazil. *Herpetological Review*, 43 (1): 93–94 pp.

**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 pp.

**Wake D. B. & Vredenburg V. T. 2008.** Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences PNAS* 105 (suppl. 1): 11466–11473 pp.

**Wake B.D. & Hanken J. 1996.** Direct development in the lungless salamanders: what are the consequences for developmental biology, evolution and phylogenesis? *The International Journal of Developmental Biology*. (40): 859-869 pp.

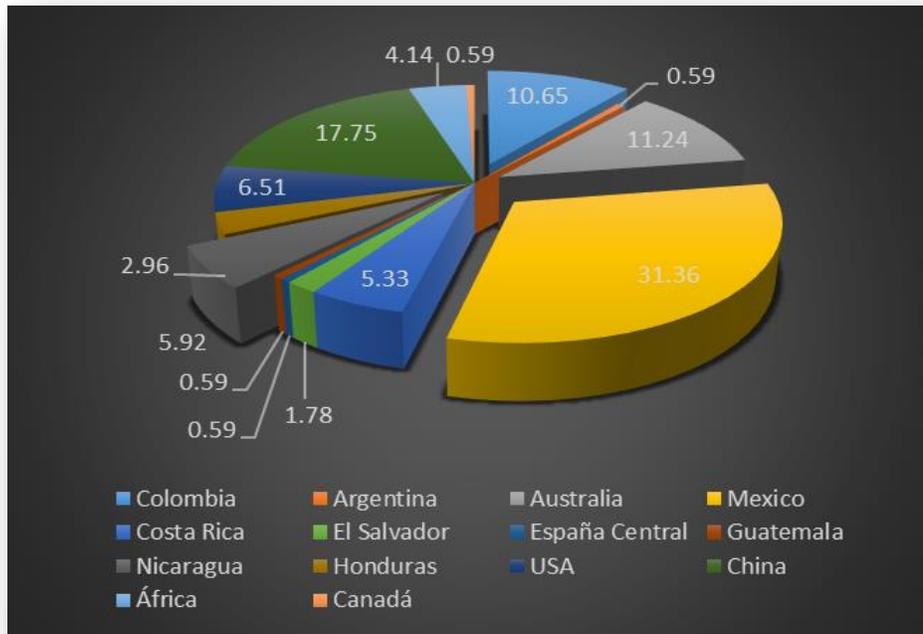
**Weinstein, S. B. 2009.** An aquatic disease on a terrestrial salamander: individual and population level effects of the amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, on *Batrachoseps attenuatus* (Plethodontidae). *Copeia*. (4): 653-660 pp.

**Weldon C., du Preez L. H., Hyatt A. D., Muller R. & Speare. 2004.** Origin of the amphibian Chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases* 10 (12): 2100-2105 pp.

