



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL. UNIDAD DE GENÓMICA
AVANZADA

**“CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA FÚNGICO DE
SALAMANDRAS CAVERNICOLAS DE MÉXICO”**

Tesis que presenta

Lic. en Microbiología Emanuel Martínez Ugalde

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

En la especialidad de

Biotecnología de plantas

Director de tesis: **Dr. Sean M. Rovito**

Irapuato, Gto.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad en el Laboratorio de Genómica y Diversidad de Vertebrados bajo la dirección del Dr. Sean M Rovito, gracias al apoyo del Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto titulado “Desarrollo de una estrategia de conservación contra enfermedades infecciosas fúngicas a través de la caracterización y el uso del microbioma de la piel de salamandras” y de la beca 781100.

Este trabajo se realizó del 1 de marzo de 2017 a 17 de diciembre de 2018.

Miembros del comité:

Sean M Rovito

Eugenio Mancera Ramos

Alfredo Heriberto Herrera Estrella

Fecha de examen: 28 de febrero de 2019

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado para la realización de este proyecto.

Al Dr. Sean M Rovito y a las personas del Laboratorio de Genómica y Diversidad de Vertebrados, por el apoyo el apoyo brindado durante el tiempo que conviví en el laboratorio con ellos. Especialmente al Dr. Rovito por su apoyo durante los momentos complicados que se presentaron durante la realización del proyecto.

A los miembros del comité tutorial, Dr. Alfredo Herrera-Estrella, Dr. Eugenio Mancera Ramos por sus comentarios hacia el trabajo realizado. También a los antiguos miembros del comité. Dra. Laila Partida Martínez y Dr. Ruairidh Sawers, por los comentarios e ideas aportadas durante los exámenes tutoriales.

A mis amigos por su tiempo y consejos durante mi estancia en el CINVESTAV, han sido de gran ayuda para llegar hasta este momento. Aunque ya no estén muchas gracias por todo.

A mi familia por el apoyo incondicional en todo momento. Gracias.

Índice de contenido.

Resumen.....	3
Abstract.....	5
Introducción.....	7
Generalidades del microbioma.....	7
Enfermedades emergentes y Quitridiomycosis.....	10
Antecedentes.....	13
Microbioma cutáneo de anfibios.....	13
Resistencia a la quitridiomycosis mediada por el microbioma.....	15
Estrategias de estudio del microbioma.....	16
Hábitat cavernícola.....	20
Salamandras cavernícolas.....	22
Justificación.....	24
Objetivo.....	26
Objetivos específicos.....	26
Hipótesis.....	27
Métodos.....	28
Colecta de salamandras y obtención de frotis cutáneos.....	28
Análisis de los datos de secuenciación.....	30
Análisis de Diversidad.....	31
Diversidad alfa.....	31
Diversidad beta.....	31
Nucleó del micobioma cutáneo.....	33
Resultados.....	35
Clasificación taxonómica de los OTU fúngicos.....	35
Nucleó del micobioma fúngico cutáneo.....	40
Presencia de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en el microbioma cutáneo.....	42
Diversidad alfa.....	46
Diversidad Beta.....	48
Discusión.....	61

Diversidad fúngica sobre el microbioma cutáneo de las salamandras cavernícolas.	61
Presencia de <i>Batrachocytrium dendrobatidis</i> en el micobioma cutáneo.....	68
Factores que influyen sobre la composición del micobioma cutáneo.	70
Conclusiones.....	75
Perspectivas.....	76
Anexo 1.....	78
Anexo 2.....	80
Anexo 3.....	85
Bibliografía.....	87

Índice de Figuras.

Figura 1. A) Mapa de las especies de salamandras cavernícolas de los géneros <i>Chiropterotriton</i> e <i>Ixalotriton</i> incluidas en el proyecto.	28
Figura 2 Heatmap que muestra la asignación taxonómica a nivel de filo por especie.	36
Figura 3. Barplots que muestran la asignación taxonómica a nivel de filo.	37
Figura 4. Heatmap que muestra la asignación taxonómica a nivel de orden por especie. .	39
Figura 5. Ordenes fúngicos en baja abundancia. Se muestran los ordenes fúngicos más abundantes pertenecientes a los filios de baja frecuencia relativa en cada una de las especies.	40
Figura 6. Núcleo del microbioma cutáneo de salamandras.	41
Figura 7. Núcleo del microbioma cutáneo de salamandras en donde se detectó Bd.	43
Figura 8. Abundancia de reads entre muestras con presencia y ausencia de Bd.	44
Figura 9. Abundancia de reads entre muestras con presencia y ausencia de Bd de los cinco ordenes mas abundantes del filo Basidiomycota.	45
Figura 10. Gráficos de acumulación de especies.	48
Figura 11. Índices de diversidad.	49
Figura 12. PCA del set de datos completo (68 muestras) sin aplicar la transformación de Hellinger.	51
Figura 13. PCA del set de datos completo (68 muestras) después de aplicar la transformación de Hellinger.	52
Figura 14. PCA de las muestras pertenecientes al género <i>Chiropterotriton</i>	53
Figura 15. PCA de las muestras ambientales dentro de las cuevas.	54
Figura 16. PCA de las muestras pertenecientes a la especie <i>C. magnipes</i> de dos localidades distintas.	55
Figura 17. PCA de las muestras pertenecientes a la especie <i>C. multidentatus</i> de tres localidades distintas y de origen tanto dentro (Grieta el cincuenta y ocho y Valle de los Fantasmas) y fuera de las cuevas (Bosque del repetidor).	55
Figura 18. PCA de las muestras colectadas en la localidad El Coni.	56
Figura 19. PCA de las muestras colectadas en la localidad Valle de los Fantasmas.	57
Figura 20. PCA de las muestras con o sin presencia de Bd.	58
Figura 21. Barplot de las asignaciones taxonómicas a nivel de filo de las salamandras del Eje Neovolcánico Transversal.	66
Figura 22. Los diez ordenes fúngicos más abundantes del filo Basidiomycota.	80
Figura 23. Los diez géneros fúngicos más abundantes del filo Basidiomycota.	81
Figura 24. Los diez ordenes fúngicos más abundantes del filo Ascomycota.	82
Figura 25. Los diez géneros fúngicos más abundantes del filo Ascomycota.	83
Figura 26. Las diez especies fúngicos más abundantes del filo Mortierellomycota.	84

Índice de tablas.

Tabla 1. Número de especímenes colectados por especie y sitio donde fueron colectados.	29
Tabla 2. Frecuencia de secuencias asignadas a <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en las muestras donde el patógeno fue detectado.	42
Tabla 3. Resultados de la prueba Kruskal-Wallis.....	59
Tabla 4. Resultados del análisis PERMANOVA.	59
Tabla 5. Número de secuencias generadas para cada una de las muestras.....	78
Tabla 6. Kruskal-Wallis pareado entre los distintos orígenes de las muestras.	85
Tabla 7. Kruskal-Wallis pareado entre los distintos puntos de muestreo.	85
Tabla 8. Kruskal-Wallis pareado entre cada una de las especies.	85
Tabla 9. Kruskal-Wallis pareado entre los tipos de las muestras.....	86

Resumen.

El estudio del microbioma de la piel de los anfibios ha cobrado gran importancia en la última década debido a la capacidad de los microorganismos que forman parte de microbioma cutáneo para inhibir el crecimiento del hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), el cual es el agente causal de la quitridiomycosis enfermedad que ha provocado declives poblacionales en diversas especies de anfibios alrededor del mundo. Sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha se han enfocado en describir y caracterizar únicamente la porción bacteriana del microbioma cutáneo dejando de lado el componente fúngico del microbioma que ha sido poco estudiado.

Mediante la secuenciación por Illumina de librerías de la región interespaciadora 1 (ITS1) del gen ribosomal de los hongos que forman parte del microbioma, se caracterizó a nivel taxonómico la porción fúngica del microbioma cutáneo de nueve especies de salamandras cavernícolas, todas ellas endémicas a México. Adicionalmente usando análisis de ordenación se investigó como se relacionan diversos factores ambientales y biológicos con la diversidad de las comunidades fúngicas de la piel.

Se lograron identificar 6,903 OTU fúngicos en las muestras secuenciadas, los cuales se clasificaron taxonómicamente en diez filos fúngicos, siendo los Ascomycota, Basidiomycota y Mortierellomycota los filos más abundantes sobre la piel de las salamandras cavernícolas. Bd fue detectado en 12 de las 58 muestras analizadas y se observó que la presencia del patógeno es el único factor que tiene un efecto sobre la composición del microbioma. Contrario a lo esperado para factores como: el tipo de hábitat, la especie del hospedero, o la localidad de muestreo no se detectó algún efecto sobre la diversidad de la porción fúngica del microbioma, lo que contrasta con diversos reportes que demuestran que estas variables tienen un efecto sobre la diversidad de la porción bacteriana del microbioma.

Adicionalmente se analizó si existe un núcleo del microbioma en dos de las especies de salamandras *C. magnipes* y *C. multidentatus*. Se detectó que existen pocos OTU

compartidos por individuos de la misma especie, lo que indica que existe una gran variabilidad en la composición de las comunidades fúngicas de la piel de estos anfibios, sugiriendo que no existe un núcleo del microbioma cutáneo. De la misma manera se analizó si los individuos en los que se detectó Bd comparten OTU similares, y se identificó que el 70% de las muestras positivas para Bd comparten 44 OTU fúngicos, y algunos de ellos no están presentes en aquellas muestras en donde Bd no estuvo presente.

Este trabajo nos permitió conocer a nivel taxonómico como está conformada la porción fúngica del microbioma cutáneo de salamandras cavernícolas endémicas de México, además pudimos identificar que la presencia de Bd sobre la piel de los anfibios se relaciona con un cambio en la composición del microbioma.

Abstract.

In the last decade the study of the amphibian skin microbiome has taken on great importance due to the ability of microorganisms to inhibit the growth of the fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). However almost all the studies that have been done to date mainly focus on the description and characterization of the bacterial portion of the skin microbiome, leaving aside the fungal component of the skin microbiome, which hasn't been studied deeply as the bacterial component.

In this work we characterize at a taxonomic level the fungal portion of the skin microbiome of nine species of cave dwelling salamanders. This characterization has been done by sequencing amplicon libraries of the Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) of the ribosomal gene of all the fungi present on the skin of the salamanders. Additionally, we used ordination analyses to identify if some environmental or biological factors that correlates with a change in the composition of the fungal skin microbiome.

We identified 6,903 fungal OTU that were classified into ten different phyla; Ascomycota, Basidiomycota and Mortierellomycota were the most abundant on the skin of cave dwelling salamanders. Additionally, we detected the presence of Bd in 12 of 58 samples and found that the presence of the pathogen was the only factor that correlates with a change in the composition of the fungal microbiome. Contrary to our expectations, other factors such as the type of habitat, host species or the sample locality did not influence microbiome composition, which contrasts with several reports that demonstrate a correlation of these factors in the composition of the bacterial portion of the skin microbiome.

Additionally, we investigated if there is a core microbiome in two species of salamanders *C. magnipes* and *C. multidentatus*. The results show that there are few fungal OTU shared between individuals of the same species. This means that there is a high variability of the fungal microbiome composition in the skin of cave dwelling salamanders;

these results lead to the conclusion that there is no core fungal skin microbiome in these species. In addition, we analyzed if the samples in which Bd was present share the same or similar OTU. We found that 70% of the Bd positive samples share 44 fungal OTU, some of which are only present in Bd positive samples.

In this project we characterized the composition of the fungal skin microbiome at a taxonomic level of nine cave dwelling salamanders endemic to Mexico. We were able to show that the presence of the fungal pathogen Bd on the skin is the only factor that correlates with changes in the microbiome composition.

Introducción.

Generalidades del microbioma.

El entendimiento del rol de los microorganismos en la biología de sus hospederos ha sufrido un cambio de paradigma en los últimos años, ya que estos han pasado de ser considerados como agentes causales de enfermedades a ser considerados como un componente vital para la sobrevivencia de sus hospederos. El cambio en la percepción del rol de los microorganismos ha llevado a la creación de términos como: holobionte, hologenoma y microbioma (Bordenstein and Theis, 2015); este último hace referencia a las comunidades de microorganismos simbiotes que coexisten con un hospedero y que participan en diversos procesos relacionados con la obtención de nutrientes o la defensa contra patógenos (Hird, 2017).

El término microbioma, fue formalmente propuesto por Joshua Lederberg en 2001, para referirse a “las comunidades biológicas de microorganismos simbiotes que ocupan un espacio físico sobre el cuerpo de un hospedero” (Peterson et al., 2009). Sin embargo, este término fue propuesto de manera informal en 1986 por Hegstrand & Hine, cuando analizaron el efecto de los microorganismos sobre los niveles de histamina en el hipotálamo de ratones libres de microorganismos, comprobaron que los niveles de esta molécula eran mayores en ratones convencionales en comparación con los ratones libres de microorganismos (Hegstrand and Hine, 1986; Prescott, 2017).

En la actualidad el estudio del microbioma tiene como objetivo principal comprender la función de las comunidades de microorganismos simbiotes y como están compuestas estas comunidades. Al día de hoy, se han identificado diversas funciones en las que el microbioma participa y que pueden ser vitales para la supervivencia de los hospederos, estas pueden ir desde la adquisición de nutrientes, la protección contra patógenos, el entrenamiento del sistema inmune, el correcto desarrollo y mantenimiento de algunos tejidos. Algunos ejemplos específicos son:

- Adquisición de nutrientes mediante la síntesis de vitaminas o producción de ácidos grasos de cadena corta (ej. Bacterias del microbioma intestinal (Rowland et al., 2018)); Síntesis de complejos enzimáticos para la degradación de polisacáridos (ej. Celulosomas en el intestino de rumiantes (Bayer et al., 2004; Stewart et al., 2018)); Captura y transporte de fosforo (ej. Micorrizas (van der Heijden et al., 2016; Vandenkoornhuyse et al., 2015)).
- Protección contra patógenos, mediada por la síntesis de moléculas con actividad antifúngica o antibacteriana como el caso de la violaceína que inhibe al hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Li et al., 2015; Vandenkoornhuyse et al., 2015; Woodhams et al., 2016). Otro ejemplo es el de la protección que brinda la microbiota intestinal de los abejorros *Bombus terrestris* contra el parásito intestinal *Chitridia bombi* (Koch y Schmid-Hempel., 2011), ejemplo similar al de la microbiota intestinal de *Anopheles gambiae* contra el parásito *Plasmodium falciparum* (Dong et al., 2009). En plantas existe ejemplos que demuestran que la microbiota induce las respuesta sistémica inducida (ISR) mediadas por moléculas como jasmonato y etileno (Bakker et al., 2013; Berendsen et al., 2012; Pieterse et al., 2014) .
- Mantenimiento de la integridad de ciertos tejidos principalmente en el sistema digestivo mediante la síntesis de ácidos grasos de cadena corta (ej. Bifidobacterias y lactobacilos de la microbiota intestinal (Li et al., 2017)).

Las comunidades de microorganismos que forman parte del microbioma están compuestas por: bacterias, arqueas, hongos y eucariotas unicelulares además de partículas virales. Sin embargo, la abundancia de estas varía de manera importante, ya que se estima que en el microbioma humano y en condiciones normales el 99% de las células que forman parte del microbioma corresponden a la porción bacteriana mientras que el 1% restante lo comparten organismos como los hongos, arqueas y virus; que en conjunto han sido denominados como la biosfera rara (Huffnagle and Noverr, 2013; Qin et al., 2010; Virgin, 2014).

Por otra parte los estudios que han analizado el microbioma humano, permiten generar estimaciones que indican que la abundancia de células microbianas tienen una relación 1:1

con las células del cuerpo humano (Sender et al., 2016), mientras que el contenido genético del microbioma es cerca de 100 veces mayor al del genoma humano (Qin et al., 2010; Stewart et al., 2018). Si bien la función de la porción bacteriana del microbioma ha sido ampliamente descrita, se conoce muy poco sobre la función biológica y la composición taxonómica de la biosfera rara que forma parte del microbioma.

Por lo general se conoce muy poco sobre la función biológica y la composición taxonómica de las comunidades de hongos en el microbioma de animales. Sin embargo, estudios realizados en humanos y animales domésticos sugieren que los hongos pueden influir en la salud de sus hospederos (Meason-Smith et al., 2015). Se ha observado que principalmente los hongos pueden aumentar en abundancia ocasionalmente y pasar de ocupar el 1% al 28% de la abundancia total del microbioma. Este aumento en la frecuencia poblacional de los hongos generalmente es consecuencia de un evento de disbiosis que puede provocar diversas complicaciones para el hospedero (Jia et al., 2018; Jousset et al., 2017). Ejemplo de esto son ciertas micosis provocadas por hongos de los géneros *Candida* o *Malassezia*. Algunos trabajos demuestran que estos hongos están presentes en baja abundancia de manera normal en el microbioma cutáneo de individuos sanos, y como consecuencia de un desbalance en el microbioma de la piel provocan diversas patologías consecuencia de un aumento en la densidad poblacional de estos hongos (Cassone et al., 2003; Huffnagle and Noverr, 2013).

Los estudios que se han realizado sobre el microbioma de animales no humanos, se han llevado a cabo analizando ejemplares que por lo general se encuentran en cautiverio ya sea en zoológicos o en granjas para producción comercial, y analizando mayoritariamente la porción bacteriana del microbioma (Ackerman y Underhill, 2017; Han et al., 2018; He et al., 2018; Meason-Smith et al., 2015; Peterson et al., 2009; Xue et al., 2015; Yildirim et al., 2010). Hird (2017) menciona que el estudio de los microbiomas de animales en vida silvestres es fundamental para entender la historia evolutiva de los organismos debido a las múltiples funciones que las comunidades de microorganismos llevan a cabo y que son vitales para la supervivencia de su hospedero.

Un ejemplo de esto es la especialización observada en el tipo de alimentación de los murciélagos de la familia Phyllostomidae, que presenta diversas estrategias de alimentación existiendo especies insectívoras, frugívoras, nectívoras, carnívoras y sanguívoras. Se ha demostrado que de acuerdo a la estrategia alimenticia el microbioma intestinal de estas especies es distintivo tanto taxonómicamente como funcionalmente (Carrillo-Araujo et al., 2015).

Enfermedades emergentes y quitridiomycosis.

Por otra parte el estudio de los microbiomas y su rol en la protección contra patógenos ha cobrado gran importancia debido a la aparición de enfermedades emergentes que han provocado declives poblacionales en las últimas décadas en grupos de animales de vida libre como: anfibios, murciélagos, serpientes, corales y tortugas, (Fisher et al., 2012; Hill et al., 2017; Kilpatrick et al., 2010; Lemieux-Labonté et al., 2017; Lorch et al., 2016; Zhang et al., 2014). Una enfermedad emergente se define como una enfermedad provocada por un agente infeccioso recientemente identificado, capaz de causar problemas de salud pública a nivel local, regional o mundial (Oromí Durich, 2000). A través de la historia moderna de la medicina los hongos no han sido considerados como posibles agentes causales de enfermedades infecciosas emergentes, ya que su capacidad de dispersión es limitada (Fisher et al., 2012).

Sin embargo, existen diversos ejemplos de enfermedades emergentes provocadas por patógenos fúngicos, como la coccidiosis en América del sur (Fisher et al., 2001), el tizón tardío de la patata en Irlanda, y diversas enfermedades fúngicas en animales en vida silvestre (Fisher et al., 2012). Entre los grupos de animales en vida silvestre afectados por enfermedades fúngicas emergentes se encuentran algunas especies de murciélagos y serpientes que habitan en Norte América (Gargas et al., 2009; Lorch et al., 2016; Zhang et al., 2014).

Los anfibios se consideran como el taxón de tetrápodos más amenazado, ya que cerca del 32.5% de las especies que se conocen estaban clasificadas bajo un estatus de

amenazadas en 2010 según la IUCN Red List (Heard et al., 2011; Stuart et al., 2004). Se reconoce que una de las causas más importantes relacionada con los declives poblacionales registrados en diversas especies de anfibios alrededor del mundo es la quitridiomycosis; esta enfermedad es provocada por los hongos *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) y *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal) (Martel et al., 2013).

Taxonómicamente el género *Batrachochytrium* pertenece al filo Chytridiomycota y al orden de los Rhyzophydiales; estos hongos se caracterizan por presentar una espora flagelada y móvil conocida como zoospora. La mayoría de los Rhyzophydiales tienen un estilo de vida saprobio creciendo generalmente sobre polen, queratina, celulosa y quitina. Algunos otros hongos pertenecientes a este orden son parásitos principalmente de plantas y algas, mientras que los únicos capaces de parasitar vertebrados pertenecen al género *Batrachochytrium* (McLaughlin y Spatafora, 2002). Bd y Bsal son las únicas dos especies de este género, sin embargo, existe una gran diversidad de cepas divididas en linajes de acuerdo a su origen geográfico (Martel et al., 2014; O'Hanlon et al., 2018).

De manera general la quitridiomycosis se caracteriza por causar lesiones en la piel provocando reacciones como la hiperqueratosis (engrosamiento de la piel), además de otros signos como letargo, anorexia, pérdida de la capacidad de respuesta, y en algunos casos la auto amputación de la cola en anfibios post-metamórficos y adultos. En anfibios que se encuentran en estadios larvarios se observa letargo lo que interfiere con la capacidad de forrajeo de las larvas (Martel et al., 2013; Van Rooij et al., 2015). La mortalidad de esta enfermedad es consecuencia de las alteraciones fisiológicas como la hiperplasia de la epidermis ya que se alteran funciones como la osmorregulación y el intercambio de gases (Berger et al., 1998). En cuanto a la epidemiología de estos dos patógenos se sabe que Bd es capaz de infectar a especies pertenecientes a los tres órdenes de anfibios que se conocen (Kilpatrick et al., 2010), mientras que Bsal solo infecta a anfibios del orden caudata y está restringido a Europa y Asia (Martel et al., 2014).

Por otra parte se sabe que el proceso infeccioso de Bd implica un reconocimiento mediado por quimiotaxis hacia ciertas moléculas presentes en la capa mucosa de la piel de

los anfibios y una posterior invasión de la epidermis específicamente en zonas ricas en queratina (Garmyn et al., 2012; Van Rooij et al., 2015). La invasión de la epidermis comienza cuando la zoospora se enquistada y reabsorbe el flagelo. Posteriormente el patógeno penetra hasta el estrato granuloso de la epidermis y madura en el estrato córneo hasta formar una estructura llamada zoosporangio que contiene zoosporas. Al madurar, estas son liberadas para que el ciclo infeccioso comience una vez más (Berger et al., 1998; Rollins-Smith et al., 2011; Van Rooij et al., 2015).

México está clasificado como el séptimo país con la mayor diversidad de anfibios en el mundo con cerca de 390 especies (Amphibianweb, 2019). Después de los Estados Unidos de América, tiene la mayor diversidad mundial de especies de salamandras, contando con la presencia de grupos de salamandras únicos para la ecozona Neotropical como lo son las salamandras cavernícolas que pertenecen a géneros como: *Nyctanolis*, *Chiropterotriton*, *Aquiloemyza* e *Ixalotriton* (Barrio-Amoros, 2016; Luna-Reyes et al.; Parra-Olea, 2003; Rovito & Parra-Olea, 2015) y para los cuales se han registrado declives poblacionales que coinciden con la presencia de Bd en localidades donde estos anfibios habitan (Cheng et al., 2011; Rovito et al., 2009).

Antecedentes.

Microbioma cutáneo de anfibios.

El estudio del microbioma de anfibios ha cobrado gran importancia en los últimos años debido a que se ha demostrado que las comunidades de microorganismos principalmente las bacterias que habitan sobre la piel son capaces de inhibir el crecimiento de los patógenos fúngicos que provocan la quitridiomycosis (Kilpatrick et al., 2010; Woodhams et al., 2016). Se reconoce que las relaciones entre un hospedero y el microbioma están influenciadas por distintas variables como la filogenia, el genotipo, el comportamiento e historia de vida del hospedero (Ding and Schloss, 2014). Además de estos factores intrínsecos del hospedero también se ha caracterizado el efecto de factores abióticos sobre la composición del microbioma (Bird et al., 2018; Bletz et al., 2017a)

El efecto de la filogenia y el genotipo del hospedero sobre la composición del microbioma cutáneo se ha estudiado en la salamandra *Ensatina eschscholtzii*, que evolutivamente es considerada como una especie anillo, ya que dentro de su rango de distribución (Canadá al norte de Baja California) las poblaciones fueron aisladas por un valle en la región central de California y posteriormente se reencuentran al suroeste de California. Dentro de este rango de distribución se conocen doce grupos genéticos agrupados en siete subespecies (Kuchta et al., 2009). Bird et al (2018) analizaron el microbioma cutáneo de diez de los doce grupos genéticos de *E. eschscholtzii* y no encontraron diferencias en cuanto a la composición del microbioma entre los grupos genéticos analizados siendo *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Chlamydia*, y *Xantomonas* los géneros bacterianos más abundantes en todas las muestras. Concluyeron que el genotipo no tiene un efecto considerable sobre la composición del microbioma cutáneo. Un estudio donde se analizó la composición del microbioma de las especies de ranas *Proceratophrys boiei*, *Dendropsophus minutus*, *Aplastodiscus leucopygius* y *Phyllomedusa distincta*, demostró que, aunque estas se encuentren viviendo en simpatria la composición del microbioma varía entre especies; sin embargo, cuando se analiza la composición entre poblaciones de la misma especie el microbioma es similar (Assis et al., 2017). Estos

resultados indican que, a niveles filogenéticos poco profundos (entre poblaciones de la misma especie), no se espera encontrar diferencias en el microbioma debido a estructura poblacional o grupos genéticos.

En cuanto a la influencia de la historia de vida sobre la composición del microbioma Kueneman et al (2014) analizaron la composición del microbioma durante las distintas etapas del ciclo de vida de *Rana cascadae*. Observaron que mientras que la composición del microbioma entre adultos y sub-adultos era similar, el microbioma de los renacuajos tenía una composición diferente presentado una mayor abundancia de Proteobacterias en estadios larvarios y una menor abundancia de hongos (Kueneman et al., 2014). Este mismo patrón fue observado en ejemplares de *Anaxyrus boreas* (Kueneman et al., 2016), y se propone el cambio en la composición del microbioma de anfibios pre y post metamórficos se explica debido al cambio del estilo de vida ya que los renacuajos son exclusivamente acuáticos y al completar la metamorfosis entran en contacto con hábitats terrestres, lo que representa un reservorio diferente para el microbioma.

Se considera que los microorganismos presentes en el ambiente son el reservorio principal del microbioma cutáneo (Fitzpatrick and Allison, 2014; Loudon et al., 2014a), y se ha observado que los microorganismos que habitan sobre la piel de los anfibios también están presentes en muestras ambientales. Sin embargo, la abundancia de estos varía ya que microorganismos presentes en baja abundancia en el ambiente se encuentran en mayor abundancia sobre la piel de los anfibios (Walke et al., 2014). Por otra parte, la ecología del hospedero tiene un efecto sumamente importante, ya que de acuerdo con el hábitat que el hospedero ocupe estará expuesto a distintos reservorios de microorganismos. En este sentido se ha demostrado que en ranas que habitan en ambientes acuáticos, terrestres y arborícolas existe la presencia de bacterias únicas para cada hábitat (Bletz et al., 2017a; Ellison et al., 2018).

Con respecto al efecto del cautiverio sobre la diversidad del microbioma, Loudon et al (2014) hacen mención sobre la importancia de los microorganismos en el ambiente como reservorio del microbioma cutáneo. Demuestra que después de mantener a especímenes

de *Plethodon cinereus* en cautiverio durante varias semanas y exponer un grupo experimental a muestras de sustrato del sitio donde las salamandras fueron colectadas y al compararlas con los controles que no estaban expuestas a dicho sustrato, ocho especies bacterianas estaban presentes en ambos grupos en todos los tiempos de muestreo. Eso indica que ciertos microorganismos son mantenidos por su hospedero a través del tiempo. De manera similar se observó que la diversidad entre especímenes de *Atelopus zeteki* colectados en campo e individuos pertenecientes a una F1 que nació en cautiverio compartían al menos el 70% de la diversidad bacteriana del microbioma, por lo que concluyen que el efecto del cautiverio puede no ser tan drástico en el microbioma de estas ranas ya que existe transmisión vertical del microbioma cutáneo en estas especies (Becker et al., 2014).

En resumen, sabemos que tanto factores biológicos y ambientales como pueden ser la filogenia, el hábitat, el genotipo y la historia de vida del hospedero influyen sobre la composición del microbioma, cada uno en diferente medida. Por lo que, es importante detectar cuál es la influencia de cada uno de estos factores sobre la composición del microbioma para entender mejor la ecología de las interacciones entre los anfibios y su microbioma.

[Resistencia a la quitridiomycosis mediada por el microbioma.](#)

Se ha demostrado que diversos compuestos antifúngicos producidos por bacterias que forman parte del microbioma cutáneo de diversas especies de anfibios son capaces de inhibir el crecimiento de zoosporas de Bd, tanto en ensayos *in vitro* como en ensayos donde se realizaron infecciones experimentales. Hasta la fecha se han identificado y caracterizado cinco compuestos sintetizados por bacterias del microbioma cutáneo de diversas especies de anfibios, estos son: violaceina (Brucker et al., 2008a), indol-3-carboxialdehído (I3C) (Brucker et al., 2008a), 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG) (Brucker et al., 2008b), triptofol (Loudon et al., 2014b) y prodigiosina (Woodhams et al., 2018). La violaceina y el I3C son producidos por distintas cepas de *Janthinobacterium lividum*, el 2,4-DAPG fue identificado

en sobrenadantes de la bacteria *Lysobacter gummosus*, la prodigiosina es sintetizada por distintas cepas de *Serratia marcescens*, mientras que el triptofol es un metabolito producido únicamente en cocultivos de *Bacillus sp.* y *Chitinophaga arvensicola*.

Adicionalmente se sabe que estas mismas cepas son capaces de sintetizar compuestos volátiles que también tienen un efecto negativo sobre la sobrevivencia de las zoosporas en los ensayos realizados. Sin embargo, estas moléculas aún no se han caracterizado (Woodhams et al., 2018). Recientemente Kearns et al., (2017) demostraron que diversos hongos aislados de la piel de ejemplares de ranas del género *Dendrobates* en cautiverio eran capaces de inhibir el crecimiento de Bd, y en contraparte también observaron que algunos otros aislados de los mismos individuos tenían un efecto positivo sobre el crecimiento de zoosporas de Bd.

Si bien la habilidad de ciertas cepas de bacterias aisladas de un amplio rango de anfibios se ha probado, también se ha demostrado que esta habilidad de inhibir a los patógenos fúngicos se ve afectada por la cepa de Bd contra la que se realizan los ensayos de inhibición. Un ejemplo de esto es el estudio realizado por Antwis et al. (2015) en donde aislaron bacterias de la piel de las ranas *Agalychnis moreletii* y *A. callidryas* y probaron estos aislados contra dos cepas del linaje hipervirulento de Bd (SFBC014 y AUL1.2). En total analizaron la capacidad inhibitoria de 56 aislados y observaron que seis de los aislados eran capaces de inhibir la cepa AUL1.2, cuatro a la cepa SFBC014 y tres aislados inhibían a las dos cepas. En cuanto a la diversidad taxonómica de estos aislados pertenecen a los géneros *Serratia*, *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Lysobacter* y *Chryseobacterium* (Antwis et al., 2015).

Estrategias de estudio del microbioma.

El estudio de las comunidades de microorganismos se puede dividir en dos grupos de acuerdo con las estrategias empeladas para su análisis, estas pueden ser: dependientes o independientes de cultivos. Las estrategias dependientes de cultivo se basan en la obtención de cultivos axénicos con el fin analizar las funciones de los microorganismos de

manera independiente, o en consorcios definidos. Por otra parte, las estrategias independientes de cultivos permiten el análisis de comunidades de microorganismos que por lo general provienen de muestras ambientales, en donde la diversidad de microorganismos presentes en la muestra es elevada, y la gran parte de estos no pueden ser aislados ya sea por su baja abundancia o por requerimientos nutricionales específicos que no se pueden replicar en un medio de cultivo. Para caracterizar estos microorganismos, se hace uso de diversas estrategias de secuenciación ya sea mediante amplicones o secuenciación shotgun (Abreu and Taga., 2016).

La estrategia general de los estudios independientes de cultivos mediante la secuenciación de amplicones, se basa en la obtención de muestras ambientales y la posterior obtención del material genético de las muestras con el fin de generar amplicones de genes usados como marcadores taxonómicos. Posteriormente se realiza una clasificación taxonómica de las unidades taxonómicas operativas (OTU) usando bases de datos especializadas como Greengenes para 16S (DeSantis et al., 2006) o UNITE para ITS (Kõljalg et al., 2005; Nilsson et al., 2018). Por último se realizan análisis de diversidad alfa y beta con el fin de identificar patrones y correlaciones entre variables asociadas al tipo de muestra y el microbioma (Goodrich et al., 2014; Hird., 2017).

Una unidad taxonómica operativa (OTU), es el termino empleado para referirse a la agrupación de amplicones con cierto porcentaje de similitud en sus secuencias, generalmente del 97% (White et al., 2010). De manera general los programas que se emplean para llevar a cabo la agrupación de amplicones emplean tres estrategias diferentes que son (Halwachs et al., 2017):

- Agrupación por referencia cerrada: Aquí se calcula para cada secuencia el mejor alineamiento pareado contra una base de datos predefinida (ejemplo Greengenes en el caso de 16S) y las secuencias con el mismo alineamiento son agrupadas como un mismo OTU.

- Agrupación *de novo*: Esta estrategia se basa en la agrupación mediante la asignación de una distancia predefinida (comúnmente 3%), posteriormente se genera una secuencia representativa del agrupamiento y esta es clasificada taxonómicamente.
- Agrupación por referencia abierta: Este tipo de asignación es una combinación de las dos estrategias anteriores, primero las secuencias se agrupan mediante alineamientos pareados y posteriormente todas las secuencias que no fueron asignadas a un OTU se agrupan mediante una distancia predefinida.

Los amplicones que han sido usados para analizar las comunidades de hongos del microbioma son generalmente los productos de la amplificación de las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS) de los genes ribosomales o de la subunidad menor ribosomal 18S. Existen dos regiones espaciadoras que pueden ser amplificadas usando primers específicos estas son: la región ITS1 de aproximadamente 300 pares de bases que se ubica entre la subunidad menor ribosomal 18S y la 5.8S, mientras que la región ITS2 se ubica entre la región 5.8S y la subunidad mayor ribosomal 28S y tiene una longitud de aproximadamente 400 pares de bases (Halwachs et al., 2017).

Si bien no existe un consenso en cuanto a que marcador taxonómico debe ser usado para caracterizar las comunidades fúngicas del microbioma, se sabe que las regiones espaciadoras ITS1 e ITS2 son las que permiten obtener mejor definición taxonómica. Al comparar los OTU generados la generación de clusters con una similitud que iba del 90% al 100% Balaalid et al (2013), no encontraron diferencias significativas entre en número de OTU generados por los amplicones del ITS1 contra el ITS2 y mencionan que los resultados al seleccionar uno u otro marcador serán similares (Balaalid et al., 2013).

Los análisis de diversidad que se realizan tienen el fin de identificar cual es la diversidad alfa y beta de las muestras haciendo uso de distintos índices de diversidad. La diversidad alfa, se refiere al número total de OTU identificados ya sea en un individuo o en una especie; mientras que los análisis de diversidad beta cumplen la función de comparar las especies presentes entre cada una de las muestras lo que permite la identificación de OTU únicos en

cada muestra (Goodrich et al., 2014). Entre las métricas que se usan para analizar la diversidad alfa en este tipo de estudios las más usadas han sido (Caporaso et al., 2010):

- Índice de diversidad de Shannon: Es una manera cuantitativa de describir la riqueza o el número de especies en una comunidad, se consideran tanto la cantidad de especies en un sitio y el número de individuos por especie (abundancia). Este índice calcula un valor que por lo general va de 0 a 5 y valores por debajo de 2 se consideran como baja diversidad mientras que valores por encima de 3 se consideran como alta diversidad.
- El número de OTU observados: Se generan curvas de acumulación de especies lo que nos permite conocer cuántos OTU están presentes en cada muestra.
- Diversidad filogenética: Es una medida que incorpora las distancias de las ramas de todos los miembros de una muestra en una cladograma.
- Índice de equitatividad de Pielou: Este índice calcula que tan equitativas se encuentran los individuos de cada especie en una comunidad, es decir compara la abundancia de cada una de las especies y va de 0 a 0.1 donde un valor de 0.1 indica que todas las especies son igualmente abundantes en un sitio.

En cuanto a las métricas de la diversidad beta se han empleado (Caporaso et al., 2010):

- Distancia de Jaccard: Se calcula la disimilitud entre dos conjuntos tomando en cuenta el número de especies del conjunto A, el número de especies del conjunto B, y el número de especies presentes en ambos conjuntos, y se calcula un valor que va de 0 a 1 donde 0 indica que ambos conjuntos no presentan especies en común.
- Distancia Bray-Curtis: A diferencia del índice de Jaccard que solo considera presencia y ausencia de especies, el índice de Bray-Curtis calcula una diferencia entre las abundancias de las especies en dos sitios distintos. Se calcula un valor de 0 a 1 en donde 0 indica que los dos sitios tienen la misma composición de especies y 1 indica que los dos sitios no comparten especies.
- Distancia UniFrac: Son medidas cuantitativas (weighted) y cualitativas (unweighted) de disimilitud entre las muestras que incorporan relaciones filogenéticas que se

calculan matrices de distancia usando datos de presencia y abundancia de OTU en cada una de las muestras.

Adicionalmente se realizan análisis multivariados para identificar correlaciones entre diversas variables ambientales y biológicas y la composición observada del microbioma, o conocer qué porcentaje de la variación observada entre las muestras es explicada por distintas variables como: la especie del hospedero, su estilo de vida, el microhábitat que ocupan (Xia y Sun., 2017).

Los análisis de diversidad cumplen la función de describir las diferencias que existen en cuanto a la composición del microbioma entre cada uno de los individuos, y entre estos y el hábitat. Debido al hecho de que las comunidades de microorganismos presentes en el microbioma cutáneo de los anfibios provienen generalmente del ambiente en el que estos viven, es importante describir la diversidad del hábitat de estas especies de salamandras.

Hábitat cavernícola.

Las cuevas como hábitat tienen características ambientales muy diferentes a la región en la que estas se ubican; generalmente el clima dentro de las cuevas es más frío durante el verano y más cálido durante el invierno comparado con el ambiente externo. Además, el clima dentro de las cuevas varía muy poco durante el año. Otra característica particular de estos hábitat es la oscuridad constante, que tiene un impacto sobre algunas características morfológicas y fisiológicas de los animales que habitan dentro de las cuevas como pueden ser la pérdida de pigmentación y la degeneración de los órganos visuales (Culver., 2005). Adicionalmente, se sabe que los hongos responden de manera específica a los estímulos luminosos y estos tienen un efecto directo sobre diversas respuestas metabólicas relacionadas con la esporulación, pigmentación y trofismos (Schumacher., 2017; Tisch and Schmoll., 2010).

En cuanto a la disponibilidad de alimento dentro de las cuevas estas se pueden clasificar como: cuevas de escasez general de alimento, cuevas de aporte periódico de

alimento y cuevas con escasez irregular de alimento. La escasez general de alimento es el caso para la mayoría de las cuevas donde existe un aporte bajo pero continuo de alimento, debido al arrastre de materia orgánica hacia el interior de las cuevas. El aporte periódico de alimento hace referencia a los casos en donde ciertas cuevas se inundan durante ciertas épocas del año, o por la visita de animales que durante cierto periodo de tiempo usan como refugio las cuevas. Por último los casos de cuevas con escasez irregular de alimento son aquellas en las que el alimento presente no está disponible ya sea porque es difícil de encontrar o porque no pudo ser aprovechado por todos los animales dentro de la cueva (Culver., 2005; Gorički et al., 2012).

Los animales que habitan dentro de las cuevas son conocidos como trogloditas y de acuerdo con el estilo de vida que presentan pueden ser clasificados como troglobiontes (pasan toda su vida dentro de las cuevas) o troglafilios (pasan solo una parte de su vida dentro de las cuevas) o estigobiontes (habitan en aguas subterráneas) (Culver., 2005). La fauna que se puede encontrar dentro de las cuevas es dominada por troglobiontes invertebrados; solo en Estados Unidos se tienen registros de 109 familias de invertebrados que suman 1106 especies pertenecientes a las clases Turbellaria, Oligochaeta, Mollusca, Arachnida, Hexapoda e Insecta, además de las clases Maxillopoda y Malacostraca pertenecientes al subfilo Crustace. Entre los vertebrados se pueden encontrar animales de las clases Osteichthyes, Amphiba, Reptilia, Aves y Mammalia, siendo los peces (Osteichthyes) y los anfibios (Amphibia) los más comunes en estos hábitats (Culver., 2005).

Con respecto a la diversidad de microorganismos que se pueden encontrar dentro de cuevas se sabe que las Actinobacterias y la Proteobacterias son las más abundantes (Cheeptham., 2013; Engel et al., 2004; Zhou et al., 2007). Por otra parte se han identificado cerca de 1029 especies de hongos pertenecientes a 518 géneros, siendo el género Ascomycota el más abundante (68%), seguido por Basidiomycota (20%), Zygomycota (6.6%), Mycetoza (2.6%), Chytridiomycota y otros (0.8%) (Vanderwolf et al., 2013). Sin embargo, no existe un consenso en cuanto a la diversidad fúngica que se puede encontrar ya que se ha observado que esta varía de acuerdo al tipo de cueva que se analiza, a la

localidad, o al sustrato que se analiza (Man et al., 2015; Pusz et al., 2017, 2018; Vanderwolf et al., 2013, 2016; Wang et al., 2011).

Los dos hongos más estudiados en este tipo de ambientes son *Histoplasma spp* y *Geomyces destructans*, debido a las enfermedades que provocan. *Geomyces destructans* es un patógeno que provoca el síndrome de la nariz blanca, al que se atribuyen los declives en poblaciones de murciélagos en Canadá y Estados Unidos (Gargas et al., 2009; Zhang et al., 2014). La histoplasmosis en el caso de *Histoplasma* que afecta a carnívoros, equinos y humanos (Kauffman., 2007; Vanderwolf et al., 2013). Rimer y Briggler en 2010 analizaron anfibios en una cueva del sur de Missouri, y los resultados muestran que 11 de 35 muestras analizadas estaban infectadas con Bd, y también reportaron que las ranas capturadas durante los muestreos estaban infectadas con mayor frecuencia a comparación de las salamandras. Este es el único reporte publicado de la presencia de *Batrachocytrium* en cuevas (Rimer y Briggler., 2010). A pesar de los reportes de diversos hongos relacionados con el surgimiento de enfermedades emergentes que infectan a animales cavernícolas, se sabe muy poco de la ecología de estos patógenos dentro de las cuevas y en general se sabe muy poco sobre la diversidad de hongos que forman parte del microbioma de animales con un estilo de vida cavernícola.

[Salamandras cavernícolas.](#)

En el caso de los anfibios del orden Caudata (salamandras) que es el que cuenta con más representantes trogloditas, estos habitan generalmente en la ecozona Palearctica y Neártica y pertenecen a las familias Proteidae y Plethodontidae. Uno de los casos más estudiados de salamandras troglobiontes es el de *Proteus anguinus*, que tiene un alto grado de adaptación al ambiente cavernícola, ya que no presenta pigmentación y ha perdido los ojos en su totalidad, además de estar adaptada a periodos de inanición prolongados (Hervant et al., 2001).

Los plethodontidos están ampliamente distribuidos en Norte y Centro América, además de encontrarse también en algunas regiones de América del Sur, Europa meridional

y en la península de Corea. Esta familia de salamandras cuenta con nueve especies consideradas como troglobíticas y otras tantas especies consideradas como troglófilas o estigobiontes (Gorički et al., 2012). Las salamandras de esta familia tienen la característica de ser de talla pequeña (de 2 a 15 cm) y, presentan fertilización interna. La característica principal de estas salamandras es la falta de pulmones, lo que implica que la respiración se realiza a través de la piel (Parra-Olea et al., 2014). Existen tanto especies acuáticas y terrestres, aquellas salamandras que viven en la zona Neotropical son terrestres y pueden ocupar distintos hábitats que pueden ser: bajo troncos o rocas, habitar en bromelias, ocupar grietas en el suelo, e incluso habitar en cuevas lo que no es habitual en la mayoría de las especies que habitan en la ecozona Neotropical.

En México los pleodontidos son la familia de salamandras más diversa con un total de 127 especies (AmphibanWeb. 2018) y existen reportes de diversas especies consideradas como troglófilas pertenecientes a los géneros *Nycatnolis*, *Ixalotriton*, *Aquiloerycea* y *Chiropterotriton* (Luna-Reyes et al.; Parra-Olea., 2003; Rovito y Parra-Olea., 2015). Se considera que *C. magnipes* es la única especie de salamandra troglobítica en la ecozona Neotropical ya que nunca se ha encontrado fuera de cuevas, a diferencia de otras especies como *C. multidentatus*, *C. infernalis*, o *C. cieloensis* que han sido encontradas tanto dentro de cuevas como ocupando hábitats arborícolas o terrestres (Darda., 1994).

Justificación.

La mayoría de los estudios que se han realizado en donde se analiza el microbioma cutáneo de anfibios se ha enfocado únicamente en estudiar las comunidades bacterianas del microbioma, mientras que los hongos han sido dejados de lado. Debido a que los hongos forman parte de las comunidades de microorganismos que conforman el microbioma, es necesario conocer que hongos forman parte de estas comunidades simbióticas y cuál es la función que estos desempeñan cuando interactúan con su hospedero y otros microorganismos con los que coexisten sobre la piel. Por esto, una caracterización a nivel taxonómico es el paso inicial para explorar de mejor manera las comunidades fúngicas del microbioma cutáneo.

Se ha demostrado que existen interacciones tanto positivas como negativas entre el componente fúngico y el bacteriano del microbioma cutáneo, y estas interacciones se relacionan con la capacidad de inhibir el crecimiento de *Bd*. Por lo que es necesario caracterizar las comunidades fúngicas de la misma manera en la que se han caracterizado las comunidades bacterianas del microbioma cutáneo (Kueneman et al., 2016). El primer paso para esto es generar un catálogo de la diversidad fúngica del microbioma en especies de anfibios, especialmente en grupos que se encuentren amenazados como lo son las salamandras cavernícolas de México. Estas salamandras representan un ecomorfotipo único para la ecozona Neotropical y han presentado declives poblacionales que coinciden con la llegada de *Bd* al país (Cheng et al., 2011; Rovito et al., 2009). Una caracterización completa del microbioma cutáneo permitiría generar estrategias de conservación adecuadas haciendo uso del microbioma fúngico y bacteriano mediante el aprovechamiento de su capacidad para inhibir el crecimiento de los patógenos fúngicos (Bletz et al., 2013; Kearns et al., 2017).

Adicionalmente verificar la presencia de *Bd* en la piel de las salamandras cavernícolas es sumamente importante ya que permitirá generar acciones dirigidas en un futuro para combatir al patógeno si es que este está presente. De la misma manera este

trabajo ayudara a identificar otros hongos del filo Chytridiomycota que pudieran ser potenciales patógenos.

Objetivo

Caracterizar la porción fúngica del microbioma cutáneo de nueve especies de salamandras cavernícolas de México y determinar el efecto de variables tanto biológicas como ambientales sobre la diversidad del componente fúngico del microbioma.

Objetivos específicos.

Generar un catálogo de la diversidad taxonómica de la porción fúngica del microbioma cutáneo de nueve especies de salamandras cavernícolas.

Verificar la presencia de hongos del filo Chytridiomycota en el microbioma cutáneo de estas especies.

Identificar si existe un núcleo compartido en el microbioma fúngico entre individuos de la misma especie.

Determinar si variables como la especie del hospedero, la localidad geográfica, o el tipo de hábitat se correlaciona con un cambio en la composición del microbioma cutáneo.

Hipótesis.

Hipótesis alternativa 1: La composición del microbioma cutáneo difiere entre especies de hospederos.

Hipótesis nula 1: La composición del microbioma cutáneo no se ve influenciada por la identidad del hospedero.

Hipótesis alternativa 2: Tanto la localidad de muestreo como el origen de la muestra (dentro o fuera de la cueva) tiene un efecto sobre la diversidad observada de las comunidades fúngicas de la piel de los anfibios.

Hipótesis nula 2: Los factores ambientales como la localidad de muestreo y el origen de la muestra no tienen efecto sobre la diversidad de las comunidades fúngicas de la piel de los anfibios.

Hipótesis alternativa 3: La composición del microbioma fúngico cutáneo difiere entre hospedero con y sin presencia de Bd.

Hipótesis nula 3: No existen diferencias en la composición del microbioma fúngico cutáneo entre hospederos con y sin presencia de Bd.

Hipótesis alternativa 4: Existe un núcleo del microbioma fúngico específico para cada una de las especies.

Hipótesis nula 4: No existe un núcleo del microbioma fúngico que se comparta entre individuos de la misma especie.

Métodos.

Colecta de salamandras y obtención de frotis cutáneos.

Durante los meses de marzo a octubre del 2017, se muestrearon salamandras cavernícolas de nueve especies en 16 localidades ubicadas en seis estados (Chiapas, Querétaro, Hidalgo, San Luis Potosí, Tamaulipas y Nuevo León). Debido a la lejanía de las localidades en Chiapas, Tamaulipas y Nuevo León, esos sitios de muestreo solo fueron visitados una vez, mientras que las localidades en Querétaro, Hidalgo y San Luis Potosí fueron visitadas entre dos y cuatro ocasiones.