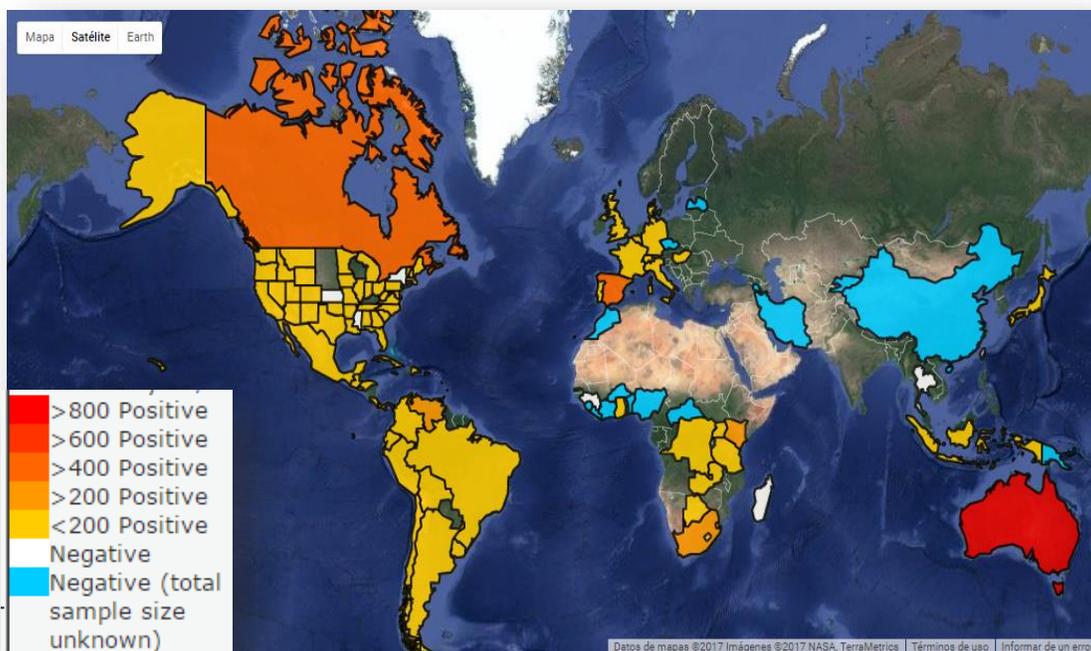
**Woodhams C.D., Alford A.R., Marantelli G. 2003.** Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Diseases of Aquatic Organisms*. 55: 65–67 pp.

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

### 13. Apéndice



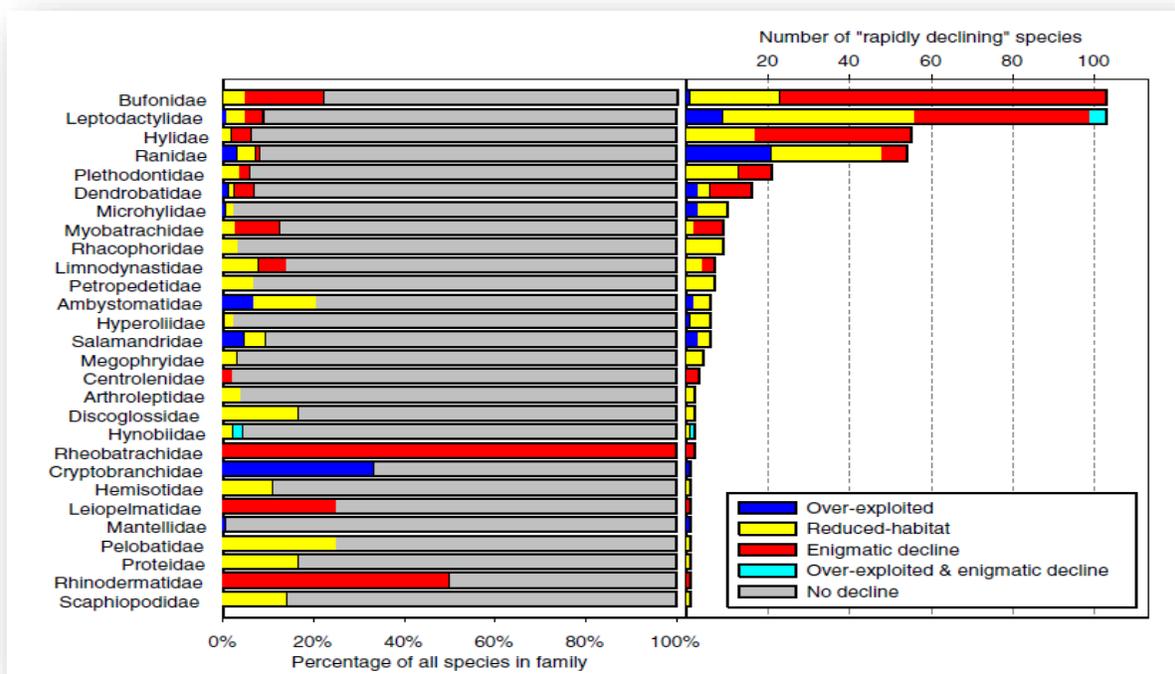
Apéndice 1. Análisis de presencia de Bd por región.