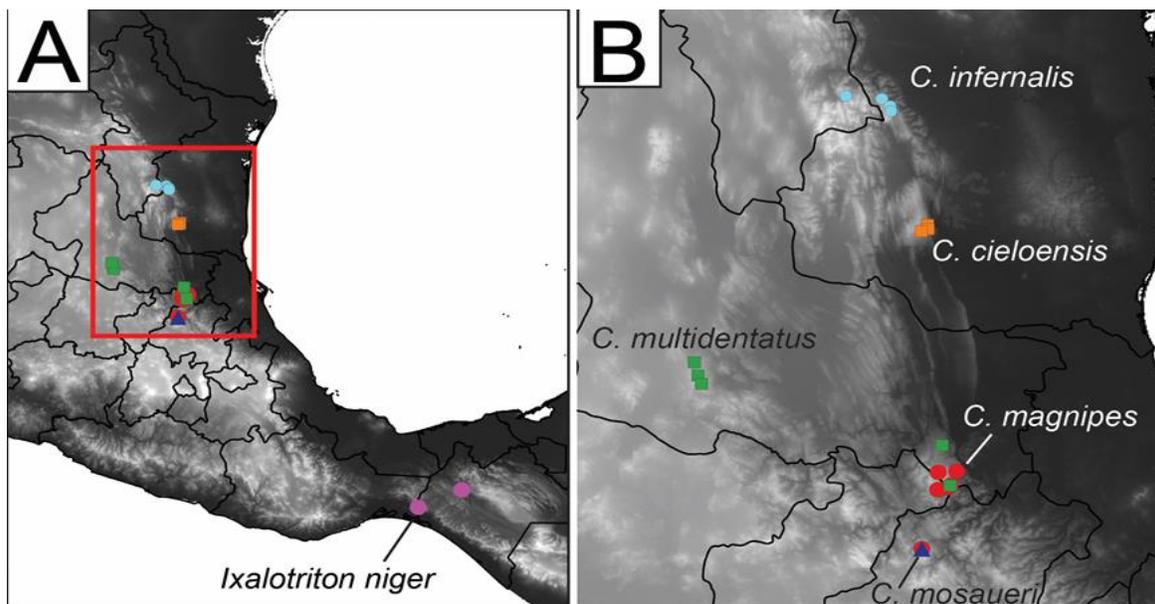


Figura 1. A) Mapa de las especies de salamandras cavernícolas de los géneros *Chiropterotriton* e *Ixalotriton* incluidas en el proyecto. B) Mapa de la localización de las localidades de las especies del género *Chiropterotriton*. Mapa generado por Sean M Rovito.

El muestreo se llevó a cabo mediante la búsqueda de salamandras dentro de cuevas. Estas fueron colectadas usando una bolsa de plástico para cada individuo colectado, posteriormente se realizaron dos lavados con 50 ml de agua estéril y se tomó un frotis cutáneo usando un hisopo sintético estéril que fue pasado 30 segundos por la parte ventral y dorsal de cada ejemplar colectado. Los hisopos fueron almacenados en tubos criogénicos

y colocados en nitrógeno líquido, una vez en el laboratorio se almacenaron a -70° C hasta su posterior uso. Cada salamandra fue manipulada durante el muestreo con un par de guantes de nitrilo que se desechaban después de tomar cada frotis. En total se tomaron 54 frotis de nueve especies de salamandras, además de un frotis de las paredes de las cuevas en donde fueron colectadas las salamandras con el fin de realizar una comparación entre las comunidades fúngicas del microbioma y las del ambiente. En la Tabla 1 se muestra el número de frotis que se tomaron por especie. Adicionalmente se tomaron frotis de la piel de dos especies de ranas que se encontraron dentro de las cuevas durante las colectas. Junto con los frotis de las muestras ambientales, se analizaron un total de 68 muestras.

Tabla 1. Número de muestras del microbioma de salamandras colectados por especie y ambiente donde fueron colectados.

Nombre de la Especie	Número de especímenes dentro de cuevas	Número de especímenes fuera de cuevas
<i>Chiropterotrion magnipes</i>	11	-
<i>C. mosaueri</i>	2	-
<i>C. infernalis</i>	4	2
<i>C. multidentatus</i>	10	6
<i>C. cieloensis</i>	4	-
<i>Ixalotriton niger</i>	2	-
<i>Nyctanolis pernix</i>	1	-
<i>Aquiloeurycea sp.</i>	4	-
<i>A. scandens</i>	3	2
<i>A. galeanae</i>	3	-
Total	44	10

Extracción de DNA y generación de librerías de amplicones.

La extracción de DNA se realizó siguiendo el protocolo descrito por Vo & Jedlicka (2014), con el fin de generar librerías de amplicones de la región ITS1 usando los primers ITS1F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) e ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) que producen un amplicon de aproximadamente 250 pares de bases (Smith y Peay., 2014; Vo y Jedlicka., 2014). La generación de librerías y la secuenciación se llevó a cabo en Argonne National

Laboratory (Illinois, USA). Cada muestra fue amplificada con los primers ITS1F e ITS2 que contenían un código único para cada muestra y posteriormente los amplicones se juntaron en un solo tubo para su posterior secuenciación, el uso de un código único para cada muestra permite la identificación del origen de cada secuencia. La secuenciación se realizó mediante una corrida de Illumina Miseq V3 2x250.

Análisis de los datos de secuenciación.

Los datos generados mediante la secuenciación de las 68 muestras, fueron analizadas usando el programa Qiime2 (Caporaso et al., 2010) que permite un análisis completo (taxonómico y de diversidad) de datos de microbioma. El pipeline de este programa consta de 4 fases: 1) Demultiplexación y control de calidad de los datos de secuenciación. 2) Generación de clusters. 3) Asignación taxonómica a cada uno de los clusters generados. 4) Análisis de diversidad.

Para el control de calidad de las secuencias se usó el plugin de DADA2, un pipeline dentro de Qiime que permite el filtrado por tamaño de los reads tanto sentido como anti sentido, la dereplicación de los reads, la eliminación de quimeras, la unión de los reads sentido con los antisentido si estos sobrelapan en su totalidad y la posterior generación de SVs (Sequence Variants). Los SVs corresponden a los clusters formados por la agrupación de secuencias similares y a diferencia de los OTUs generados por Qiime1, los SVs son agrupaciones generadas por un 100% de similitud de las secuencias mientras que los OTUs por lo general son clusters generados con una similitud del 97% de las secuencias (Callahan et al., 2016, 2017).

Análisis de Diversidad.

Diversidad alfa.

La diversidad alfa, se examinó mediante la generación de curvas de acumulación de OTUs generadas con una profundidad de muestreo de 1,300 secuencias por muestra y 40,000 secuencias por muestra. El valor de 1,300 se seleccionó con el fin de evitar la menor pérdida de datos, ya que solo dos muestras generaron menos de 1,300 secuencias; mientras que el valor de 40,000 secuencias por muestra correspondía a la media de los valores de las secuencias generadas por las 68 muestras.

Adicionalmente se analizaron los índices de Shannon y de Chao1. El índice de Shannon fue usado con el fin de conocer la biodiversidad especifican en cada una de las especies de salamandras, es decir que especie tiene una mayor riqueza y abundancia de OTU fúngicos sobre su piel, mientras que el índice de Chao1 es un estimado de la diversidad real en las muestras es decir cuántos OTU están presentes. Tanto las curvas de acumulación de especies y las curvas donde se muestran los índices de diversidad Chao1 y Shannon fueron generadas y visualizadas dentro del pipeline de Qiime2 (Caporaso et al., 2010).

Por último, se usó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar grupos de muestras (ej. muestras dentro de cuevas contra muestras fuera de cuevas) con el fin de conocer si los valores calculados difieren entre los grupos. Esta prueba es una versión no paramétrica del ANOVA de una vía y nos permite conocer si existen diferencias significativas entre las medias de las abundancias de OTU entre las muestras. Esta prueba calcula un estadístico de prueba H y un p-valor, un p-valor <0.05 indica que las diferencias entre los grupos son significativas (ej. las muestras tomadas dentro de las cuevas son diferentes a las de fuera de las cuevas).

Diversidad beta.

La diversidad beta, se analizó generando gráficos de Análisis de Componentes Principales (PCA) usando subsets de datos debido a la variabilidad observada. Antes de

realizar estos análisis se eliminaron los OTU presentes en baja frecuencia (menos de cinco secuencias en un individuo) en todas las muestras, y posteriormente se realizó la transformación Hellinger (Borcard et al., 2011), con el fin de lidiar con el efecto del doble cero en matrices de abundancias de especies y reducir el efecto que los OTU en baja abundancia generan sobre la ordenación de los datos. Esta transformación calcula la raíz cuadrada del cociente resultante de la división de cada valor en una matriz de distancias, entre la suma de la fila en la que el valor se encuentra. En este caso los valores corresponden al número de secuencias de cada OTU presentes en un individuo.

$$y'_{ij} = \sqrt{y_{ij} \div y_i}.$$

En la fórmula: j corresponde a una especie u OTU, i corresponde al sitio o la muestra que se analiza, e i . corresponde a la suma de OTU en una muestra (Fazekas y Liese., 1996; Legendre y Gallagher., 2001). Esta transformación asume que el tipo de datos que se desean transformar tiene un formato en donde y_{ij} es la probabilidad de encontrar un individuo j en una muestra i , y corresponde a la abundancia de una especie.. Todos los PCA fueron generados usando el paquete `ampvis2` (Andersen et al., 2018) en R, usando las tablas de frecuencias taxonómicas generadas en el programa `Qiime2` (Caporaso et al., 2010) como input para generar las matrices de distancia.

Adicionalmente se usaron las matrices de distancia generadas para probar el efecto de las variables categóricas (especie, localidad y origen de la muestra) sobre la composición del microbioma cutáneo. Para realizar estas pruebas se generaron distintos subsets de datos para analizar el efecto de cada una de las variables mencionadas. Estos subsets se generaron mediante la extracción de cada una de las muestras y los OTU correspondientes, y después se calculó una matriz de distancia de cada uno de los subsets de datos usando las tablas de OTU generada por el programa `Qiime2`.

En total se generaron siete subsets diferentes: Localidad de *C. magnipes* (El Coni o La Trinidad); Localidad de *C. multidentatus* (Bosque del repetidor, Grieta el 58 o Valle de los Fantasmas); Origen de la muestra (dentro o fuera de cuevas); Tipo de la muestra (ambiental,

anura o caudata); Presencia de Bd (si o no); Tipo de muestra de la localidad El Coni (*C. magnipes*, *C. mosaueri*, *A. sp.*, *Eleutherodactylus cystignathoides* y muestra ambiental).

Usando una prueba de Análisis Permutacional de Varianzas (PERMANOVA) se analizó el efecto de diversas variables sobre la composición del microbioma fúngico. Esta prueba calcula un pseudo estadístico F (pseudo-F), que se refiere al ratio que existe en la varianza entre los grupos y la varianza dentro de los grupos. También se calcula un p-valor y si este es <0.05 indica que las muestras dentro de un grupo son más similares entre ellas cuando se comparan con las muestras de un grupo diferente. El p-valor para cada PERMANOVA se calculó usando 999 permutaciones con el fin de identificar si las similitudes observadas dentro de los grupos de cada set de datos eran estadísticamente significativas. Los análisis de PERMANOVA solo se realizaron para grupos de datos con más de cinco muestras, el resto de los grupos no se analizaron por falta de datos.

Núcleo del micobioma cutáneo.

El núcleo del microbioma se define como la comunidad mínima de microorganismos esencial para el funcionamiento del sistema biológico del que estos forman parte y se puede estudiar tanto a nivel taxonómico como funcional (Li et al., 2013). A nivel taxonómico se considera que existen grupos de linajes microbianos que se comparten entre individuos de la misma especie o sistemas con las mismas características ambientales (Turnbaugh et al., 2009).

Adicionalmente se considera que los microorganismos que forman parte del núcleo del microbioma son aquellos que están presentes en al menos el 95% de los individuos analizados (Turnbaugh et al., 2009). Este valor es ambiguo y depende en muchas ocasiones del número de individuos analizados, por lo que para realizar el análisis de núcleo del microbioma se usaron las mismas especificaciones usadas por (Ainsworth et al., 2015), en donde se fijó un valor de 30% para considerar a un OTU como parte del núcleo del microbioma debido a la baja cantidad de muestras analizadas, y usando el plugin core-features de Qiime2 se realizó el análisis de núcleo de microbioma.

Este análisis se realizó en dos subsets de datos únicamente debido a que para la gran mayoría de las especies que se muestrearon no se obtuvieron más de diez especímenes, por lo que únicamente se analizó el núcleo del microbioma de las especies *C. magnipes* y *C. multidentatus*. De manera general el plugin core-features usa las tablas de frecuencias para analizar si un OTU se encuentra en cierta fracción de las muestras; esta fracción se define con un valor mínimo y máximo que pueden ir del 0% al 100% y hace un conteo cada determinado intervalo. En el caso de ambos sets de datos el valor mínimo se definió como 0.01% y el máximo como 100%, y se estableció que se realizara un submuestreo de los datos cada 2% desde 0.01% hasta 100% para conocer cuantas especies se compartían durante cada submuestreo.

Resultados.

Se obtuvieron un total de 7,957,709 secuencias que fueron procesadas usando los códigos de barras presentes en los primers que se usaron para amplificar la región ITS1 ribosomal con el fin de identificar que secuencias pertenecen a que muestra. En promedio cada una de las 68 muestras secuenciadas presentó un total de 117,025 reads, siendo 319,021 reads el conteo más alto y 195 reads el conteo más bajo, para las muestras CO9 y SalB1 respectivamente (Anexo 1).

Clasificación taxonómica de los OTU fúngicos.

Como uno de los objetivos del trabajo, se planteó la idea de generar un catálogo de la diversidad fúngica del microbioma cutáneo de nueve especies de salamandras cavernícolas, mediante la secuenciación de la región ITS1 y la posterior asignación taxonómica de estas secuencias usando bases de datos especializadas.

Una vez que los reads forward y reverse generados mediante la secuenciación Illumina 2x250 se unieron, se obtuvieron 2,999,421 secuencias que posteriormente fueron agrupadas de 6,903 OTU, los cuales fueron asignados taxonómicamente con un 97% de similitud usando la base de datos UNITE (Unified system for the DNA based fungal species linked to the classification Ver 7.2). De los 6,903 OTU, 78% de ellos (5,382) se clasificaron a nivel de filo, 72% (4,957) a nivel de clase, 69% (4,759) a nivel de orden, 65% (4,479) a nivel de familia, 62.5% (4,320) a nivel de género y 58.2% (4,022 OTU) a nivel de especie.

La frecuencia de cada taxón fúngico a nivel de filo en las muestras, indica que los hongos del filo Basidiomycota presentan una frecuencia relativa de 41.3%, seguido de Ascomycota con una frecuencia de 25.1%. Además, se identificaron hongos pertenecientes a los filios Mortierellomycota (15%), Rozellomycota (0.23%), Mucromycota (0.22%), Olpidiomyctoia (0.07%), Entomophthoromycota (0.06%), Glomeromycota (0.02%), Chytridiomycota (0.01%) y Calcarisporiellomycota (0.003%). El 3.5% de las secuencias fueron clasificadas como no identificadas, es decir que no se pudieron asignar a un filo

especifico, y el 14.2% de las secuencias solo fueron a signadas a nivel de reino lo que indica que en la base de datos no hay secuencias similares a estas (Figuras 2 y 3).

Asignación taxonómica a nivel de filo por especie

	Dentro de cueva												Fuera de cueva	
Ascomycota -	31.6	53.4	30.1	32.3	47.8	55.5	78.8	34.7	38.1	33.3	17.1	13.9	25.5	40.1
Basidiomycota -	30.9	34.9	54.3	65.1	31.3	31.1	17.7	37.7	29.8	52.9	40.4	12.5	65.3	43.9
Mortierellomycota -	34.6	2.2	8.8	0	16.7	9.5	0.5	25.9	23.9	10.8	38.3	66.5	8	2.7
unidentified -	2.8	9	3.8	2.4	3.1	3.5	2.9	1.2	7.8	2.4	3.1	7.1	0.8	13
Mucoromycota -	0.1	0	0.3	0	0.4	0.1	0	0.2	0.4	0.1	0.7	0	0.1	0.3
Rozellomycota -	0	0.2	1.1	0	0.1	0.1	0	0.2	0	0.3	0.2	0	0.2	0.1
Entomophthoromycota -	0	0	1.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chytridiomycota -	0	0	0	0.2	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Olpidiomycota -	0	0.3	0.1	0	0.1	0	0	0	0	0.1	0.1	0	0.1	0
Glomeromycota -	0	0	0	0	0	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0
Calcarisporiellomycota -	0	0	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>A. scandens</i> -	<i>A. sp. nov</i> -	<i>C. cieloensis</i> -	<i>C. decoratus</i> -	<i>C. infernalis</i> -	<i>C. magnipes</i> -	<i>C. mosaurej</i> -	<i>C. multidentatus</i> -	<i>Cave</i> -	<i>E. cystignathoides</i> -	<i>I. niger</i> -	<i>N. pernix</i> -	<i>A. galeane</i> -	<i>C. multidentatus</i> -

Figura 2 Heatmap que muestra la asignación taxonómica a nivel de filo por especie. En los recuadros se indica el porcentaje de secuencias correspondientes a cada filo fúngico.

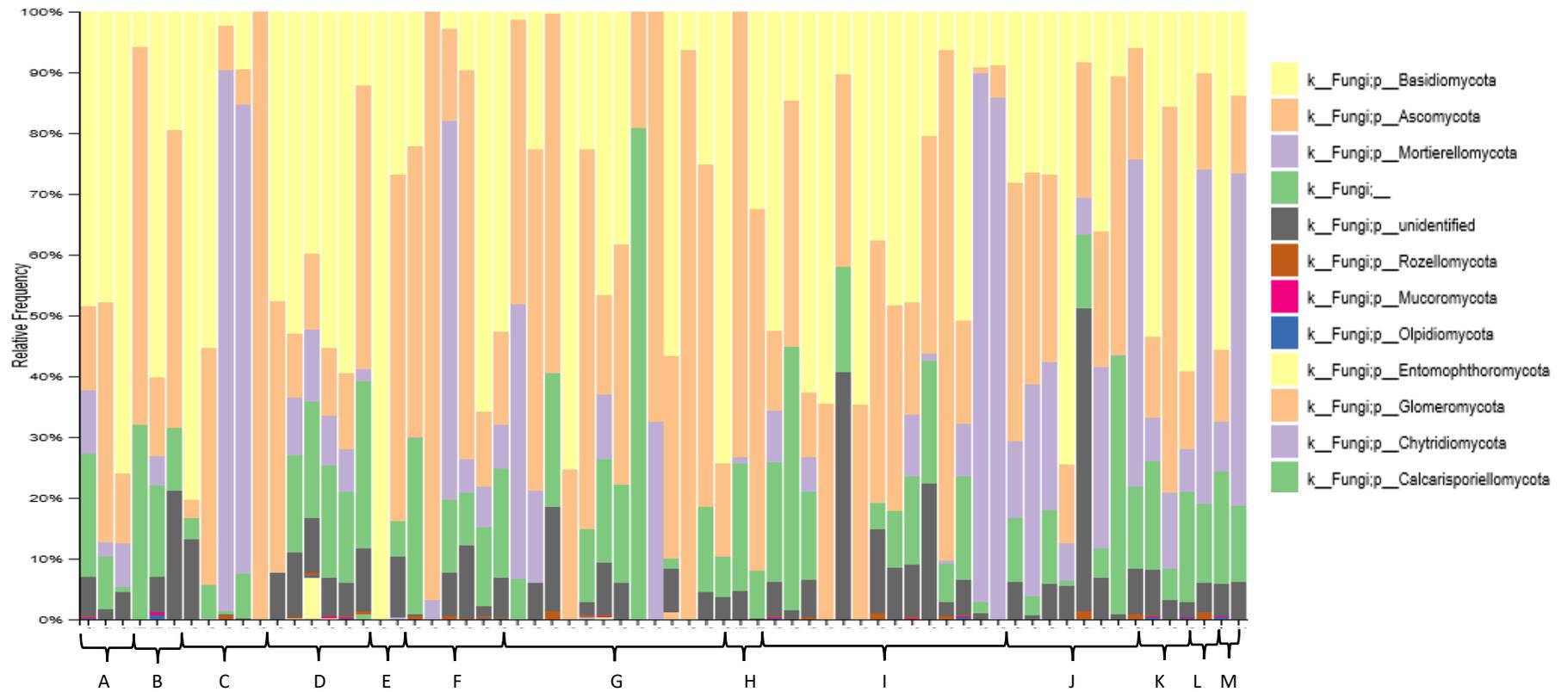


Figura 3. Barplots que muestran la asignación taxonómica a nivel de filo. A) *AquiloEURYCEA galeane*, B) *A. sp. nov.*, C) *A. scandens*, D) *Chiripterotrítion cieloensis*, E) *Craugastor decoratus*, F) *C. infernalis*, G) *C. magnipes*, H) *C. mosaurei*, I) *C. multidentatus*, J) Cuevas, K) *Eleutherodactylus cystignathoides*, L) *Ixalotriton niger*, F) *Nyctanolis pernix*. Las muestras de E y K pertenecen a las ranas colectadas dentro de cuevas.

Entre los grupos fúngicos identificados, Mortierellomycota, Glomeromycota, Olpidiomycota, Calcarisporiellomycota y Entomophtoromycota han sido propuestos recientemente para ser ascendidos al rango de filo por Tedersoo et al., 2018, y el mismo grupo reconoce a Mucoromycota como un filo monofilético y a Rozellomycota como parte del reino Fungi.

Para los hongos de los filios Basidiomycota y Ascomycota se identificaron un total de 1443 y 2574 OTU respectivamente, eso indica que los Ascomycota son el filo más diverso. Sin embargo, los hongos del filo Basidiomycota están presentes en mayor abundancia ya que 1,241,406 secuencias fueron asignadas al filo Basidiomycota y solo 755,330 secuencias fueron asignadas al filo Ascomycota. Los órdenes fúngicos más abundantes en las muestras pertenecen a tres filios diferentes, siendo los Mortierellales el orden presente en una mayor frecuencia; este orden forma parte del filo Mortierellomycota. Adicionalmente los órdenes Canopdiales e Hypocreales están presentes en menor frecuencia, seguidos de Hymenochaetales, Agaricales, Thelephorales, Pleosporales, Filobasidiales y Heliotales (Figura 4).

Cuando se analizan a nivel de orden y género los filios más abundantes, se observa que en el caso de los Basidiomycota los tres órdenes más abundantes son los Agaricales (Figura 1, Anexo 2), Thelephorales e Hymenochaetales. Mientras que los tres géneros más abundantes son *Inocybe* (Agaricales), *Tomentella* (Thelephorales) y *Tubulicrinis* (Hymenochaetales) (Figura 2, Anexo 2). En el caso de filo Ascomycota, los Canopdiales, Hypocreales y Heliotales son los órdenes más abundantes, y a nivel de género *Cladosporium* (Canopdiales), *Metarhizium* (Hypocreales) y *Alternaria* (Pleosporales) son los más abundantes (Figura 3, Anexo 2). Adicionalmente se identificó el género *Pseudogymnoascus* como parte de los diez géneros más abundantes del filo Ascomycota (Figura 4, Anexo 2).

	Dentro de cueva												Fuera de cueva	
Mortierellales	36.9	2.3	9.7	0	18.6	10.6	0.6	26.3	25.4	11.3	39.9	66.5	8.6	2.9
Capnodiales	25.6	27.1	5.8	10.8	4.8	16.5	19.3	7.8	12	2.2	2.6	3.8	5.4	14.3
Hypocreales	0.8	9.9	3.8	3.6	22.3	15.4	4.3	2.5	8.9	20.3	2.3	2.4	5.5	5.3
unidentified	2.8	12.4	11.2	3.1	6.9	7.2	9.7	5.7	10.4	8.6	7.6	7.1	7.2	18.8
Hymenochaetales	0	10.4	17.3	0	5.9	2.3	0	10.8	0.5	19.8	12.9	0	11.8	7.4
Agaricales	16.4	6.3	10.3	0	7.7	5.4	0	6.1	4.2	8	7.3	0.1	4.3	4.9
Thelephorales	0	4.7	7.1	0	5.9	2.2	0	4.1	10.4	7.1	5.7	0	30.7	1.7
Pleosporales	0.3	0.2	3.6	9	1.2	11.3	20.5	0.2	2.6	0.3	1	0.8	0.8	6
Filobasidiales	0.2	0.3	1.4	52.9	1.6	5.6	0	0.6	0.8	0.2	0.7	3	0.1	8.5
Helotiales	0.3	1.5	4.2	0	4	4.3	1.3	2.5	5	3	2.4	2.3	6.3	4.1
Polyporales	8.4	0.3	0.5	8.7	1.5	0.4	0	8.6	5.4	2.2	1.2	0	3.4	0.1
Saccharomycetales	0	9.5	0.6	0	0.2	0.5	0	15	0.4	0.3	0.3	0	0.3	0.7
	<i>A. scandens</i>	<i>A. sp. nov.</i>	<i>C. cieloensis</i>	<i>C. decoratus</i>	<i>C. infernalis</i>	<i>C. magnipes</i>	<i>C. mosairei</i>	<i>C. multidentatus</i>	Cave	<i>E. cystignathoides</i>	<i>I. niger</i>	<i>N. permix</i>	<i>A. galeane</i>	<i>C. multidentatus</i>

Figura 4. Heatmap que muestra la asignación taxonómica a nivel de orden por especie. En los recuadros se indica el porcentaje de secuencias correspondientes a cada orden fúngico.

Todas las secuencias identificadas del filo Mortierellomycota se asignaron al orden Mortierellales y se lograron identificar 23 especies pertenecientes al género *Mortierella* (Figura 5, Anexo2). Con respecto a los filios identificados en baja abundancia se lograron asignar a nivel de especie las secuencias del filo Chytridiomycota, todas ellas se asignaron a *B. dendrobatidis*; adicionalmente las secuencias asignadas al filo Entomophthoromycota se asignaron al género *Basidiobolus*. La presencia de hongos del filo Glomeromycota es igualmente interesante ya que la literatura indica que los hongos de este filo son considerados simbioses obligados de plantas (Schüßler et al., 2001). En la Figura 5 se muestran algunos de los géneros fúngicos presentes en baja abundancia y el orden al que estos pertenecen.

	Dentro de cueva												Fuera de cueva	
Mucoromycetes; Mucorales -	20	0.4	4.9	0	29.7	10.7	50	5.3	39.8	3.4	54.6	100	33.5	18.4
unidentified; unidentified -	0	15.9	45.4	0	16.3	11.6	0	19.6	0.9	35.7	24.3	0	16.5	7.8
Umbelopsidomycetes; Umbelopsidales -	20	0	4.3	0	8.7	0.9	0	6.4	10.6	7.9	2.2	0	6.6	4.6
Rhizophydiomycetes; Rhizophydiales -	20	0	2.2	50	16.7	5.6	0	0	0	0	2.1	0	1.2	0.9
Endogonomycetes; Endogonales -	0	0	0	0	21.4	0.1	0	11.8	5.2	0	1.2	0	0.7	0.9
GS18; unidentified -	0	17	5.6	0	5.5	0.5	0	4.7	0	17.6	15.3	0	5.3	0.7
Basidiobolomycetes; Basidiobolales -	0	0	15.3	0	0	1.3	0	0.9	0	1.5	0	0	2.3	0
Glomeromycetes; Glomerales -	0	0	1.8	0	1.6	0	0	1.3	5.9	0.1	0	0	0	0
Calcarisporiellomycetes; Calcarisporiellales -	0	0	3.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rozellomycota_cls_Incertae_sedis; GS02 -	0	0	0.4	0	0	0.1	0	0	0	0.4	0.3	0	0.5	0
Rozellomycota_cls_Incertae_sedis; GS04 -	0	0	0.1	0	0.1	0	0	0.1	0	0	0	0	0.2	0
	<i>A. scandens</i>	<i>A. sp. nov</i>	<i>C. cieloensis</i>	<i>C. decoratus</i>	<i>C. infernalis</i>	<i>C. magnipes</i>	<i>C. mosairei</i>	<i>C. multidentatus</i>	Cave	<i>E. cystignathoides</i>	<i>I. niger</i>	<i>N. pernix</i>	<i>A. galeane</i>	<i>C. multidentatus</i>

Figura 5. Ordenes fúngicos poco abundantes. Se muestran los ordenes fúngicos más abundantes pertenecientes a los filos de baja frecuencia relativa en cada una de las especies. En los cuadros del heatmap se muestra el porcentaje de secuencias asignadas.

Núcleo del micobioma fúngico cutáneo.

Se analizaron 13 ejemplares de *C. magnipes* (Figura 6A), en los que se identificaron un total de 895 OTU. Sin embargo, solo se identificó un OTU, asignado a *Alternaria fasciculata* el cual estaba compartido en 30% de las muestras. Adicionalmente se identificó que 18 OTU estaban compartidos en 15% de las muestras. Estos correspondían a: *Galerina sp.*, *Tomentella sp.*, *Caloplaca lecapustulata*, *Pseudocyphellaria citrina*, *Mortierella sp.*, *Stromatonectria caraganae*, *Henningsomyces sp.*, *Trichoderma viridae*, *Peniophorella pallida*, *Clavulinaceae sp.*, y el resto a OTU clasificados como hongos no cultivables.

Por otra parte, de *C. multidentatus* (Figura 6B) se analizaron 14 muestras y un total de 1,846 OTU, de los cuales 11 OTU estaban presentes en al menos 35% de las muestras.

Estos OTU corresponden a las siguientes especies: *Tubulicrinis subulatus*, *Tomentella sp.*, *Peniophorella praetermissa*, *Sebacina vermifera*, *Lecanicillium sp.*, *Botrybasidium sp.*, *Humaria hemisphaerica*, *Exophiala equina*, y el resto a hongos no cultivables.

Es de resaltar que entre las dos especies de salamandras solo se comparte la presencia del género *Tubulicrinis*, lo que indica que posiblemente especies de hongos de este género sean comunes en el microbioma cutáneo de estas salamandras. Sin embargo, los resultados muestran que no existe un núcleo definido en el microbioma fúngico de la piel de estas especies de anfibios debido a que en ambos casos los OTU identificados se comparten en menos del 70% de los individuos.

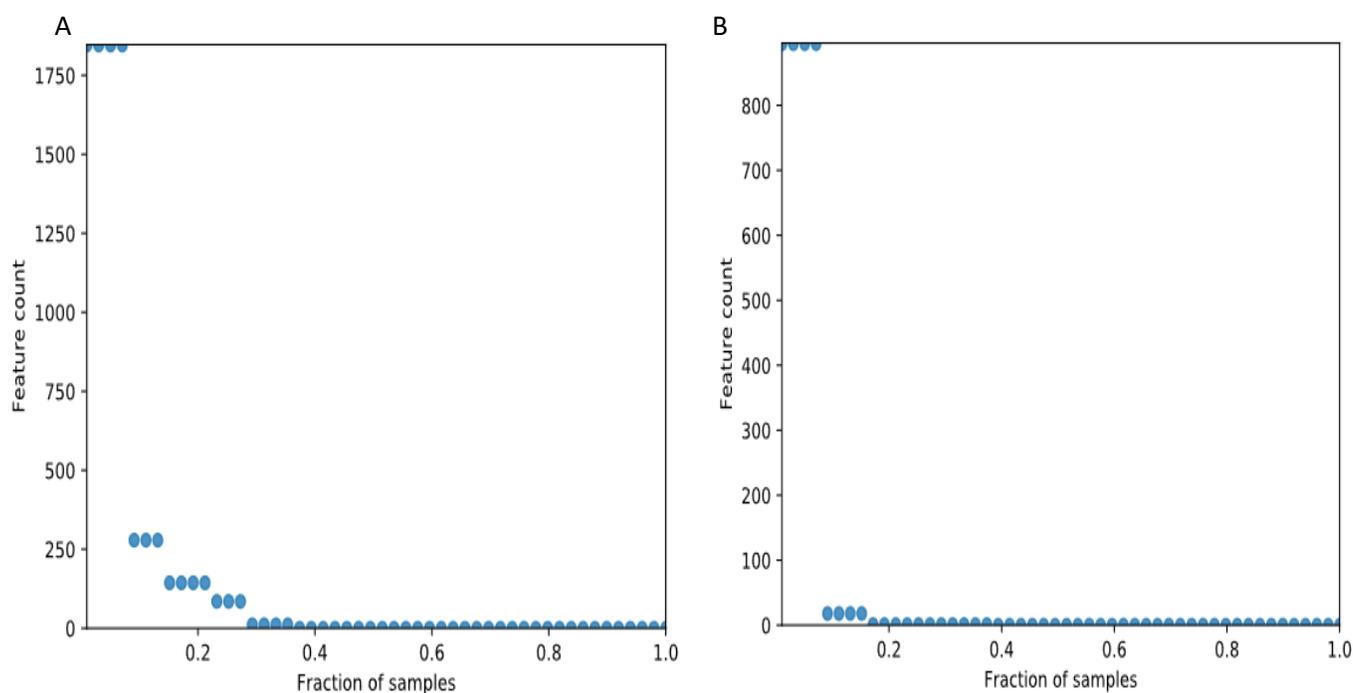


Figura 6. Núcleo del microbioma cutáneo de salamandras. A) *C. magnipes*. B) *C. multidentatus*. En el eje de las X se muestra la fracción de las muestras analizadas, en el eje de las Y se muestra el número de OTU compartidos.

Presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en el microbioma cutáneo.

Entre las 68 muestras que se secuenciaron en doce de ellas se detectó la presencia de secuencias que fueron asignadas taxonómicamente a Bd. Once de estas muestras pertenecen a siete especies de salamandras *I. niger* (1), *C. cieloensis* (4), *C. magnipes* (2), *C. infernalis* (1), *C. multidentatus* (1), *A. scandens* (1) y *A. galeanae* (1), además se detectó Bd en la muestra de la rana *Craugastor decoratus* (Tabla 2). De los doce individuos en los que se identificó al hongo patógeno, solo en *C. infernalis* las secuencias asignadas a Bd correspondieron a más del 1% de las asignaciones taxonómicas de la muestra. Sin embargo, esta misma muestra solo produjo un total de 436 secuencias, siendo la segunda muestra que produjo una menor cantidad de lecturas durante el proceso de secuenciación. Por lo que podemos suponer que la detección de Bd usando datos genómicos es eficiente incluso en muestras con pocos reads.

Tabla 2. Frecuencia de secuencias asignadas a *B. dendrobatidis* en las muestras donde el patógeno fue detectado. Los datos se ordenan por porcentaje de secuencias asignadas a Bd en las muestras.

Identificador	Especie	Porcentaje de secuencias asignadas a <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Numero de secuencias asignadas a Bd	Numero de secuencias en la muestra
GZ2	<i>C. infernalis</i>	3.2%	14	436
CO8	<i>C. magnipes</i>	0.4%	41	10,237
BA2	<i>C. decoratus</i>	0.3%	30	8,751
CC6	<i>A. scandens</i>	0.17%	60	33,630
CC4	<i>C. cieloensis</i>	0.07%	52	70,291
CO9	<i>C. magnipes</i>	0.07%	78	113,471
CC3	<i>C. cieloensis</i>	0.06%	10	16,818
SLP5	<i>C. multidentatus</i>	0.04%	31	79,127
CB2	<i>I. niger</i>	0.03%	33	106,450
GZ4	<i>A. galeanae</i>	0.03%	23	84,146
CC2	<i>C. cieloensis</i>	0.02%	18	87,121

CRI1	<i>C. cieloensis</i>	0.01%	16	103,650
------	----------------------	-------	----	---------

Adicionalmente se generó un set de datos solo con las muestras en las que se detectó la presencia de secuencias asignadas a Bd con el fin de realizar un análisis del núcleo del microbioma de estas muestras. En total este set de datos tenía once muestras ya que se excluyó la muestra de la rana *C. decoratus*. En las once muestras se detectaron un total de 2,638 OTU y se detectó que 70% de las muestras compartían 44 OTU fúngicos.

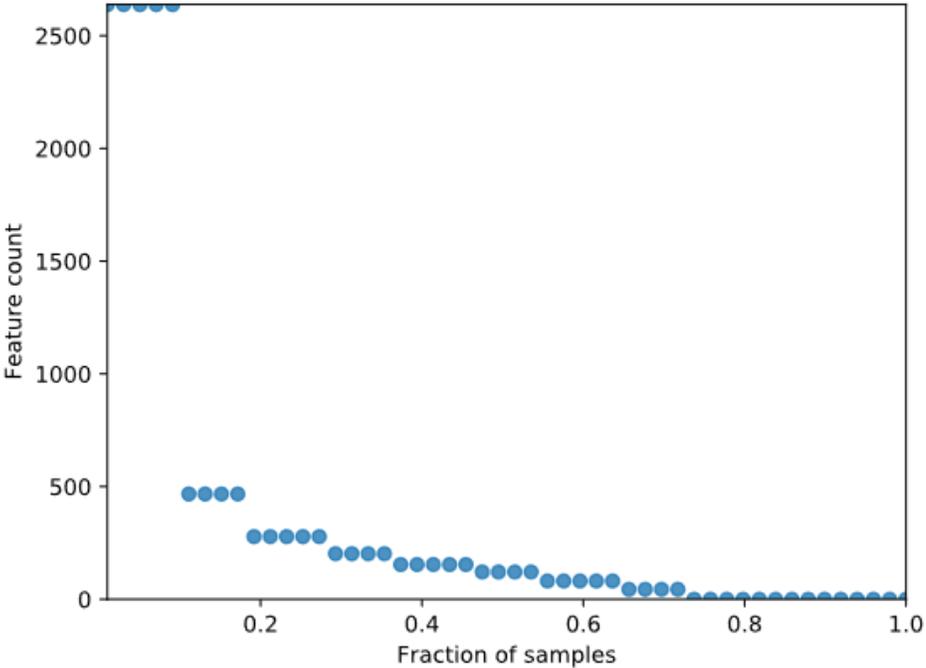


Figura 7. Núcleo del microbioma cutáneo de salamandras en donde se detectó Bd. En el eje de las X se muestra la fracción de las muestras analizadas, en el eje de las y se muestra el número de OTU compartidos.

Los 44 OTU fúngicos que se compartían se asignaron taxonómicamente a las siguientes especies: *Tubulicrinis subulatus*, *Tridentaria implicans*, *Peniophorella praetermissa*, *Tomentella sp.*, *Clavullina sp.*, *Hyphodontia hastata*, *Botryobasidium candicans*, *Peniophorella guttulifera*, *Amphinema sp.*, *Tomentella bryophila*, *Sebacina sp.*, *Trichoderma atroviride*, *Humaria hemisphaerica*, *Exophiala moniliae*, *Umbelopsis gibberispora*, *Wilcoxina rehmi*, y el resto de los OTU a hongos no cultivables. Adicionalmente se detectó que *Geomyces sp.*, estaba presente en 21% de las muestras

infectadas con Bd. En las 49 muestras que no presentaron Bd se identificaron un total de 3,504 OTU, y solo uno de ellos estaba compartido entre el 35% de las muestras, el cual fue asignado taxonómicamente a *Alternaria fasciculata*.

Para finalizar se verificó si ciertos grupos de hongos eran más abundantes en las muestras positivas para Bd, por lo que usando los datos de frecuencia de los reads se generaron boxplots en donde se muestra la abundancia de los reads a nivel de orden entre los dos grupos de muestras (Figura 8)

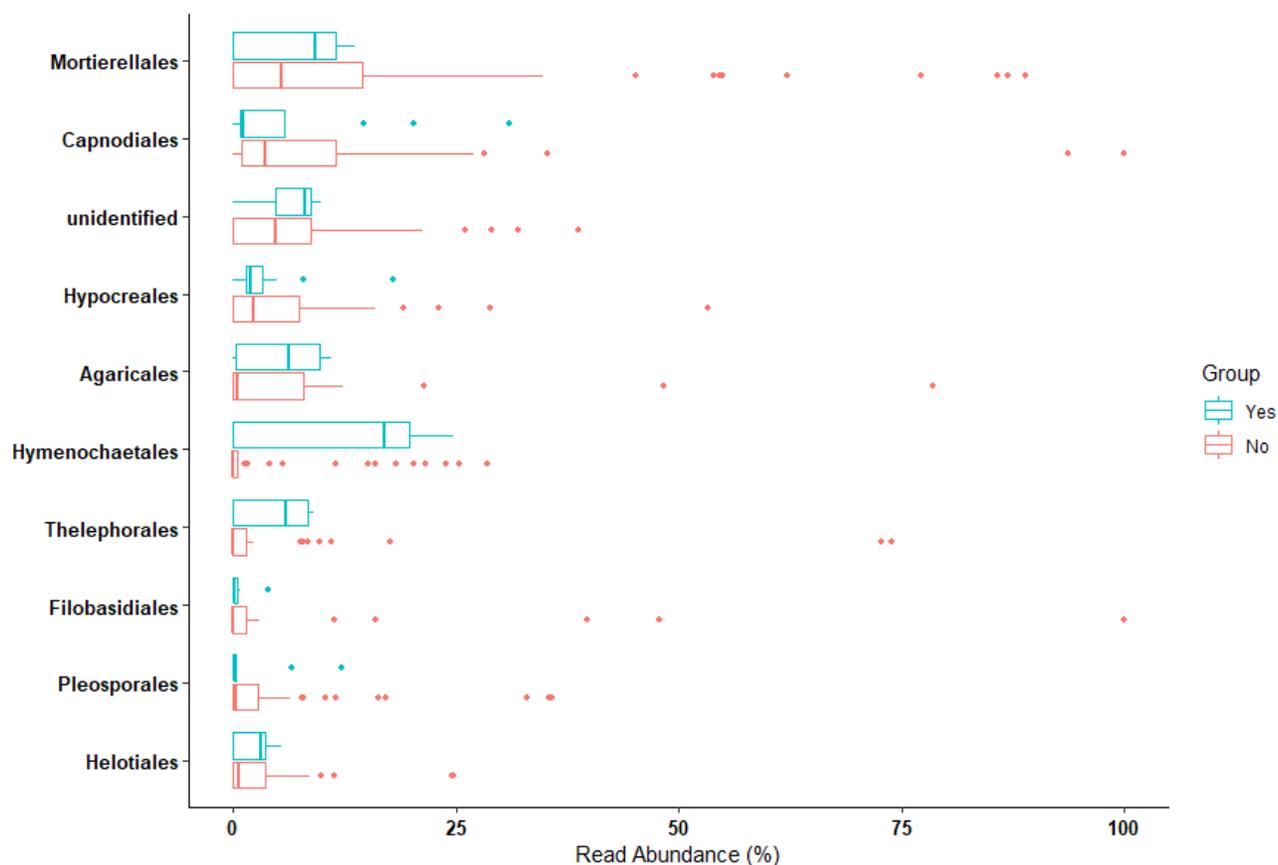


Figura 8. Abundancia de reads entre muestras con presencia (turquesa) y ausencia (rosa) de Bd a nivel de orden.

Se observa que los órdenes Hymenochaetales y Thelephorales son los más abundantes, y debido a que ambos forman parte del filo Basidiomycota, se decidió generar un boxplot únicamente con los cinco órdenes más abundantes de este género para saber si otros grupos de basidiomycetos presentaban un comportamiento similar (Figura 9).

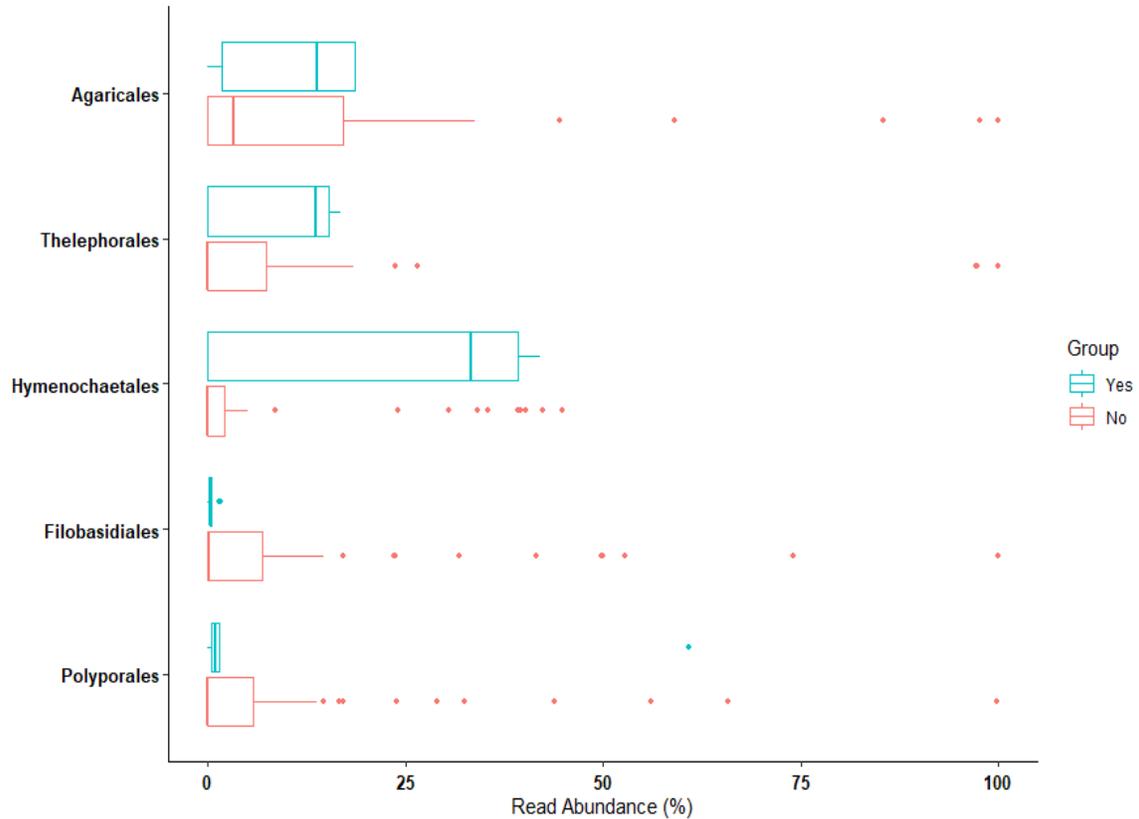


Figura 9. Abundancia de reads entre muestras con presencia (turquesa) y ausencia (rosa) de Bd de los cinco órdenes más abundantes del filo Basidiomycota.

Se observó que tanto los Hymenochaetales ($t=2.63$, $df=13.82$, $p\text{-valor}=0.019$) y los Filobasidiales ($t=-2.10$, $df=57.62$, $p\text{-valor}=0.039$) estaban presentes en abundancias diferencialmente entre las muestras con y sin presencia de Bd. Esto indica que existen modificaciones en la composición del microbioma fúngico cutáneo que se relacionan con la presencia del hongo patógeno. En el caso de los Thelephorales ($t=0.95$, $df=11.45$, $p\text{-valor}=0.36$) las abundancias diferenciales no son estadísticamente significativas entre los dos grupos de muestras.

Diversidad alfa

Con el fin de analizar la diversidad alfa, se generaron curvas de acumulación de especies en donde se muestra la cantidad de OTU observados para cada muestra, de acuerdo con una profundidad de muestreo definida. El valor de la profundidad de muestreo se fijó a 1,300 secuencias por muestra y a 40,000 secuencias por muestra. El valor de 1,300 se fijó con el fin de perder la menor cantidad de datos posibles ya que solo dos muestras (GZ2 y SALB1) generaron secuencias por debajo de ese valor y las curvas generadas solo excluían estas dos muestras, mientras que el valor de 40,000 secuencias que es la media calculada para el conjunto total de muestras (Apéndice 1).

La curva de 1,300 secuencias por muestra se visualizó agrupando las muestras por especie, y se observó que para *A. sp.*, *A. galeanae*, *A. scandens*, *C. infernalis*, *C. magnipes*, *C. mosaueri*, *C. multidentatus*, *C. decoratus*, y *N. pernix*, las curvas alcanzaron la asíntota con tan solo 150 a 750 secuencias por muestra lo que corresponde a que en cada especie de estas se observaron entre 10 y 60 OTU, mientras que el resto de las especies no alcanzaron la asíntota con una profundidad de muestreo de 1,300 secuencias. Esto indica que si se aumenta la profundidad de muestreo se podrían seguir identificando OTU fúngicos en esas especies. Se observó que las especies con una mayor cantidad de OTU detectados fueron *E. cystignathoides*, *C. cieloensis* e *I. niger*, mientras que las especies con menos OTU detectados fueron *C. decoratus*, *C. magnipes* y *A. sp.* (Figura 10A).

Debido a que muestras pertenecientes a una especie (ej. *C. magnipes*, *C. multidentatus* y *C. infernalis*) tenían menos de 40,000 secuencias y otras tenían más de 40,000 secuencias se decidió generar una curva de acumulación de especies solo con las muestras que tenían 40,000 secuencias o más. En este caso las muestras no fueron agrupadas por especie a diferencia de la curva generada con 1,300 secuencias por muestra y se agruparon como muestras únicas.

En total para generar esta curva se usaron 31 muestras. Se observó que, con una profundidad de muestreo de 40,000 secuencias las muestras: GZ7, CO13, CG1, CL2, SLP3, CC5, GZ9, COW, CGW, TRIW, GZ3, VFW, CB1, CG2, GZW, CM1, CO12, CO5 alcanzaron la

asíntota con menos de 5,000 secuencias y se detectaron entre 25 y 200 OTU. Por otro lado, en el resto de las muestras con más de 40,000 secuencias, VF2, GZ4, CRI1, CL1, CC4, CC2, GZ8, CL3, CO2, SLP5, CO9, CB2 y CBW, se detectan entre 300 y 650 OTU fúngicos, de este grupo solo CL3, GZ8 y CC4 no alcanzaron la asíntota (Figura 10B).