Apéndice 2. Distribución de la infección a nivel mundial (Global Bd-Mapping Project) (<http://www.bd-maps.net/maps/>)

Habitat preferences	Total number of species (%)	Number of "rapidly declining" species† (%)	Number of "enigmatic-decline" species‡ (%)
Forest	4,699 (81.8)	365 (82.6)	187 (90.3) ****↑
Savanna	487 (8.5)	7 (1.6) ***↓	0 (0.0) ****↓
Shrubland	814 (14.2)	47 (10.6) *↓	14 (6.8) ***↓
Grassland	953 (16.6)	81 (18.3)	39 (18.8)
Flowing water	2,650 (46.1)	277 (62.7) ***↑	164 (79.2) ****↑
Marshes / swamps	760 (13.2)	43 (9.7) *↓	14 (6.8) **↓
Still water bodies	2,030 (35.3)	107 (24.2) ***↓	28 (13.5) ***↓
Artificial terrestrial habitats	1,304 (22.7)	40 (9.0) ****↓	22 (10.6) ****↓
Tropical lowland habitats	3,392 (59.1)	212 (48.0) **↓	79 (38.2) ***↓
Tropical montane habitats	2,714 (47.3)	251 (56.8) ***↑	155 (74.9) ****↑
<b>Biogeographic realms</b>			
Afrotropical	951 (16.6)	28 (6.3) ****↓	1 (0.5) ****↓
Australasian/ Oceanic	561 (9.8)	36 (8.1)	23 (11.1)
Australia and New Zealand	219 (3.8)	32 (7.2) ****↑	23 (11.1) ****↑
Indomalayan	938 (16.3)	59 (13.3)	1 (0.5) ****↓
Nearctic	331 (5.8)	24 (5.4)	9 (4.3)
Neotropical	2,825 (49.2)	279 (63.1) ***↑	174 (84.1) ****↑
Palaearctic	451 (7.9)	34 (7.7)	2 (1.0) ****↓

Apéndice 3. Declinaciones y declinaciones enigmáticas por preferencia de Hábitat (Stuart *et al.*, 2004).



Apéndice 4. Grado de declinación por familia, porcentaje de especies afectadas (Stuart *et al.*, 2004).

<b>Reactivo</b>	<b>Descripción</b>	<b>Clave del Producto/Distribuidor</b>	<b>Concentración/Cantidad</b>
<i>Custom sequence Detection Primer</i>	TS-1-3 CHYTR CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC	4304970-Thermo Fisher Scientific	10 nM (400 reacciones)
	5.8 CHYTR AGCCAAGAGATCCGTTGTCAAA	4316033- Thermo Fisher Scientific	10 nM (400 reacciones)
<i>Taq Man MGB probe</i>	6FAM CGAGTCGAACAAAAT MGB	4316033- Thermo Fisher Scientific	200000 pM (1600 reacciones)
<i>Prepman</i>	PREPMAN ULTRA	4322547-Acceso Lab	20 ml (400 reacciones)
<i>Master Mix</i>	TAQMAN UNIVMMIX	4304437-Acceso Lab	5 ml (400 reacciones)
<i>Agua Inyectable</i>	Ampolleta De Vidrio	2062-Continental Lab. Products S.A. de C.V.	10 ml
<i>Placa de 48 pozos</i>	FG-FAST OPTICAL 48-WELL RXN 1	4375816-Acceso Lab	-
<i>Film Adhesivo</i>	48-WELL OPTICAL ADHESIVE FILM 1	4375928-Acceso Lab	-
<i>Step One System</i>	STEPONE™ REAL-TIME PCR SYTEM	4376357- Thermo Fisher Scientific	-

Apéndice 5. Características de reactivos usados en el estudio.