Las especies con una mayor diversidad según el índice de Shannon fueron *A. galeanae*, *N. pernix*, *I. niger*, *C. infernalis*, *C. cieloensis*, *C. mosaueri*, *C. multidentatus*, y las muestras ambientales (Figura 11A). Se puede observar que para todas las especies se calcularon valores por encima de 2 y hasta 5.5; estos valores indican que la piel de los anfibios se puede considerar como un ambiente con una diversidad fúngica de media a alta en estas especies.

Por último, se calculó el índice de Chao1 (Figura 11B) para cada una de las especies de salamandras. Este índice estima el número de especies que hay en una comunidad, y es usado como un estimador de la diversidad verdadera de un ecosistema. Se observa que *C. cieloensis*, *I. niger*, *C. infernalis*, *E. cystignathoides* y las muestras ambientales de las cuevas son las muestras con una mayor diversidad de especies según el índice de Chao1.

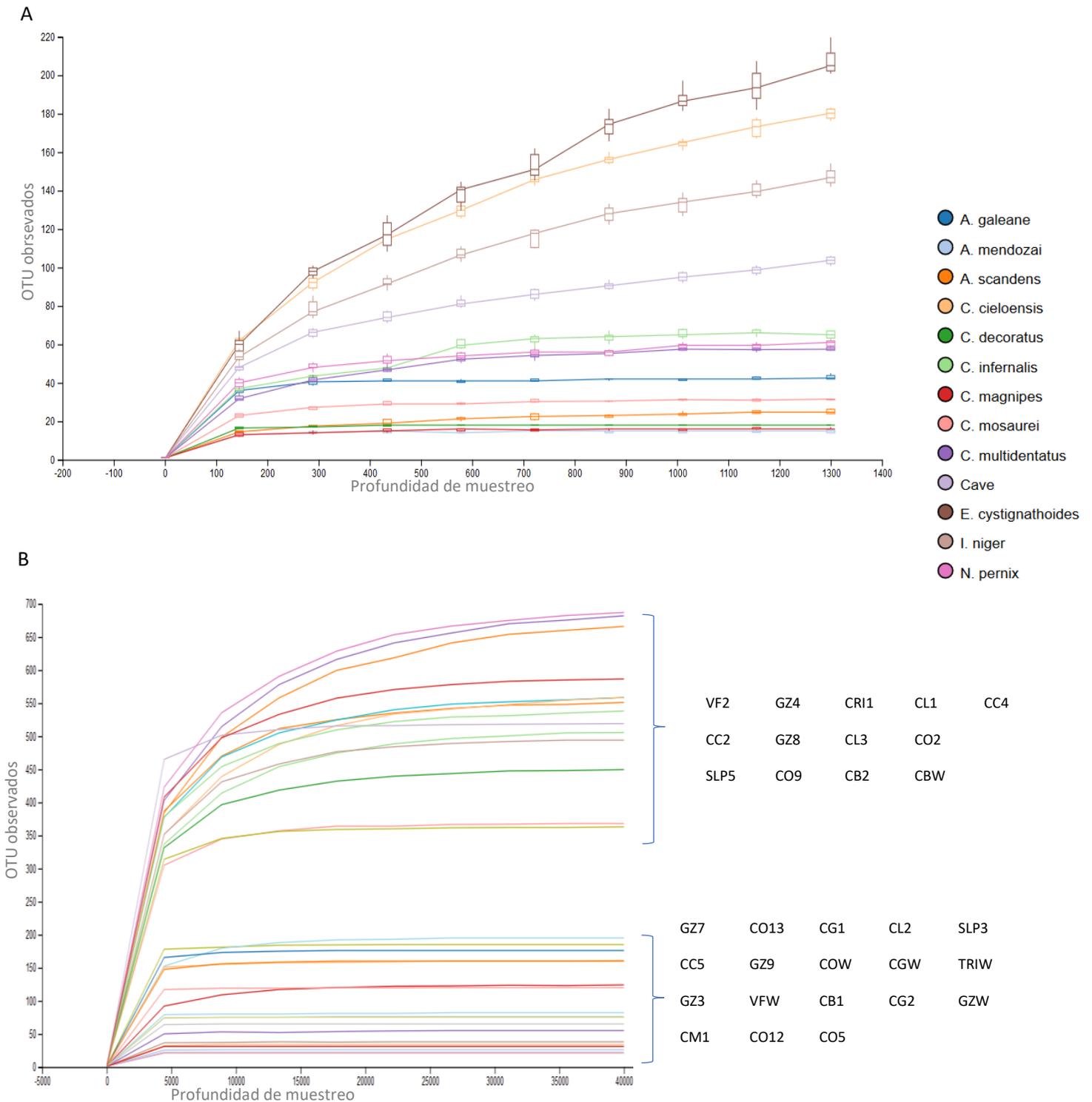


Figura 10. Gráficos de acumulación de especies. A) Curvas de acumulación de especies a una profundidad de muestreo de 1,300 secuencias por muestra. Las muestras se agruparon por especie. B) curvas de acumulación de especies a una profundidad de muestreo de 40,000 secuencias por muestra. Solo se usaron aquellas muestras con más de 40,000 secuencias, a un lado de los corchetes se indican las muestras que están en el grupo de curvas dentro de ese corchete.

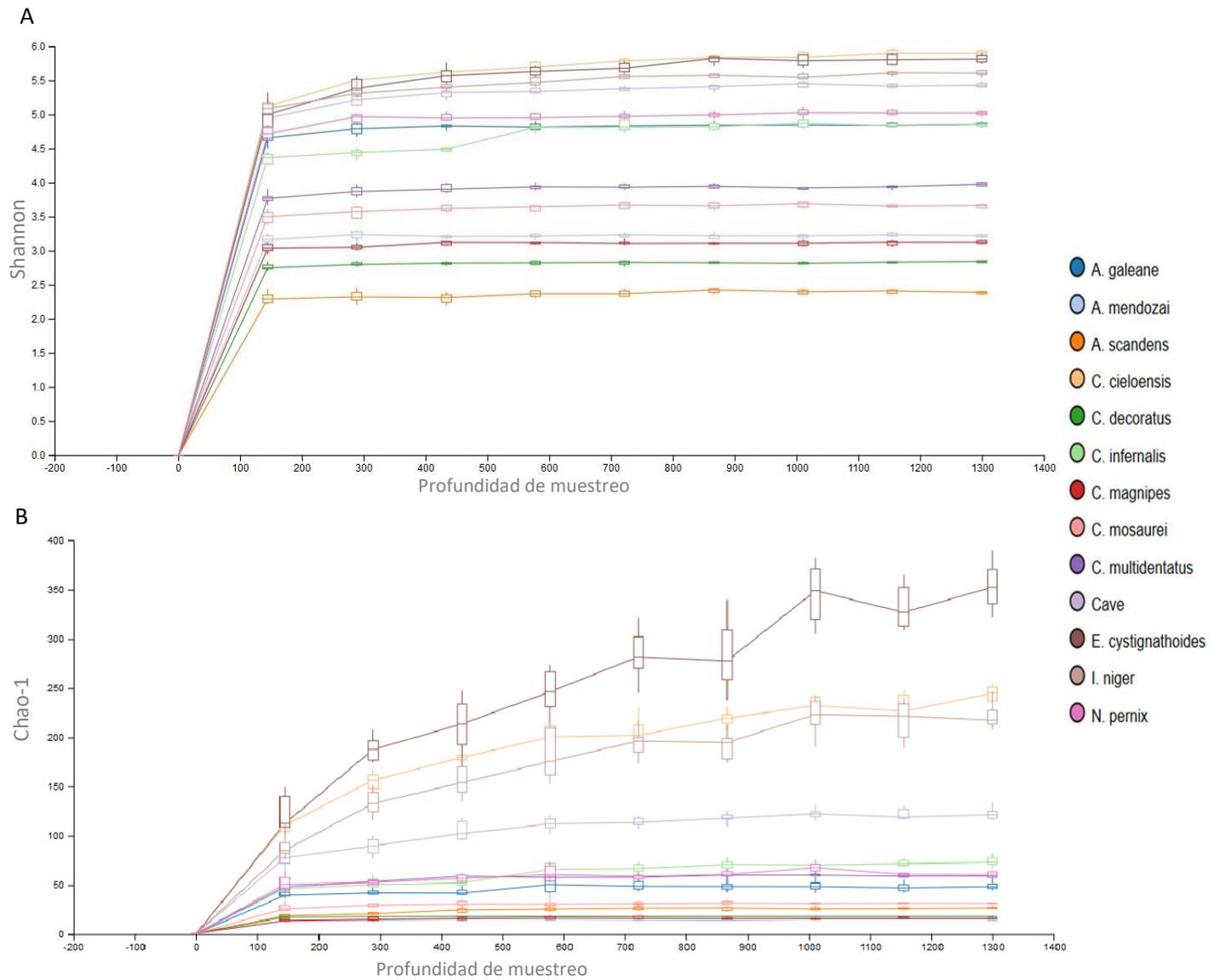


Figura 11. Índices de diversidad. A) Índice de diversidad de Shannon. B) Índice de diversidad Chao1. Las gráficas fueron generadas a una profundidad de muestreo de 1,300 secuencias.

Diversidad Beta

Los análisis de ordenación como los Análisis de Componentes Principales (PCA), nos permiten analizar el efecto de variables no correlacionadas sobre diversidad observada en el microbioma cutáneo. De esta manera podemos saber si la diversidad observada en un grupo de individuos o muestras es explicada por un mismo conjunto de variables.

En el caso particular de este trabajo nos interesó conocer si: A) Los individuos colectados que pertenecían a la misma especie presentaban una composición similar del microbioma cutáneo y B) si el sitio de muestreo (Localidad) afecta la composición del microbioma fúngico de la piel. En primer lugar, se generaron dos PCA usando una matriz de distancia de Divergencia Jensen-Shannon y se compararon los datos sin transformar (Figura 12) contra los datos una vez que se realizó la transformación de Hellinger (Figura 13).

Una vez que se realizó la transformación, se observó que existe variabilidad en la composición del microbioma cutáneo entre individuos de la misma especie, sin embargo, a nivel global no se observó gran variabilidad ya que la mayoría de los individuos pertenecientes a distintos tipos de muestra (a diferentes especies, u origen) se agrupaban como un conjunto, lo que indica que la diversidad observada no está influenciada por el mismo conjunto de variables en individuos de la misma especie.

Debido a la variabilidad observada entre individuos de la misma especie, se decidió realizar un análisis de ordenación en subsets de datos para verificar si se observaba el mismo patrón que con el set de datos completo. Por lo que se generaron siete sets de datos diferentes: 1. Solo las muestras del género *Chiropterotriton* debido a que la mayoría de los ejemplares muestreados pertenecen a este género (Figura 14), 2. Solo las muestras ambientales usadas para analizar el efecto del ambiente y localidad (Figura 15), 3. Solo las muestras de *C. magnipes* por ser una de las dos especies con más especímenes muestreados (Figura 16), 4. Solo las muestras de *C. multidentatus* por la misma razón que *C. magnipes* (Figura 17), 5. Solo las muestras de la localidad El Coni por ser la localidad en donde viven en simpatria un mayor número de especies (Figura 18), 6. Solo muestras de la localidad Valle de los Fantasmas para tener un punto de comparación con la cueva El Coni y verificar

el efecto del hospedero contra el ambiente en la composición de las comunidades fúngicas (Figura 19), 7. Presencia o ausencia de Bd en las muestras para verificar el efecto de Bd sobre la composición del microbioma fúngico (Figura 20, en este análisis se usó el set de datos completo).

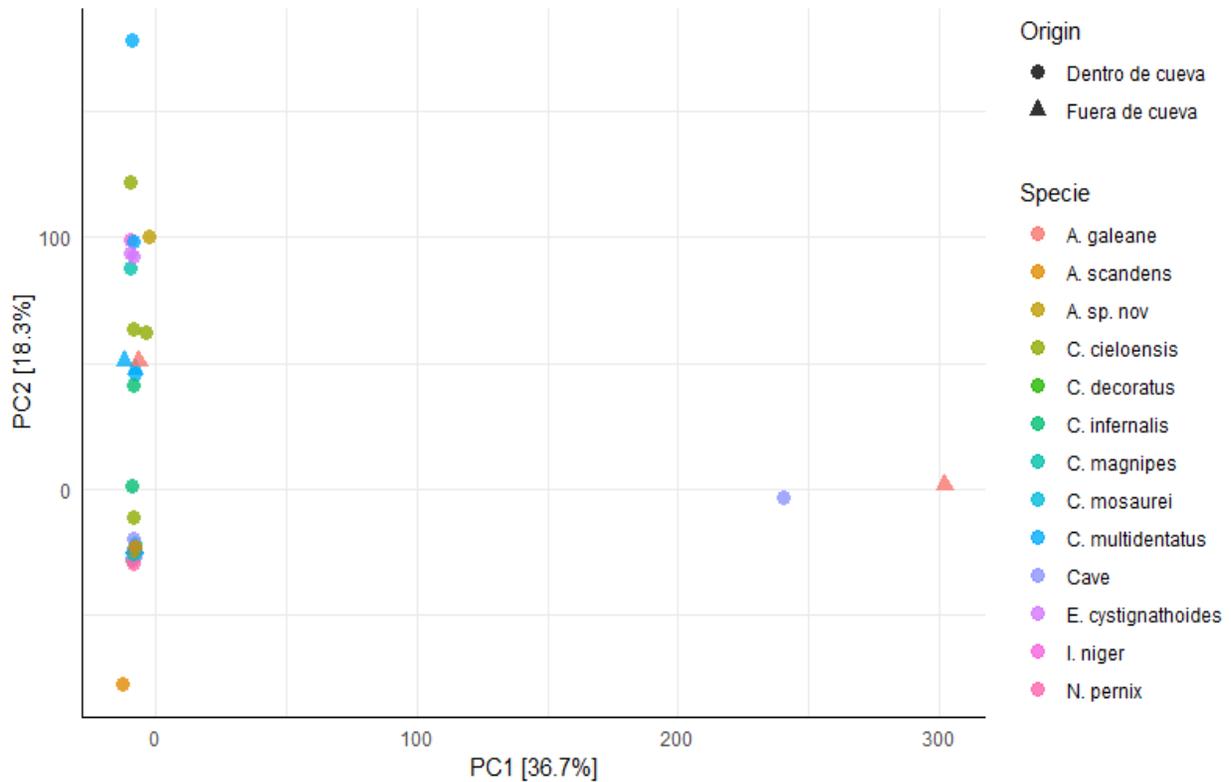


Figura 12. PCA del set de datos completo (68 muestras) sin aplicar la transformación de Hellinger.

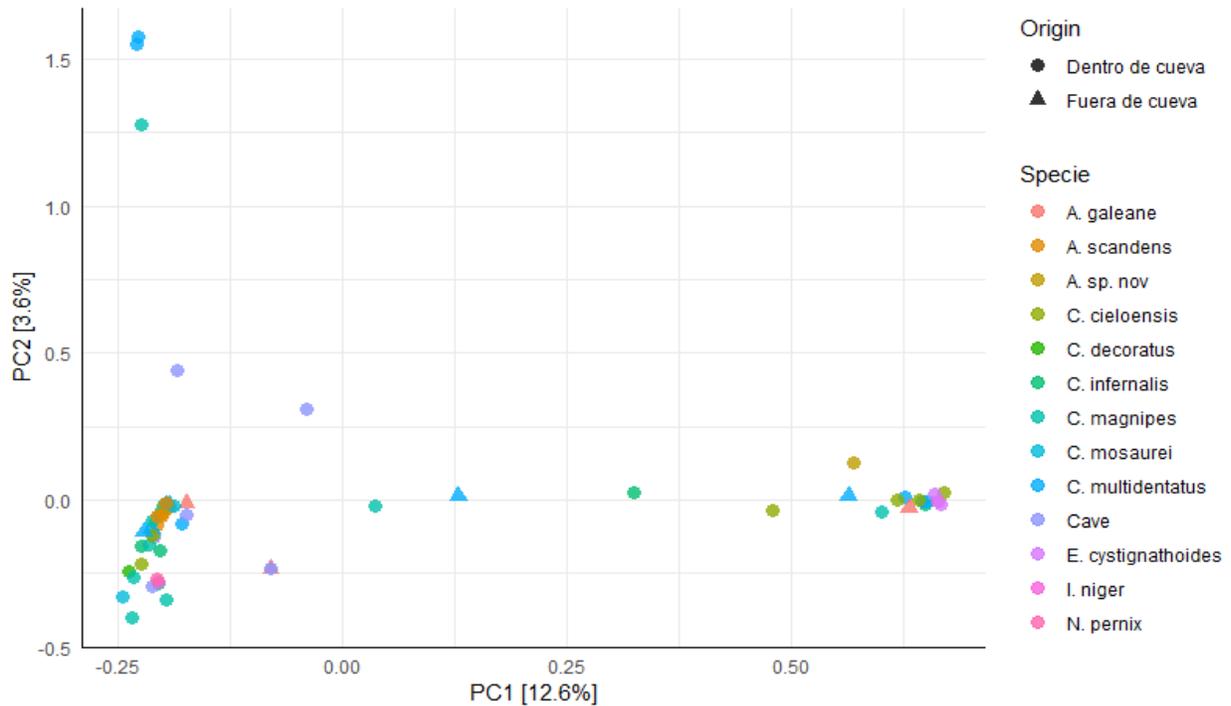


Figura 13. PCA del set de datos completo (68 muestras) después de aplicar la transformación de Hellinger.

El análisis con el set de datos que únicamente tiene las muestras correspondientes al género *Chiropterotriton* (Figura 14), indica que la composición del microbioma varía entre individuos de la misma especie, debido a que en ningún caso las muestras correspondientes a la misma especie se agrupan. Incluso parece que el origen de la muestra (dentro o fuera de cuevas) no tiene un efecto importante sobre la composición del microbioma cutáneo ya que las muestras con un origen fuera de la cueva se agrupan en su mayoría con las muestras colectadas dentro de cuevas.

Respecto al análisis con el set de datos de las cuevas (Figura 15), se observó que cada una de ellas presenta una composición diferente a excepción de Cerro Baúl y Cueva la Govenia, lo que resulta interesante debido a la distancia geográfica que existe entre ellas: Cerro Baúl es una localidad en Chiapas y Cueva la Govenia se ubica en Tamaulipas.

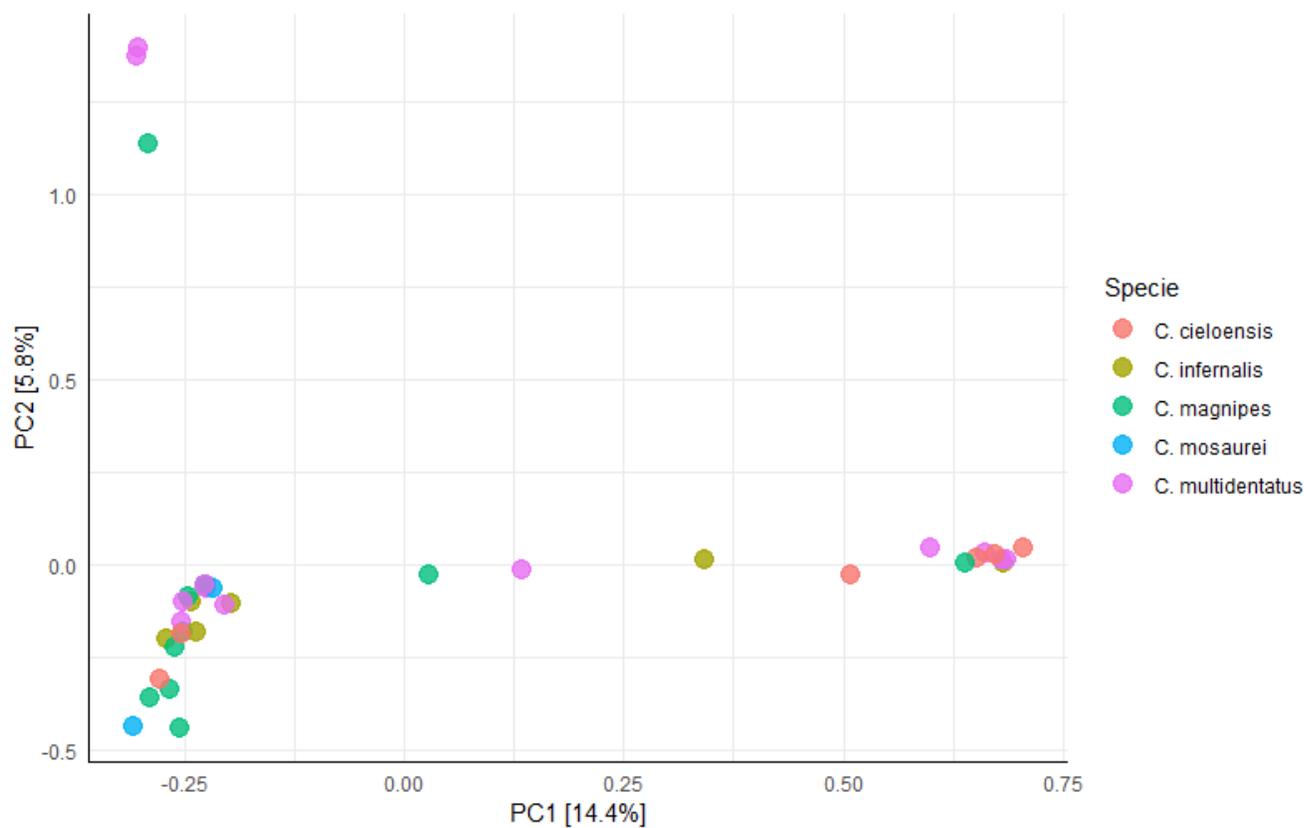


Figura 14. PCA de las muestras pertenecientes al género *Chiropterotriton*.

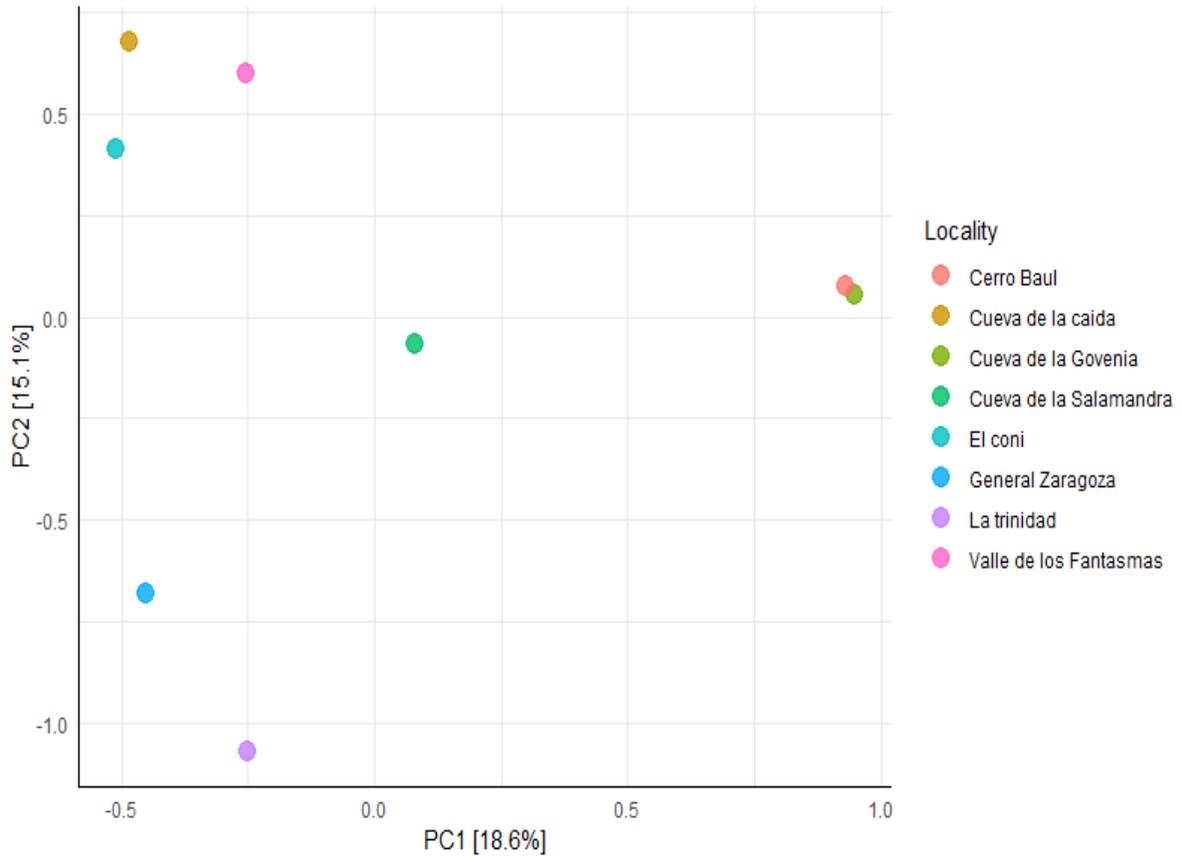


Figura 15. PCA de las muestras ambientales dentro de las cuevas.

Los sets de datos de *C. magnipes* (Figura 16) y *C. multidentatus* (Figura 17) se generaron ya que eran las especies con el mayor número de muestras, además de haber sido colectadas en dos o más localidades. Para ambos PCA no se observa que la localidad o el origen de la muestra tenga un efecto sobre la composición del microbioma.

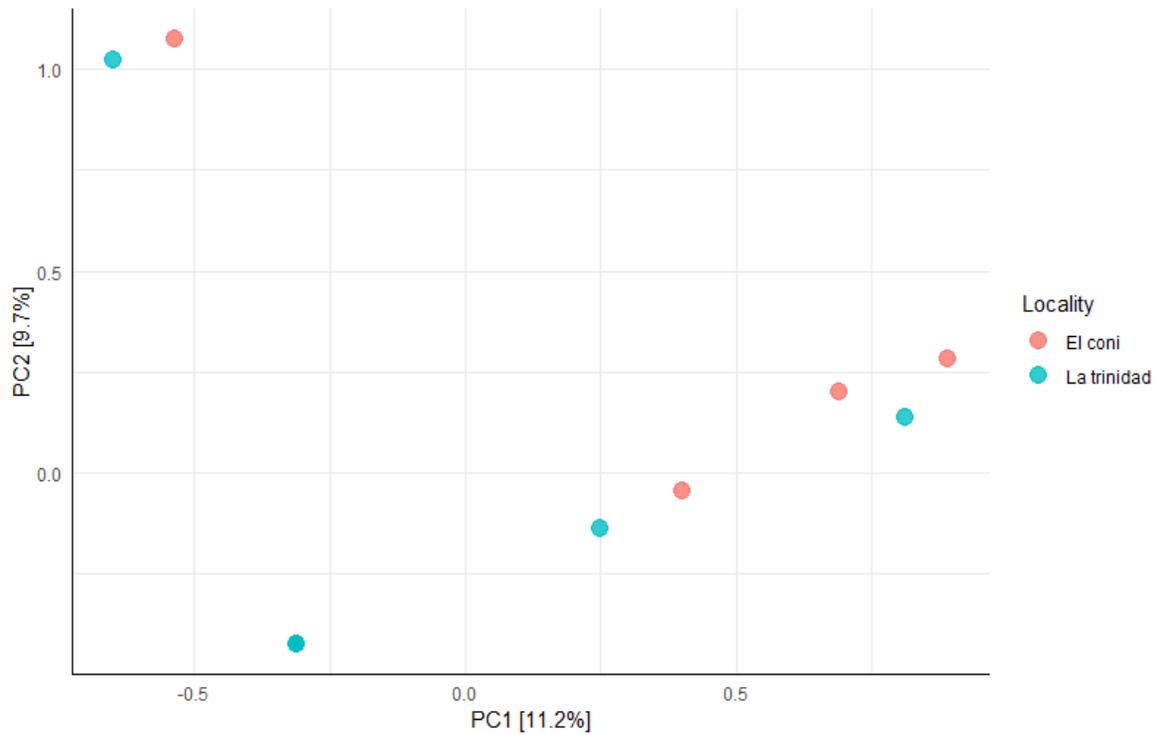


Figura 16. PCA de las muestras pertenecientes a la especie *C. magnipes* de dos localidades distintas.

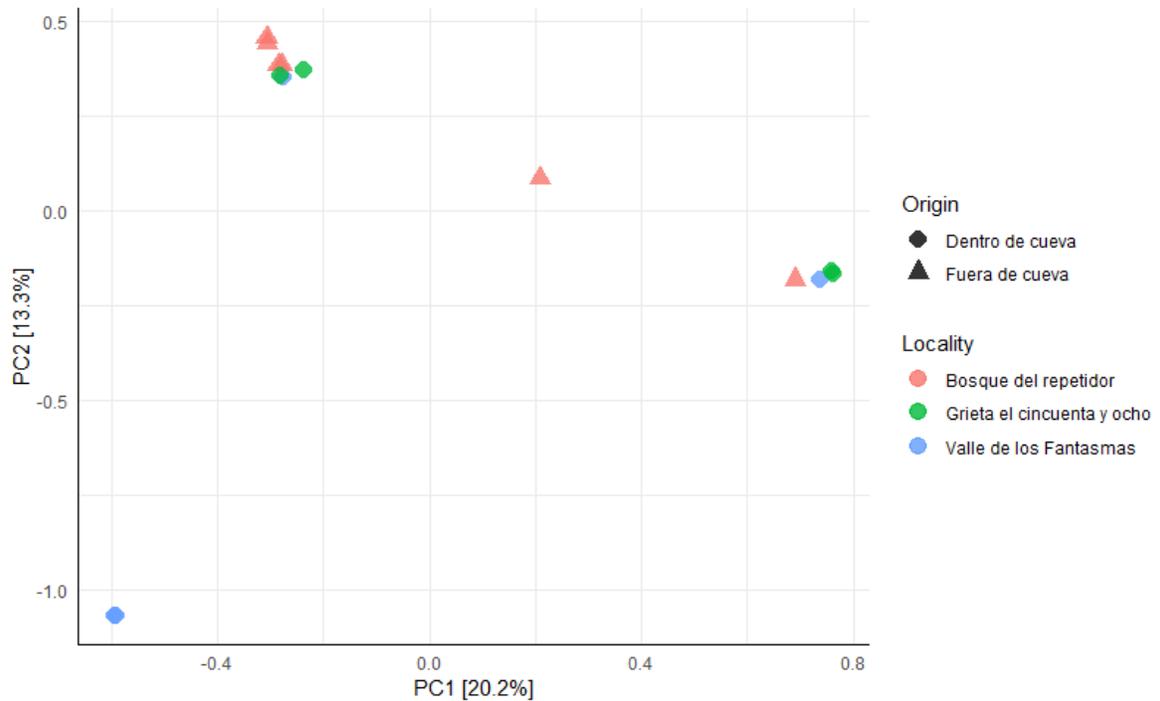


Figura 17. PCA de las muestras pertenecientes a la especie *C. multidentatus* de tres localidades distintas y de origen tanto dentro (Grieta el cincuenta y ocho y Valle de los Fantasmas) y fuera de las cuevas (Bosque del repetidor).

El set de datos El Coni se generó debido a que en esta localidad se encuentran habitando tres especies de salamandras en simpatria (*C. magnipes*, *C. mosauri* y *A. sp.*), además de la muestra ambiental y dos ejemplares de *E. cystignathoides*. Se observa que las muestras ambientales son diferentes de las muestras biológicas. Sin embargo, se observa el mismo patrón que en las figuras 13 y 14 en donde los individuos de la misma especie no se agrupan indicando que la composición del microbioma difiere entre individuos de la misma especie (Figura 18). Se observa el mismo patrón para la localidad del Valle de los Fantasmas (Figura 19).

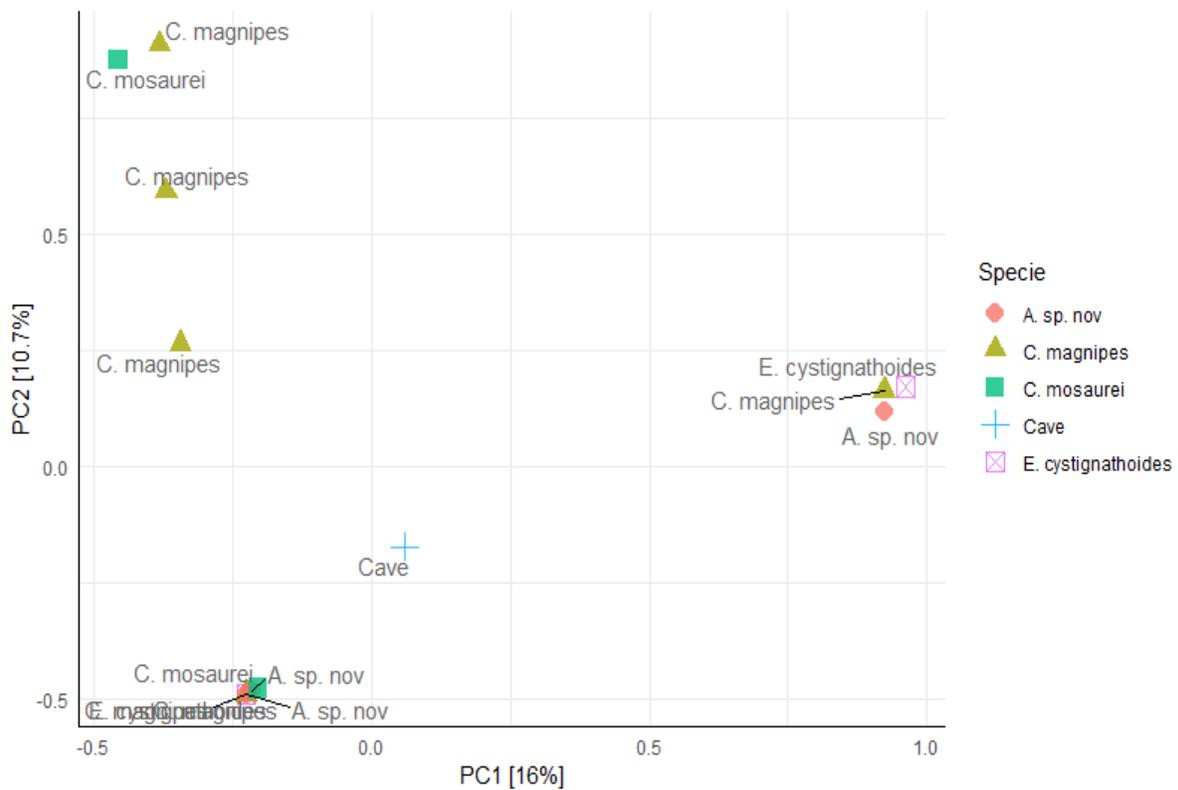


Figura 18. PCA de las muestras colectadas en la localidad El Coni.

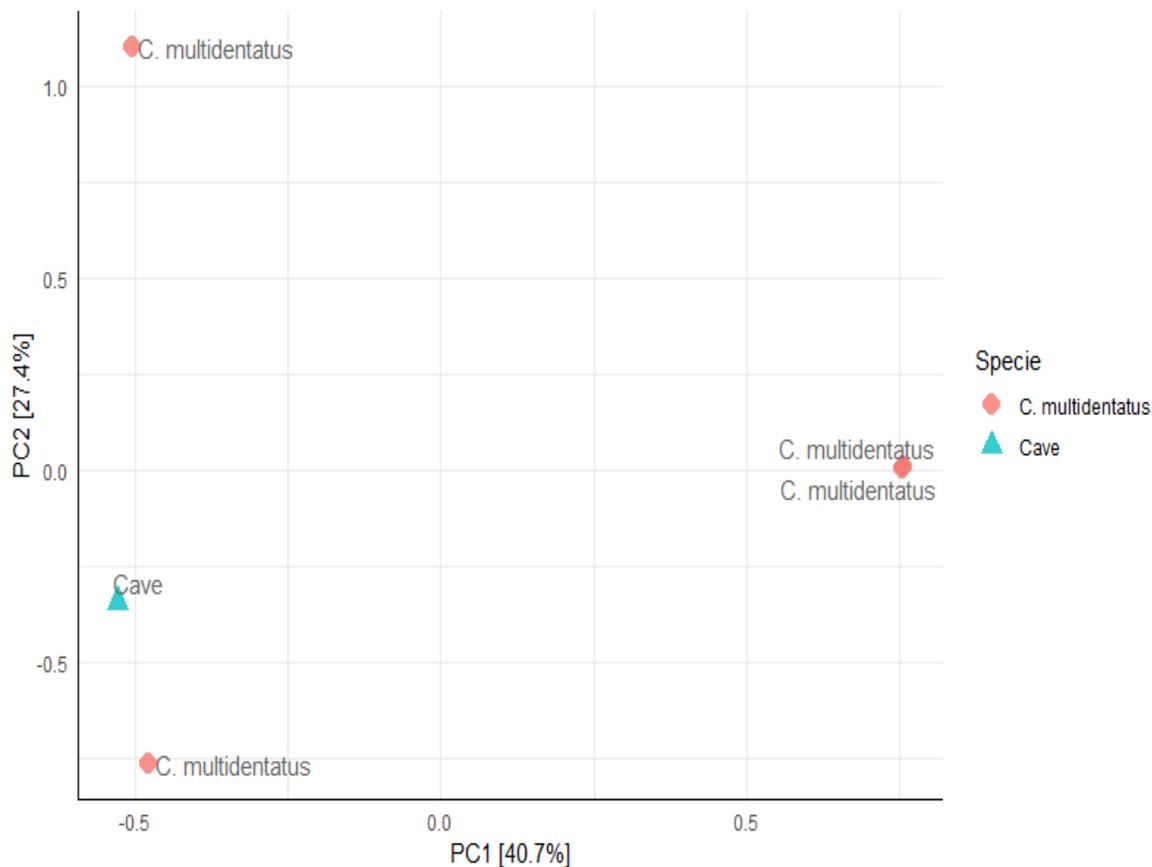


Figura 19. PCA de las muestras colectadas en la localidad Valle de los Fantasmas.

Por último, se visualizó el efecto que tenía la presencia de Bd sobre la composición del microbioma cutáneo, en este caso se usó el set de datos completos debido a que no se observó que alguno de los otros factores analizados tuviera algún efecto sobre la composición de las comunidades fúngicas. Se observó que la presencia de Bd en las muestras era la única variable que provocaba una agrupación de las muestras, lo que indica que aquellas muestras con presencia de Bd tiene una composición del microbioma similar entre ellas y diferente a la de las muestras que no tienen Bd (Figura 20).

Es de resaltar que dentro del grupo de muestras en donde se detectó la presencia de Bd se agruparon algunas otras muestras negativas para Bd estas son: CL1, CL3, CO13,

CO2, IG1, VF2 y GZ8. Además, las muestras CO8, BA2, CC6 y GZ2 en donde se detectó la presencia de Bd, se agrupan junto con aquellas muestras en las que Bd no estaba presente.

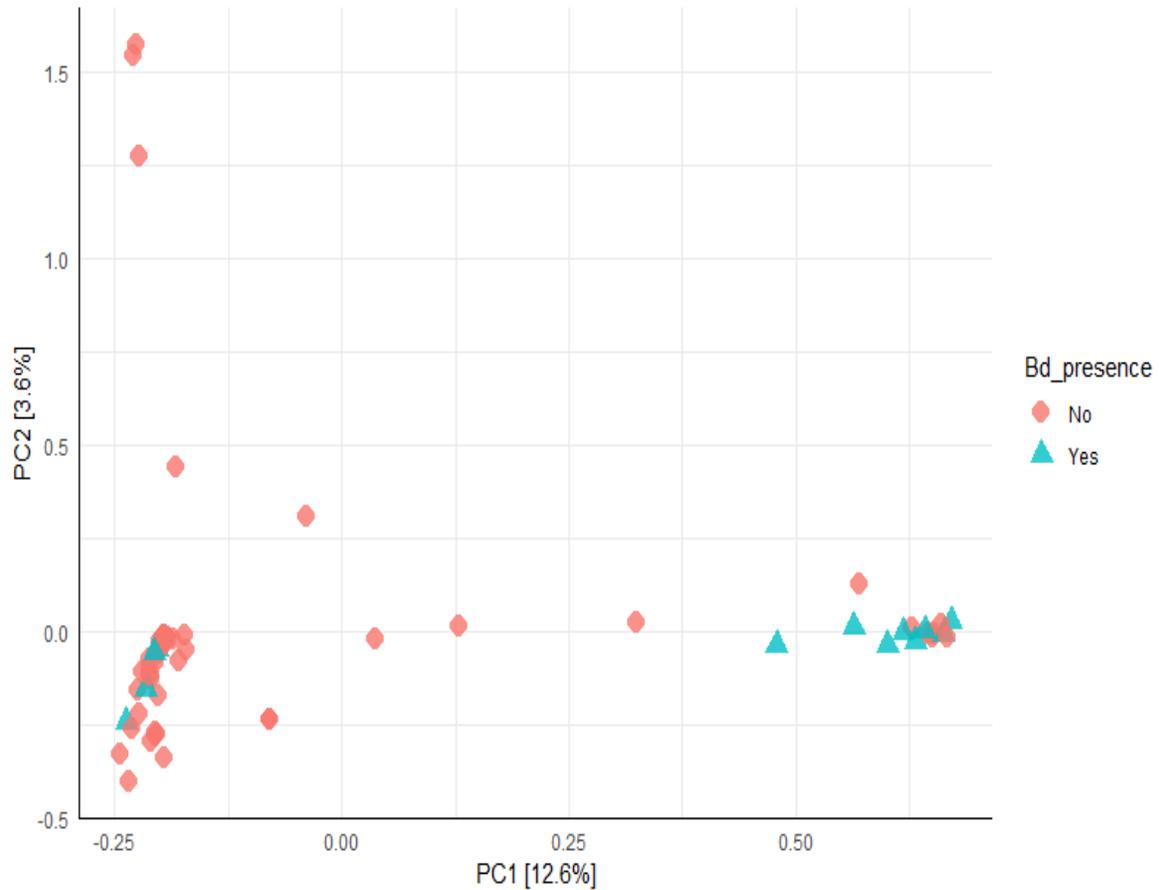


Figura 20. PCA de las muestras con o sin presencia de Bd.

Se realizaron pruebas de hipótesis usando la prueba Kruskal-Wallis, con el fin de analizar el efecto de variables categóricas sobre la diversidad alfa de las muestras. Para cada una de las cinco variables analizadas se calculó un estadístico H y un valor *P* (Tabla 3), y los mismos valores estadísticos pareados fueron calculados para cada una de las muestras analizadas bajo la misma variable (Anexo 3).

Tabla 3. Kruskal-Wallis para cada variable.

Variable	H	p-valor
Origen de la muestra	0.82124465	0.364816
Localidad	14.622024	0.404472
Especie	13.45354	0.336954
Tipo de muestra	0.670004	0.715336
Presencia de Bd	1.84733454	0.174093

Ninguna de estas diferencias es estadísticamente significativa, por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula. Esto indica que ninguna de las variables analizadas tiene un efecto sobre la diversidad alfa. De la misma manera cada uno de los valores P calculados para las comparaciones pareadas entre grupos es >0.05 . El p-valor calculado para la presencia de Bd indica que el microbioma de muestras con Bd no tiene diferencia en diversidad con el grupo de muestras sin Bd. Adicionalmente se realizó un análisis de PERMANOVA con el fin de conocer si los resultados de los análisis de ordenación tienen soporte estadístico, este análisis nos permite conocer si la varianza de las muestras en un grupo A es más similar entre ellas a la varianza total del conjunto de datos, es decir si en el grupo A existen OTU fúngicos compartidos entre las muestras de ese grupo que no están presentes en el resto de las muestras.

Los valores calculados para la prueba PERMANOVA muestran que existen diferencias significativas entre la composición del micobioma cuando se analizan el grupo Bd positivo contra el grupo Bd negativo (p-valor=0.001) de la variable Presencia de Bd. Estos resultados apoyan lo que se observó en los análisis de ordenación (Tabla 4).

Tabla 4. PERMANOVA de cada uno de los grupos.

Variable	Grupo 1	Grupo 2	pseudo-F	p-valor
Origen de la muestra (<i>C. multidentatus</i>)	Inside	Outside	1.1013334	0.305

Localidad (<i>C. multidentatus</i>)	Bosque del repetidor	Grieta el cincuenta y ocho	0.9785896	0.324
Localidad (<i>C. multidentatus</i>)	Bosque del repetidor	Valle de los Fantasma	1.2456566	0.205
Localidad (<i>C. multidentatus</i>)	Grieta el cincuenta y ocho	Valle de los Fantasma	1.2412506	0.239
Localidad (<i>C. magnipes</i>)	El Coni	La trinidad	0.9568978	0.737
Presencia de Bd	No	Si	3.347821	0.001

El valor de pseudo-F, se refiere al radio que existe en la varianza entre los grupos y la varianza dentro de los grupos; el p-valor solo se considera estadísticamente significativo cuando está por debajo de 0.05.

Si bien los resultados de la prueba Kruskal-Wallis indican que la presencia de Bd no tiene un efecto sobre la diversidad alfa, cuando se analiza la diversidad beta mediante la prueba PERMANOVA se observa que los resultados observados en los análisis de ordenación tienen soporte estadístico, por lo que se puede concluir que variables como el tipo de muestra y la presencia de Bd tiene un efecto sobre la composición del microbioma cutáneo, siendo la presencia de Bd la variable que explica de mejor manera las diferencias observadas.

Discusión.

En este trabajo se caracterizó a nivel taxonómico la porción fúngica del microbioma cutáneo de nueve especies de salamandras cavernícolas de México, lo que representa uno de los primeros trabajos enfocados en describir la diversidad de los hongos sobre la piel de los anfibios. Adicionalmente, se analizó si variables tanto ambientales como biológicas tienen algún efecto sobre la composición del microbioma de la piel de las salamandras, e identificamos que únicamente la presencia del hongo patógeno *B. dendrobatidis* muestra un efecto sobre la composición del microbioma cutáneo. A diferencia de muchos estudios en donde se demuestra que variables como la especie del hospedero o el ambiente tiene un efecto sobre la composición del componente bacteriano del microbioma en este trabajo no se identificó que estas variables tuvieran algún efecto sobre la composición de la porción fúngica del microbioma.

Esto podría tener varias explicaciones, una de ellas el número de muestras por especie ya que por lo general los estudios en donde se ha observado una influencia de diversos factores bióticos y abióticos sobre la composición del microbioma tiene un mayor número de muestras (Bletz et al., 2017b, 2017c; McKenzie et al., 2012) o se centran en analizar el microbioma de una sola especie (Bletz et al., 2017d; Kueneman et al., 2014), sin embargo en ninguno de ellos el efecto de Bd sobre la composición del microbioma es tan evidente como en el caso de este trabajo. Otra posible explicación para no haber detectado la influencia de factores es el diseño experimental ya que no contamos con mediciones suficientes para caracterizar de mejor manera la influencia del clima, etapa de desarrollo, filogenia u otros factores que se sabe influyen sobre la composición del microbioma.

Diversidad fúngica sobre el microbioma cutáneo de las salamandras cavernícolas.

Se planteó la generación de un catálogo de la diversidad fúngica en el microbioma cutáneo de nueve especies de salamandras cavernícolas, y cuando se analiza la diversidad taxonómica presente únicamente en las muestras que corresponden al orden de los

Caudados, se observa que Ascomycota es el filo fúngico más abundante sobre la piel de las salamandras ocupando un 42% de la diversidad total del microbioma, seguido del filo Basidiomycota con 37.6% y Mortierellomycota con 15.4%. El resto de los filios detectados en baja abundancia correspondían a 0.07% de la diversidad total, mientras que 4.3% de los OTU no fueron clasificados a nivel de filo (Figura 10).

Debido a la alta abundancia de los filios Ascomycota, Basidiomycota y Mortierellomycota, nos interesó conocer cuáles eran los órdenes y géneros más abundantes de estos filios en las salamandras cavernícolas, por lo que se identificaron los diez órdenes y géneros más abundantes para cada filo (Anexo 2).

En cuanto a los Ascomycota se mencionó en la sección de resultados que los tres órdenes y géneros más abundantes correspondían a:

- Ordenes: Canopdiales, Hypocreales y Heliotales
- Género: *Cladosporium*, *Metarhizium* y *Alternaria*

Con respecto a las características ecológicas de estos géneros de hongos, se sabe que gran parte de los hongos del género *Cladosporium* son considerados como saprobios o patógenos de plantas (Bensch et al., 2010), mientras que una porción menor es considerada como micoparasítica (Torres et al., 2017). Por otro lado, se sabe que los hongos del género *Metarhizium* son en su mayoría entomopatógenos, e incluso son usados como agentes de biocontrol de plagas en la industria agrícola. Además algunos hongos de este género pueden formar parte del microbioma de plantas (Behie et al., 2015; Driver et al., 2000). Del género *Alternaria* se sabe que existen especies consideradas como patógenos oportunistas de plantas y animales (humanos), sin embargo, la mayoría de las especies de este género son saprobias (Thomma., 2003).

Es de llamar la atención la presencia de hongos del género *Pseudogymnoascus* en la mayoría de las especies muestreadas (Figura 4, Anexo 2) además de la presencia del género *Geomyces*, en las muestras CB2, CC4, CL1, CL3, CO13, CO2, CO9, CRI1, GZ4, GZ8, IG1, y VF2, que además fue detectado en 21% de las muestras en donde se detectó Bd. Sin embargo, *Geomyces* estaba presente en baja abundancia, y la mayor cantidad de secuencias

asignadas a este género correspondían a la muestra CO13 (*A. sp.*) con 116 secuencias mientras que la muestra con menos secuencias asignadas a este género fue CB2 (*I. niger*) con 13. La presencia tanto de secuencias asignadas a los géneros *Pseudogymnoascus* como *Geomyces*, es sumamente interesante ya que se sabe que el hongo *Geomyces destructans* es el agente causante del síndrome de la nariz blanca que ha provocado graves declives poblacionales de diversas especies de murciélagos en Norte América (Gargas et al., 2009; Lemieux-Labonté et al., 2017; Zhang et al., 2014), y que estaba clasificado hasta hace algunos años como un integrante del género *Pseudogymnoascus* (Minnis y Lindner., 2013; Reynolds y Barton., 2014).

Cabe mencionar que en la mayoría de las cuevas visitadas durante la etapa de muestreo se detectó por avistamiento la presencia de murciélagos dentro de las cuevas, lo que es interesante, ya que la presencia de estos hongos sobre el microbioma cutáneo de las salamandras podría indicar que estas son posiblemente reservorios de estos hongos. Sin embargo, esta aseveración requiere de estudios enfocados a analizar la identidad y virulencia de los hongos del género *Geomyces* que forman parte del microbioma cutáneo de los anfibios cavernícolas. Un hecho interesante fue que las muestras en donde se detectó *Geomyces* estaban agrupadas junto o eran las muestras en donde también se detectó Bd. Esto podría indicar que una infección por Bd provoca un evento de disbiosis (Bletz et al., 2018), y posteriormente hongos presentes en el ambiente pueden colonizar nichos disponibles en el microbioma cutáneo y de esta manera permanecer en el ambiente cavernícola.

Mientras que para los Basidiomycota los tres órdenes y géneros más abundantes fueron:

- Ordenes: Agaricales Theleporales e Hymenochaetales.
- Generos: *Inocybe*, *Tomentella* y *Tubulicrinis*.

Con respecto a las características ecológicas de los géneros del filo Basidiomycota identificados. Se sabe que hongos del género *Inocybe* pueden ser micorrízicos, e incluso se consideran de importancia médica ya que algunos de ellos son productores de toxinas (Lurie

et al., 2009). Otros géneros micorrízico identificados son *Sebacina* (McKendrick et al., 2002) y *Tomentella* (Lilleskov y Bruns., 2005) que también cuenta con especies clasificadas en el grupo de los hongos corticoides que tienen un estilo de vida saprobio y participan en la degradación de materia vegetal al igual que hongos del género *Tubulicrinis* (Raymundo et al., 2012).

En cuanto al filo Mortierellomycota, todas las secuencias identificadas se asignaron a un único orden, los Mortieralles y a un solo género *Mortierella*. Se sabe que especies de este género son en su mayoría saprobios, y se han aislado tanto de materia vegetal en descomposición, heces de animales y exoesqueletos de artrópodos, además de ser comúnmente encontrado en distintos tipos de suelos (Gray y Baxby., 1968; Li et al., 2018; Warcup., 1951).

Entre los filos presentes en baja abundancia llama la atención la presencia de Glomeromycota como de Chytridiomycota. En el caso del filo Glomeromycota la literatura indica que estos hongos se consideran como simbioses obligados de plantas con los que forman relaciones micorrízicas (Oehl et al., 2011; Schüßler et al., 2001). Sin embargo, el hecho de encontrar secuencias asignadas a este filo, y lograr asignar algunas de ellas hasta el nivel de orden (Glomerales) en el microbioma de las salamandras cavernícolas indica que este filo de hongos no cuenta únicamente con especies consideradas como simbioses obligados de plantas y pueden tener otros hospederos.

Aunque cabe la posibilidad de que, al estar presentes en baja abundancia se trate de microorganismos transitorios sobre la piel de los anfibios. En este caso hay que considerar que los lavados con agua estéril que se realizan antes de tomar el frotis de la piel cumplen la función de eliminar los microorganismos transitorios. En la figura 5 se puede observar que las muestras donde se detectaron con mayor frecuencia a los Glomerales fue en las muestras ambientales y en las muestras biológicas donde se detectaron estaban presentes en menor abundancia. Esto podría sugerir que quizá en algunas muestras los lavados no eliminaron por completo a este grupo de hongos que podrían estar presentes de manera transitoria sobre la piel de las salamandras.

Al comparar los resultados generados en este trabajo contra datos de la diversidad fúngica de salamandras provenientes del Eje Neovolcanico Transversal (ENVT) (Figura 20, Datos no publicados generados por Jose Arredondo y Julio García) generados en el Laboratorio de Genómica y Diversidad de Vertebrados. Se identificó que en ambos trabajos los hongos del filo Ascomycota son los más abundantes sobre la piel de las salamandras; sin embargo, la presencia de los Basidiomycota es diferente ya que en las salamandras cavernícolas estos fueron más abundantes. Incluso a distintos niveles taxonómicos se identificaron más OTU en las salamandras de cuevas a comparación de las salamandras del ENVT. A nivel de clase se identificaron 25 clases de hongos en las salamandras del ENVT, mientras que en las salamandras de cuevas se identificaron 35. A nivel de orden se identificaron 65 ordenes en las salamandras del EVNT y 100 ordenes en las muestras de salamandras cavernícolas.

Estas diferencias podrían deberse a dos causas: A) El ambiente cavernícola es más diverso, o B) La estrategia de análisis de y obtención de los datos. Los resultados obtenidos en este trabajo permiten pensar que la estrategia de análisis de los datos es la causa de las diferencias observadas, el análisis de las salamandras provenientes del ENVT fue realizado usando el programa Qiime y no Qiime2 que difieren en pasos como la generación de clusters u OTU, además de distintos procesos durante el filtrado de datos que son más estrictos cuando se usa el programa Qiime2. Adicionalmente las versiones de la base de datos UNITE no fueron las mismas y el uso de un marcador diferente en este caso el ITS1.

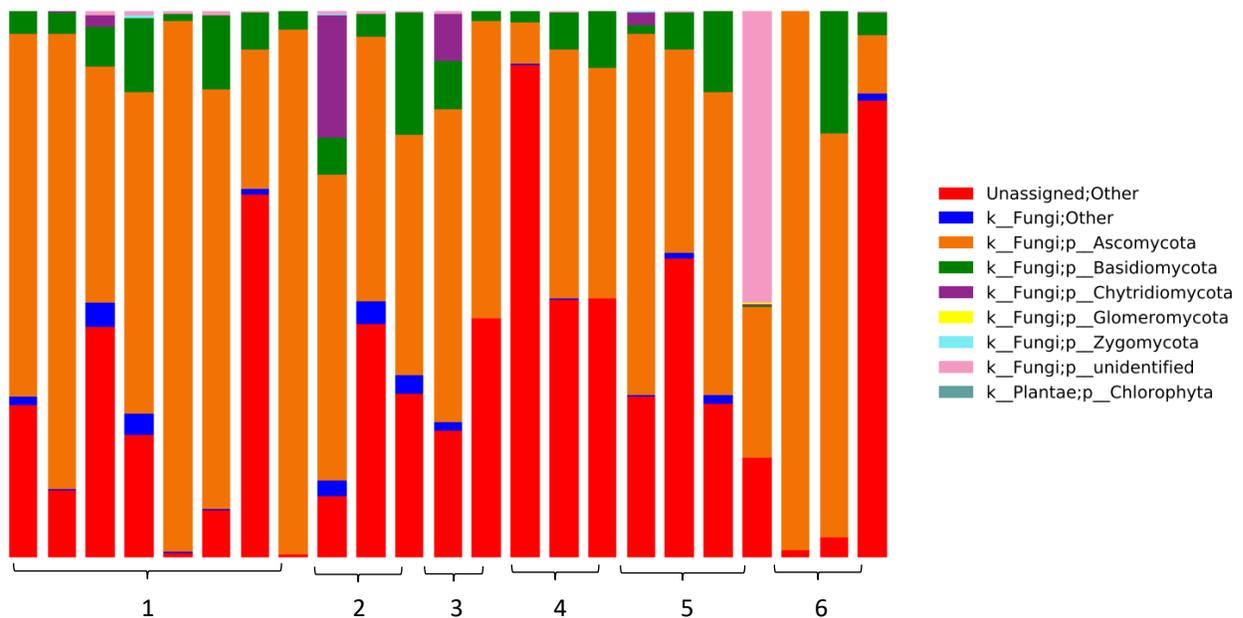


Figura 21. Grafica de barras de las asignaciones taxonómicas a nivel de filo de las salamandras del Eje Neovolcánico Transversal. Las muestras corresponden a: 1) *Pseudoeurycea leprosa*, 2) *P. melanomolga*, 3) *P. gadovii*, 4) *P. altamontana*, 5) *P. robertsi*, y 6) *P. longicauda*. Las gráficas de barras fueron generados y proporcionados por Julio Garcia (datos no publicados).

Dejando de lado las diferencias metodológicas entre los dos trabajos, se podría pensar que la diversidad dentro de las cuevas sería menor si se compara con la diversidad fuera de las cuevas, ya que el ambiente cavernícola se puede clasificar como oligotrófico. Sin embargo, este no es el caso para este estudio. Hay que tener en cuenta que la piel de los anfibios es un ambiente con características estructurales similares ya sea que los anfibios vivan dentro o fuera de cuevas, por lo que podemos considerar que la piel de los anfibios es un ambiente con condiciones similares para los microorganismos dentro y fuera de las cuevas, aunque la diversidad presente en el ambiente defiera entre los dos hábitats.

Es importante resaltar nuevamente la diferencia en la frecuencia del filo Basidiomycota, y del filo Mortierellomycota (que previamente se agrupaba como un subfilo dentro del filo Zygomycota). Ambos fueron más abundantes en la piel de anfibios cavernícolas. De acuerdo a la revisión de las características ecológicas de los géneros más abundantes pertenecientes a estos filos sabemos que aquellos que se encuentran sobre la piel de las

salamandras cavernícolas son considerados como saprobios. Esto podría sugerir que, al existir una baja cantidad de materia vegetal dentro de las cuevas estos hongos podrían haber encontrado un nuevo nicho en el microbioma cutáneo, mientras que los hongos saprobios que se encuentran fuera de cuevas no tienen la necesidad de buscar un nuevo nicho debido a la alta disponibilidad de materia vegetal.

Por otra parte, la presencia de hongos del filo Glomeromycota en salamandras tanto del ENVT como cavernícolas refuerza la idea de que estos hongos podrían no ser estrictamente simbiontes obligados de plantas. Sugiriendo que estos pueden establecer relaciones con otros hospederos, en este caso las salamandras. Además, la presencia de los hongos de este filo sobre la piel de las salamandras analizadas en ambos estudios nos permite descartar la idea de que estos sean microorganismos transitorios que no fueron eliminados de la piel después de los lavados previos a la toma de las muestras del microbioma.

Nuestros resultados señalan que gran parte de los hongos en el microbioma cutáneo de las salamandras cavernícolas pueden considerarse como saprobios o micorrízicos debido a la asignación taxonómica que se generó. Sin embargo, no sabemos cuál es la función que estos cumplen sobre la piel de los anfibios y si pueden ser considerados como mutualistas o parásitos. Podemos especular en algunos casos como el de *Trichoderma atroviride* u otros hongos clasificados como micoparasíticos que podría estar protegiendo a su hospedero contra hongos patógenos. Por otra parte, se ha demostrado que los hongos pueden proteger a sus hospederos debido a su capacidad para producir compuestos antifúngicos, este es el caso de *Penicillium expansum*, que ha demostrado la capacidad de inhibir a Bd en pruebas *in vitro* (Kearns et al., 2017; Woodhams et al., 2016). En el caso de los hongos considerados como micorrízicos, pensamos que las salamandras podrían actuar como reservorios de estos hongos o incluso actuar como un medio de dispersión.

Sin embargo, estas son meras especulaciones y son necesarios ensayos experimentales para poder elucidar cual es la función tanto de los hongos micorrízicos y saprobios como integrantes del microbioma cutáneo de los anfibios. El primer paso para indagar sobre el verdadero papel de los hongos del microbioma cutáneo es realizar análisis funcionales ya

sea mediante metagenómica o mediante el aislamiento y análisis *in vitro*, de la misma manera en que se ha hecho con la porción bacteriana del microbioma cutáneo, y de esta manera elucidar cual es la función y los beneficios que los hongos simbioses le otorgan a sus hospederos (Rebollar et al., 2016, 2018).

Presencia de *Batrachocytrium dendrobatidis* en el microbioma cutáneo.

Uno de los objetivos más importantes durante el planteamiento global del proyecto del que este trabajo se desprende, fue la detección de Bd en poblaciones de salamandras cavernícolas endémicas de México. Debido a que se consideran como un grupo de anfibios únicos en el país y están clasificados como especies en peligro de extinción. Por lo que es importante conocer si Bd el patógeno causante de la quitridiomycosis está presente y si pudiera ser responsable de los declives poblacionales registrados hasta la fecha en algunas de las especies analizadas en este trabajo.

En este trabajo logramos identificar a nivel de especie todas las secuencias asignadas al filo Chytridiomycota como *B. dendrobatidis*. En todas las muestras en donde se detectó Bd (Tabla 2) había entre 78 y 10 secuencias asignadas a esta especie, las cuales provenían de distintas localidades. Por lo que se confirmó la presencia del patógeno tanto en el norte, centro y sur del país. Es importante mencionar que durante las colectas realizadas ningún individuo muestreado presentaba signos de enfermedad, y debido a la baja abundancia de las secuencias asignadas a Bd en cada una de las muestras se puede pensar que a pesar de estar infectados con Bd los individuos no estaban enfermos.

A la par de este trabajo se realizaron ensayos de qPCR con el fin de detectar la presencia de Bd en algunas de las muestras analizadas en este estudio (Trabajo realizado por Mizraim Olivares como parte de su tesis de maestría, datos no publicados). Los ensayos de qPCR indicaron que las muestras BA2, CC6, CO8 y CO9 eran positivas para Bd. Estas mismas que fueron positivas en este estudio. El resto de las muestras que fueron positivas en este estudio no se incluyeron en los ensayos de qPCR debido a diferencias en los tiempos de muestreo y la etapa de los ensayos de qPCR. Podemos concluir que ambos métodos son fiables para detectar Bd incluso si este está presente en baja abundancia.

Se sabe que cuando Bd llegó al continente causó una oleada de infecciones epizooticas (este término hace referencia enfermedades infecciosas que afectan a un número elevado de individuos al mismo tiempo y en el mismo lugar y que además se propagan con rapidez) que se extendieron del norte al sur de América. Además, se conocen muy pocas poblaciones de anfibios en las que el patógeno ha permanecido como una enfermedad enzootica (este término se refiere a enfermedades infecciosas que afectan a una población por periodos de tiempo prolongado y en una misma área geográfica), mientras que en otras ha provocado la extinción de las especies infectadas (Briggs et al., 2010).

Los datos publicados por Kearns et al., (2017) de ranas en cautiverio, muestran que una infección previa de Bd provoca un cambio en la composición del microbioma fúngico, además de presentar un mayor número de OTU con la capacidad de inhibir al patógeno. Los datos obtenidos en este trabajo hacen pensar que las muestras CL1, CL3, CO13, CO2, IG1, VF2 y GZ8 que se agrupan junto con las muestras infectadas con Bd (Figura 19) posiblemente estuvieron infectadas alguna vez con el patógeno y por eso su micobioma es similar al de muestras positivas para Bd, esto podría coincidir con los datos reportados por Kearns et al., (2017). Esto podría indicar que posiblemente en poblaciones donde el patógeno se encuentre de manera enzootica los anfibios podrían ser capaces de desarrollar inmunidad hacia Bd mediada por el microbioma tanto fúngico como bacteriano.

Esta idea podría probarse mediante infecciones experimentales y la caracterización del microbioma durante el proceso de infección, con el fin de identificar si la presencia de Bd se relaciona con una disminución, aumento o eliminación de ciertos OTU del micobioma. Sabemos que al menos 70% de las muestras positivas para Bd comparten 44 OTU fúngicos, por lo que sería interesante saber en qué frecuencia se encuentran estos OTU específicos antes, durante y al final del proceso de infección. Adicionalmente, sería importante analizar la capacidad de estos OTU para inhibir a Bd ya que si son capaces de inhibir al patógeno podemos pensar que estas salamandras son resistentes a la infección.

Los datos obtenidos nos permiten plantear un escenario ensería que una vez que un anfibio se infecta con Bd, el patógeno inicia un proceso de disbiosis que altera el equilibrio

de las comunidades fúngicas provocando la eliminación de ciertos OTU fúngicos. Si el anfibio sobrevive, los nichos libres en el microbioma fúngico son ocupados por OTU fúngicos que no se encuentran de manera normal sobre la piel. Esta hipótesis se apoya en la detección de los géneros fúngicos *Exophiala* y *Geomyces* que tienen reportes de ser patógenos para animales (Gargas et al., 2009; Najafzadeh et al., 2013) y que no estaban presentes en ninguna de las muestras en donde Bd no fue detectado.

Con respecto a las muestras CO8, BA2, CC6 y GZ2 en donde se detectó la presencia de Bd, pero se agrupan con el resto de las muestras en donde Bd no estaba presente, se puede pensar que estos individuos acaban de infectarse de Bd. Es importante mencionar que no todos los eventos de disbiosis deben considerarse como consecuencia de una infección o patología ya que también pueden ser la causa de estas. Sin embargo, esto ha sido analizado a mayor profundidad en enfermedades metabólicas y no en casos de infección por algún patógeno (Shin et al., 2015), por lo que cabe la posibilidad de que las diferencias observadas en la composición del microbioma se deban a la capacidad de resistir la enfermedad. Se podría pensar que las muestras infectadas con Bd agrupadas junto con los individuos no infectados sean resistentes, mientras que los individuos sanos agrupados junto con los individuos infectados sean más propensos a infectarse.

En este estudio identificamos que los ordenes Hymenochaetales y Filobasidiales están presentes en abundancias diferenciales entre salamandras con presencias y sin presencia de Bd respectivamente. Lo que podría implicar que la infección por Bd induce un evento de disbiosis del microbioma cutáneo. Por lo que es sumamente importante caracterizar la función de estos grupos de hongos para conocer si estas alteraciones en su abundancia tienen un efecto sobre la salud de los anfibios, más aun porque ahora sabemos que la quitridiomycosis promueve infecciones secundarias provocadas por bacterias de la microbiota normal de la piel como lo demostró Bletz et al., (2018)

[Factores que influyen sobre la composición del microbioma cutáneo.](#)

Se analizó el efecto de cinco variables para saber si estas tienen un efecto sobre la composición del microbioma cutáneo, estas son: A) Origen de la muestra: dentro y fuera de las cuevas. B) Especie: cada una de las especies de anfibios colectadas y las muestras ambientales agrupadas como el conjunto de cuevas. C) Localidad: individuos pertenecientes a cada una de las localidades visitadas. D) Tipo de las muestras: se clasificaron como muestras de Anuros, Caudata y las muestras ambientales. E) Presencia de Bd: individuos con presencia o ausencia de Bd.

Los resultados indican que no existe soporte estadístico que señalen que alguna de las variables analizadas tiene un efecto sobre la diversidad alfa de las muestras (Tabla 3, Anexo 2). Sin embargo, hay que tener en cuenta que esto podría deberse a la falta de datos y su efecto sobre el poder estadístico de la prueba ya que en algunos casos como el del efecto de la especie del hospedero solo se contaba con una o dos muestras para algunas especies, mientras que para otras se analizaron hasta 14 individuos. Es el mismo caso para el efecto de Bd sobre la composición donde solo 12/58 muestras fueron positivas para Bd, o el efecto del origen de la muestra donde solo 9/68 muestras se colectaron fuera de las cuevas.

Debido a lo observado en los resultados de los análisis de diversidad alfa, se decidió generar subsets de datos con el fin de aumentar el poder estadístico en las pruebas de diversidad beta, y se observó que en este caso variables como el tipo de muestra (Anura-Cueva, p -valor=0.016 y Caudata-Cueva, p -valor=0.037 y la presencia de Bd (p -valor=0.001) tienen un efecto significativo en la composición del microbioma. Eso indica que las muestras dentro de los grupos Caudata y Anura son más similares en la composición del microbioma cuando se compara contra las muestras de cuevas, y de igual manera las muestras con presencia de Bd son más similares entre ellas a comparación de las muestras en donde Bd no estuvo presente.

Contrario a lo observado en diversos estudios donde se analizó la porción bacteriana del microbioma de distintos modelos animales (Assis et al., 2017; Carrillo-Araujo et al., 2015; Hird et al., 2015; Kueneman et al., 2014), no se detectó un efecto de la especie del hospedero sobre la composición del microbioma (Tabla 4). Si bien la mayoría de los estudios

en donde se ha observado un efecto de la especie del hospedero sobre la composición del microbioma se han realizado analizando el microbioma intestinal (Carrillo-Araujo et al., 2015; Hird et al., 2015; Ley et al., 2008; Vences et al., 2016), el efecto del hospedero es claro. De igual manera se ha observado que en el microbioma cutáneo la filogenia del hospedero es importante en el caso de las ranas del género *Dendrobates* (Kearns et al., 2017), y que a niveles filogenéticos profundos existen diferencias en la composición del microbioma entre salamandras y ranas (Ellison et al., 2018).

Sin embargo, ese patrón no fue detectado en este trabajo lo que contrasta con una gran cantidad de estudios. Es importante mencionar que las especies analizadas en este estudio tienen tanto relaciones filogenéticas estrechas (genero *Chiropterotriton*) y distantes (genero *Ixalotriton*, *Aquiloemyza*, en incluso las muestras de Anuros) y no se detectó efecto de la identidad del hospedero en ninguno de los casos. Esto podría deberse a que no existe algún tipo de filtro por parte del hospedero hacia la porción fúngica del microbioma, como lo pueden ser los péptidos antimicrobianos producidos por los anfibios (Conlon et al., 2004; König et al., 2015), además de otras moléculas sintetizadas en las glándulas de la piel y la composición de la mucosa cutánea que difiere entre especies e incluso estadios de desarrollo y ambientes (Colombo et al., 2015; Jeckel et al., 2015; Mailho-Fontana et al., 2018). El patrón de ausencia de filtrado por el hospedero se ha observado en comunidades fúngicas del microbioma de dos especies de cactáceas en donde los grupos fúngicos a nivel de orden eran similares entre ambas especies (Fonseca-García et al., 2016).

Al hablar de un mecanismo de filtrado se hace referencia a que el hospedero no tiene algún mecanismo para favorecer la colonización de algunos microorganismos. El ejemplo más claro de estos mecanismos de selección es el empleado por las leguminosas y las rizobacterias en donde las bacterias son capaces de detectar compuestos de tipo fenólico producidos por las plantas y posteriormente inicia el proceso de colonización (Silva et al., 2017; Zeller et al., 2007). Por lo tanto, cabe la posibilidad de que al no existir dichos mecanismos de selección los hongos presentes en el ambiente sean capaces de colonizar de manera indistinta a cualquier hospedero.

Adicionalmente se ha reportado que el ambiente tiene un efecto importante sobre la composición del microbioma cutáneo en distintas especies de anfibios, ya que los microorganismos en el ambiente no son los mismos cuando se compara un hábitat terrestre con un hábitat acuático (Jani y Briggs., 2018; Kueneman et al., 2014; Varela et al., 2018), por lo que el microbioma entre especies consideradas como acuáticas o terrestres es diferente; e incluso en diferentes tipos de hábitats terrestres el microbioma cutáneo es distinto (Ellison et al., 2018). Sabemos que a excepción de *C. magnipes* el resto de las salamandras analizadas en este estudio han sido colectadas tanto dentro y fuera de las cuevas, lo que podría explicar porque no se detectó una influencia del ambiente sobre la composición del micobioma, ya que al tener la capacidad de entrar y salir de las cuevas el cambio de hábitat provoca que el micobioma sea más heterogéneo entre las salamandras que nosotros colectamos dentro de las cuevas.

La única variable para la que se detectó un efecto significativo en cuanto a la composición del microbioma fue la presencia de Bd, Kearns et al., (2017) reportaron que ranas del género *Dendrobates* en cautiverio que habían sufrido quitridiomycosis previamente se observó que la composición del micobioma fúngico era diferente a la de individuos que nunca habían estado expuestos al patógeno. Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Kearns et al., (2017) en el sentido en que las muestras en las que se detecto Bd difieren en composición de la que no lo tiene, lo que hace aun mas interesante este hallazgo es que este patrón se repite sin importar que los animales se encuentren en vida libre o en cautiverio y a su identidad taxonómica.

Las diferencias observadas en este estudio se deben principalmente a OTU fúngicos del filo Basidiomycota presentes en abundancias diferenciales entre individuos con y sin presencia de Bd. Este patrón es característico de cuadros de disbiosis como se discutió anteriormente. Por lo que es factible pensar que tanto un aumento o disminución en la abundancia de ciertos OTU fúngicos aunado con la aparición de hongos como el caso de *Geomyces* o *Exophiala* presentes únicamente en las muestras con Bd sean consecuencia de un cuadro de disbiosis inducido por el patógeno.

Sabemos que los Hymenochaetales son considerados como hongos saprobios y algunos de ellos incluso como parásitos de la materia vegetal especialmente de árboles debido a su habilidad para degradar lignina (Larsson et al., 2006). Mientras que los Filobasidiales se consideran como saprobios cuando están en el suelo, además se sabe que pueden ser patógenos de animales, siendo el género *Cryptococcus* el más estudiado de este orden (Kwon-Chung et al., 2014). En este trabajo identificamos que estos dos grupos de hongos se ven afectados en mayor grado en presencia de Bd, por lo que es importante indagar sobre la función que estos cumplen llevan a cabo sobre la piel de los anfibios con el fin de conocer las consecuencias que tiene un cuadro de disbiosis inducido por Bd y que consecuencias tiene esto para el hospedero.

Recientemente Bletz et al., 2018 demostraron que bacterias de la microbiota cutánea normal pueden actuar como patógenos oportunistas en consecuencia de una infección por Bsal y causar un cuadro de septicemia. Este reporte refuerza nuestra idea de un cuadro de disbiosis inducido por los patógenos fúngicos. Aunque, también existe la posibilidad de que los hongos presentes en abundancias diferenciales sean capaces de inhibir a Bd y actuar en respuesta a la infección. Sin embargo, hay que ser cauteloso con estas especulaciones ya que no conocemos nada a nivel funcional sobre los hongos que se detectaron en este trabajo, menos aún si tiene la capacidad de inhibir a Bd y proteger a los anfibios contra la quitridiomycosis. En caso de que los hongos presentes en mayor o menor abundancia entre anfibios infectados o no, estén implicados en la protección contra patógenos estos tendrían que ser considerados como posibles probióticos al igual que las bacterias productoras de metabolitos con actividad anti Bd, de esta manera se ampliaría la gama de selección de estrategias de conservación haciendo uso de microorganismos como lo han planteado diversos grupos (Bletz et al., 2013; Brucker et al., 2008a; Woodhams et al., 2016).

Conclusiones.

En el presente trabajo se caracterizó la porción fúngica del microbioma de nueve especies de salamandras cavernícolas y se analizó el efecto de variables biológicas y ambientales sobre la composición del microbioma cutáneo de estos anfibios. Las siguientes son nuestras conclusiones principales:

- La porción fúngica del microbioma de estas salamandras está compuesta principalmente por hongos de los filos Ascomycota, Basidiomycota y Mortierellmycota, siendo los ordenes fúngicos más abundantes los Mortierellales, Canopdiales e Hypocreales.
- Identificamos 44 OTU fúngicos compartidos por el 70% de las muestras en las que Bd estuvo presente. Por lo que proponemos estos OTU como parte del núcleo del microbioma de salamandras con presencia de Bd. Por otro lado, el bajo porcentaje de OTU compartidos entre especímenes de *C. magnipes* y *C. multidentatus* indican que no existe un núcleo fúngico compartido entre individuos de la misma especie.
- La presencia de Bd en el microbioma se relaciona de manera significativa con diferencias en la composición de las comunidades fúngicas del microbioma cuando se comparan individuos sin Bd y con Bd. Por lo que proponemos que Bd induce un cuadro de disbiosis lo que altera la composición del microbioma fúngico de los anfibios.

Perspectivas.

La información obtenida en este trabajo nos permite generar un primer acercamiento sobre el microbioma fúngico cutáneo de anfibios en vida libre, y provee un panorama de acción para investigar a nivel funcional diversos grupos de hongos identificados en este trabajo, especialmente aquellos que se encuentran presentes de manera diferencial entre individuos colonizados y no por Bd.

La observación que factores biológicos y ambientales no tuvieron un efecto sobre la composición del microbioma fúngico es de llamar la atención, y es importante analizar las posibles causas de esta observación. El primer paso sería aumentar el número de las muestras incluidas en los distintos grupos con el fin de aumentar el poder estadístico al momento de realizar los análisis de diversidad. Esto con el fin de descartar diferencias metodológicas al momento de realizar comparaciones con otros estudios y verificar si los patrones de diversidad observados en este estudio son característicos de estas salamandras.

Las observaciones en cuanto al cambio que existen en la composición de las comunidades fúngicas de la piel cuando Bd está presente o no, es interesante debido a que se puede explorar la capacidad de resiliencia del microbioma durante el proceso de infección, y analizar si los eventos de disbiosis que parece que ocurren son una causa o consecuencia de la presencia del patógeno.

Estas preguntas se pueden explorar experimentalmente mediante la caracterización del microbioma a través de eventos de infección, y de esta manera saber si las diferencias en abundancia de los OTU que se ven afectados por un proceso de infección son transitorias o persistentes y como afecta esto la salud del hospedero.

Adicionalmente, un estudio enfocado a conocer porque OTU fúngicos asignados a géneros como *Geomyces* se encuentran en la piel de los anfibios en donde Bd está presente, tendría repercusiones ecológicas sumamente importantes ya podría aceptar o rechazar la idea de que los anfibios podrían estar actuando como reservorio de patógenos de otros animales.

De suma importancia sería la caracterización a nivel funcional del microbioma cutáneo ya que como se mencionó la gran parte de los OTU fúngicos detectados tiene estilos de vida como saprobios o micorrízicos cuando no habitan sobre la piel de los anfibios y este sería el primer acercamiento para conocer cuál es su rol funcional sobre la piel de los anfibios.

Sería especialmente importante para aquellos OTU del filo Glomeromycota ya que expandiría el conocimiento sobre el estilo de vida de los hongos de este filo que han sido considerados como simbiontes obligados exclusivamente de plantas y la investigación de su relación con los anfibios podría generar un cambio en el paradigma de este grupo de organismos.

Por último, se propone el aislamiento de todos los hongos que se puedan cultivar en laboratorio con el fin de analizar su capacidad para inhibir a Bd. Si se plantea una estrategia probiótica para combatir al patógeno como lo han propuesto diversos grupos (Antwis y Harrison, 2017; Bletz et al., 2013; Kearns et al., 2017; Woodhams et al., 2016), es importante considerar tanto su capacidad para inhibir al patógeno como su capacidad para colonizar, inhibir y coexistir con el resto de los microorganismos que habitan sobre la piel de los anfibios.

Anexo 1.

Tabla 5. Número de secuencias generadas para cada una de las muestras.

Identificador	Total, de secuencias en cada muestra
CL3	122,914
CM1	122,526
CL1	115,896
CO9	113,471
CB2	106,450
CRI1	103,650
CO2	100,396
GZ9	99,966
CBW	97,319
SLP3	95,792
VFW	92,662
CO13	88,079
CC2	87,121
IG1	84,324
GZ4	84,146
VF2	82,068
COW	81,740
SLP5	79,127
CC4	70,291
CC5	69,662
GZ3	69,251
TRIW	66,657
GZW	62,748
CO12	56,837
GZ7	53,341
GZ8	52,892
CGW	51,649
CL2	49,379
CO5	45,585
CB1	43,066
CG1	41,899
CG2	40,155
VF1	34,596
CC6	33,630
SALBW	30,510
SLP1	26,344
SLP6	24,421
GZ1	22,307

CO11	21,633
TRI4	20,841
CC1	18,583
SLP4	17,510
CC3	16,818
GZ5	16,729
TRI6	15,378
TRI3	15,164
CCW	15,145
SLP2	14,513
CO1	13,994
RC1	12,845
TRI7	12,645
TRI1	10,604
CO8	10,237
CO3	9,455
CO7	8,820
BA2	8,751
CL4	6,029
CO6	5,385
BA1	5,175
CO10	4,889
CO4	3,772
TRI2	3,675
TRI5	2,986
VF3	1,579
GZ6	1,483
VF4	1,340
GZ2	436
SALB1	140
Total	2,999,421

Anexo 2.

	Dentro de cueva												Fuera de cueva	
Agaricales -	24.9	21	18.1	0	18.8	18.4	0	23.5	15.3	11	10.3	1	6.6	13.2
Thelephorales -	6.2	0	11.2	0	10	10.7	50	5.9	14.6	9.7	8.1	0	38.4	3.2
Hymenochaetales -	13.6	0	25.7	0	8.4	3.7	0	20.2	1.5	27.2	18.3	0	19.7	13.9
Polyporales -	0.4	12.2	0.8	29.7	15.2	0.5	0	14.3	20	11.4	7.8	0	6.4	0.1
Filobasidiales -	0.4	0.3	5.5	59.9	4.9	11.4	0	4.9	8.5	0.2	5	23.7	0.1	13.7
Sporidiobolales -	0	21.2	13.8	0	6.1	9.7	0	0.1	3.1	0.1	28.3	54.2	0.1	3.4
unidentified -	3.7	0	8.4	0	1.8	4.7	23.8	8.2	8.5	7.8	8.7	0	10.4	10.2
Tremellales -	13.7	2.9	5.8	3.1	4.7	0.1	0	2.8	6	22.6	0.1	0	0.1	3.2
Russulales -	0.6	15.3	1.4	0	1.6	0.6	11	4.1	6.8	1.4	3.2	0	3.8	7.2
Sebacinales -	33.6	0.3	0.9	0	4.2	0.1	0	4	0.3	1	0.9	0	5.4	1.1
	A. mendozai	A. scandens	C. cieloensis	C. decoratus	C. infernalis	C. magnipes	C. mosaurei	C. multidentatus	Cave	E. cystignathoides	I. niger	N. permix	A. galeane	C. multidentatus

Figura 22. Los diez órdenes fúngicos más abundantes del filo Basidiomycota. En los recuadros del heatmap se muestra el porcentaje de secuencias asignadas a ese orden.

	Dentro de cueva												Fuera de cueva	
unidentified -	6.7	1.5	14.4	7.3	13.3	18.4	23.8	16.6	13.7	11.3	11.6	0	18.5	33.4
Tubulicrinis -	12.2	0	20.4	0	7.8	2.6	0	11.9	0.7	22.9	15.1	0	7.9	10.5
Inocybe -	4.6	19.6	15.7	0	4.2	0.8	0	18	0.6	9.4	8.8	0	5.5	4.6
Tomentella -	2.8	0	5.7	0	1.9	10.3	0	3.2	13.8	5.3	4.5	0	35.9	1.2
Rhodotorula -	0	10.2	10	0	6.1	11.7	0	0	3.1	0.1	28.3	54.2	0.1	0.7
Naganishia -	0	0.3	1.3	59.9	5.2	7	0	0.6	7.3	0	0	7.4	0	14.1
Hygrocybe -	0	0	0	0	0	13.8	0	0	0	0	0	0	0	0.6
Sebacina -	33.6	0.2	0.9	0	4.4	0.1	0	0.4	0	0.9	0.9	0	5.3	1.1
Peniophorella -	1.5	0	5.9	0	1.2	1.1	0	2.8	0.3	4.8	3.6	0	12.1	3.5
Sporobolomyces -	0	11	4.1	0	0	2.3	0	0	0	0	0	0	0	0.8
	A. mendozai	A. scandens	C. cieloensis	C. decoratus	C. infernalis	C. magnipes	C. mosaurei	C. multidentatus	Cave	E. cystignathoides	I. niger	N. permix	A. galeane	C. multidentatus

Figura 23. Los diez géneros fúngicos más abundantes del filo Basidiomycota. En los recuadros del heatmap se muestra el porcentaje de secuencias asignadas a ese género.

	Dentro de cueva												Fuera de cueva	
Capnodiales	40.8	49.2	17.1	16.9	14.5	23	23.8	13.1	24.8	8.4	16.6	27.6	13.8	34.6
Hypocreales	13	15.2	13.8	5.6	37.3	22.3	5.3	7.7	31.7	38.6	15	16.9	40	14.2
Helotiales	12.7	5.3	22	0	16.2	14.3	1.4	26.3	14.7	21.4	17.4	16.2	21.8	11.7
Pleosporales	1.5	9	7.2	14.1	3.1	18.2	22.1	0.8	7.1	1.2	6.5	5.5	2.1	15.5
Saccharomycetales	18.9	1.1	4.2	0	1	2.4	0	24.5	1.2	1.8	2.5	0	1.9	1.8
Xylariales	0	3	3.5	2	2.8	0.5	28.2	0.5	6.1	3.5	2.1	16.9	0.6	8.8
Chaetothyriales	2.2	2.8	6.2	1.8	4	0.9	14.2	4.8	3.3	5.3	8	2.4	3.8	1.9
Glomerellales	2.7	0	7.1	0	1.6	0.7	0	3.3	1.8	6.6	5.6	0	8.2	1.7
Chaetosphaeriales	3.3	0	5	0	1.7	3.5	0	2.9	0.1	7.6	4.3	0	2.7	1.5
Leotiomyces_ord_Incertae_sedis	1.6	0	0.4	3.9	8.7	0.1	0	0.4	3.4	0.5	18.6	13.1	0.4	0.1
	A. mendozai	A. scandens	C. cieloensis	C. decoratus	C. infernalis	C. magnipes	C. mosaurei	C. multidentatus	Cave	E: cystignathoides	I. niger	N. pernix	A. galeane	C. multidentatus

Figura 24. Los diez ordenes fúngicos más abundantes del filo Ascomycota. En los recuadros del heatmap se muestra el porcentaje de secuencias asignadas a ese orden.

	Dentro de cueva												Fuera de cueva	
Cladosporium -	28.1	49	9.3	15.7	12	18.7	37	1.1	12.7	3.2	14.5	28.3	10.4	31.1
unidentified -	21.2	7.5	14.9	1.1	14.4	5.9	20.3	10	5.1	14.4	10.6	16.6	10.1	4.6
Metarhizium -	0	2	1.6	0	1.9	7.8	1.4	0.6	13.2	29.3	2.8	0	28.1	1.3
Alternaria -	0	9.9	6	8.6	3.1	10.8	21.9	0.1	0	0.2	0	0	0.3	0.8
Mycosphaerella -	2.1	0	4.9	4.4	2.4	1.6	1.4	11.2	9.2	5.5	3	0	1.6	0.4
Verticillium -	3.7	0	9.1	0	2.2	1	0	4.2	0.8	8.5	6.7	0	9.8	2.4
Xenopolycyctalum -	4.6	0	8.6	0	2.1	2.2	0	4.4	0	7.5	5.5	0	4.6	2.6
Pseudogymnoascus -	0	0	0.2	5.5	7.9	0.1	0	0.3	3.7	0.2	20.2	13.4	0.2	0.2
Acremonium -	0	0	0.3	0	17.6	1.1	0	0.5	1.6	0.2	0.2	0	0.5	0
Beauveria -	0	0	3.3	0	6.7	4	0	0.2	1.7	0.4	0.1	0	0.9	0.1
	A. mendozai	A. scandens	C. cieloensis	C. decoratus	C. infernalis	C. magnipes	C. mosaurei	C. multidentatus	Cave	E. cystignathoides	I. niger	N. pernix	A. galeane	C. multidentatus

Figura 25. Los diez géneros fúngicos más abundantes del filo Ascomycota. En los recuadros del heatmap se muestra el porcentaje de secuencias asignadas a ese género.

	Dentro de cueva												Fuera de cueva	
Mortierella_parvispora	17.4	0	38.5	0	13.8	3.5	0	22.5	0.1	40	30	0	18.8	9.3
Mortierella_camargensis	0	11.8	2.2	0	22.7	0.4	0	0.5	7.2	1.5	13.5	16.1	4.5	17.8
Mortierella_humilis	0	1.6	18.4	0	3.8	0.4	2.3	1.3	11	35.3	10.7	22.1	10.3	1
Mortierella_chienii	4.8	1.4	0.4	0	3	7.7	0	23.5	9.5	0.5	4.5	3	3.6	0.1
Mortierella_gamsii	0	0	1.8	0	20.3	0.3	0.9	0.7	20.4	0.6	17	32.2	1.1	0.4
Mortierella_rostafinskii	0	6.9	1.1	0	0.7	0.2	46.7	0.3	21.1	1	3.1	3.7	17.6	0
unidentified	4.4	0	10.2	0	2.6	8.9	0	5.6	0	9.6	7.3	0	4.2	2.5
Mortierella_turficola	3	0	7.5	0	2.2	1	0	4.4	0.1	7.6	6.5	0	37.7	1.9
Mortierella_acrotona	0	0	0.4	0	7.9	7.7	0	0.2	0	0.8	1.1	0	0.2	16.2
Mortierella_umbellata	0	18.4	0.3	0	0	0	0	0.4	17.1	0.2	0.6	3.4	0.2	0.2
	A. mendozai	A. scandens	C. cieloensis	C. decoratus	C. infernalis	C. magnipes	C. mosaurei	C. multidentatus	Cave	E. cystignathoides	I. niger	N. pernix	A. galeane	C. multidentatus

Figura 26. Las diez especies fúngicas más abundantes del filo Mortierellomycota. En los recuadros del heatmap se muestra el porcentaje de secuencias asignadas a esa especie.

Anexo 3.

Tabla 6. Kruskal-Wallis pareado entre los distintos orígenes de las muestras.

Group 1	Group 2	H	p-value	q-value
inside (n=57)	outside (n=9)	0.82124465	0.36481651	0.36481651

Tabla 7. Kruskal-Wallis pareado entre los distintos puntos de muestreo.

Group 1	Group 2	H	p-value	q-value
Bosque del repetidor (n=6)	Cueva de la caída (n=7)	0.02040816	0.88640301	0.99013102
Bosque del repetidor (n=6)	El coní (n=14)	0.68027211	0.40949304	0.71931363
Bosque del repetidor (n=6)	General Zaragoza (n=9)	0.125	0.72367361	0.89394975
Bosque del repetidor (n=6)	La trinidad (n=8)	1.66666667	0.1967056	0.5949572
Bosque del repetidor (n=6)	Valle de los Fantasmas (n=5)	2.13333333	0.14412703	0.5949572
Cueva de la caída (n=7)	El coní (n=14)	0.67346939	0.41184463	0.71931363
Cueva de la caída (n=7)	General Zaragoza (n=9)	0.22689076	0.63383893	0.82826131
Cueva de la caída (n=7)	La trinidad (n=8)	0.65625	0.41788696	0.71931363
Cueva de la caída (n=7)	Valle de los Fantasmas (n=5)	1.11428571	0.29115222	0.5949572
El coní (n=14)	General Zaragoza (n=9)	0.32142857	0.57075039	0.82826131
El coní (n=14)	La trinidad (n=8)	0.29813665	0.58505294	0.82826131
El coní (n=14)	Valle de los Fantasmas (n=5)	1.68	0.19492445	0.5949572
General Zaragoza (n=9)	La trinidad (n=8)	0.92592593	0.33592381	0.61880702
General Zaragoza (n=9)	Valle de los Fantasmas (n=5)	1	0.31731051	0.5949572
La trinidad (n=8)	Valle de los Fantasmas (n=5)	1.05	0.30550709	0.5949572

Tabla 8. Kruskal-Wallis pareado entre cada una de las especies.

Group 1	Group 2	H	p-value	q-value
<i>C. cieloensis</i> (n=6)	<i>C. infernalis</i> (n=5)	1.63333333	0.20124262	0.6612562
<i>C. cieloensis</i> (n=6)	<i>C. magnipes</i> (n=13)	2.49230769	0.11440387	0.6612562
<i>C. cieloensis</i> (n=6)	<i>C. multidentatus</i> (n=14)	3.59863946	0.05782688	0.6612562
<i>C. cieloensis</i> (n=6)	Cave (n=8)	0.6	0.43857803	0.83436795
<i>C. infernalis</i> (n=5)	<i>C. magnipes</i> (n=13)	0.11902834	0.73009073	0.96006942
<i>C. infernalis</i> (n=5)	<i>C. multidentatus</i> (n=14)	0.85714286	0.35453948	0.74740755
<i>C. infernalis</i> (n=5)	Cave (n=8)	0.34285714	0.55818465	0.87937646
<i>C. magnipes</i> (n=13)	<i>C. multidentatus</i> (n=14)	0.60282575	0.4375019	0.83436795
<i>C. magnipes</i> (n=13)	Cave (n=8)	0.75524476	0.38482077	0.76964155
<i>C. magnipes</i> (n=13)	<i>E. cystignathoides</i> (n=3)	0.22171946	0.63773289	0.93855029

<i>C. multidentatus</i> (n=14)	Cave (n=8)	1.19254658	0.27481648	0.6612562
--------------------------------	------------	------------	------------	-----------

Tabla 9. Kruskal-Wallis pareado entre los tipos de las muestras.

Group 1	Group 2	H	p-value	q-value
Anura (n=5)	Caudata (n=53)	0.04317237	0.83540105	0.83540105
Anura (n=5)	Cuevas (n=8)	0.08571429	0.76969794	0.83540105
Caudata (n=53)	Cuevas (n=8)	0.69430919	0.40470252	0.83540105

Bibliografía.

- Abreu, N.A., and Taga, M.E. (2016). Decoding molecular interactions in microbial communities. *FEMS Microbiol. Rev.* *40*, 648–663.
- Ackerman, A.L., and Underhill, D.M. (2017). The mycobiome of the human urinary tract: potential roles for fungi in urology. *Ann. Transl. Med.* *5*, 31–31.
- Ainsworth, T.D., Krause, L., Bridge, T., Torda, G., Raina, J.-B., Zakrzewski, M., Gates, R.D., Padilla-Gamiño, J.L., Spalding, H.L., Smith, C., et al. (2015). The coral core microbiome identifies rare bacterial taxa as ubiquitous endosymbionts. *ISME J.* *9*, 2261–2274.
- Antwis, R.E., and Harrison, X.A. (2017). Probiotic consortia are not uniformly effective against different amphibian chytrid pathogen isolates. *Mol. Ecol.* *27*, 577–589.
- Antwis, R.E., Preziosi, R.F., Harrison, X.A., and Garner, T.W.J. (2015). Amphibian Symbiotic Bacteria Do Not Show a Universal Ability To Inhibit Growth of the Global Panzootic Lineage of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Appl. Environ. Microbiol.* *81*, 3706–3711.
- Assis, A.B. de, Barreto, C.C., and Navas, C.A. (2017). Skin microbiota in frogs from the Brazilian Atlantic Forest: Species, forest type, and potential against pathogens. *PLOS ONE* *12*, e0179628.
- Bakker, P.A.H.M., Doornbos, R.F., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., and Pieterse, C.M.J. (2013). Induced Systemic Resistance and the Rhizosphere Microbiome. *Plant Pathol. J.* *29*, 136–143.
- Barrio-Amoros, C. (2016). A new Mexican locality for the endangered salamander *Nyctanolis pernix* (Caudata: Plethodontidae). *Mesoamerican Herpetol.* *3*, 534–536.
- Bayer, E.A., Belaich, J.-P., Shoham, Y., and Lamed, R. (2004). The Cellulosomes: Multienzyme Machines for Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* *58*, 521–554.
- Becker, M.H., Richards-Zawacki, C.L., Gratwicke, B., and Belden, L.K. (2014). The effect of captivity on the cutaneous bacterial community of the critically endangered Panamanian golden frog (*Atelopus zeteki*). *Biol. Conserv.* *176*, 199–206.
- Behie, S.W., Jones, S.J., and Bidochka, M.J. (2015). Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecol.* *13*, 112–119.
- Bensch, K., Groenewald, J.Z., Dijksterhuis, J., Starink-Willemse, M., Andersen, B., Summerell, B.A., Shin, H.-D., Dugan, F.M., Schroers, H.-J., Braun, U., et al. (2010). Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Stud. Mycol.* *67*, 1–94.
- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J., and Bakker, P.A.H.M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* *17*, 478–486.
- 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., et al. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality

associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 9031–9036.

Bird, A.K., Prado-Irwin, S.R., Vredenburg, V.T., and Zink, A.G. (2018). Skin Microbiomes of California Terrestrial Salamanders Are Influenced by Habitat More Than Host Phylogeny. *Front. Microbiol.* *9*.

Blaalid, R., Kumar, S., Nilsson, R.H., Abarenkov, K., Kirk, P.M., and Kauserud, H. (2013). ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Mol. Ecol. Resour.* *13*, 218–224.

Bletz, M.C., Loudon, A.H., Becker, M.H., Bell, S.C., Woodhams, D.C., Minbiole, K.P.C., and Harris, R.N. (2013). Mitigating amphibian chytridiomycosis with bioaugmentation: characteristics of effective probiotics and strategies for their selection and use. *Ecol. Lett.* *16*, 807–820.

Bletz, M.C., Archer, H., Harris, R.N., McKenzie, V.J., Rabemananjara, F.C.E., Rakotoarison, A., and Vences, M. (2017a). Host Ecology Rather Than Host Phylogeny Drives Amphibian Skin Microbial Community Structure in the Biodiversity Hotspot of Madagascar. *Front. Microbiol.* *8*.

Bletz, M.C., Myers, J., Woodhams, D.C., Rabemananjara, F.C.E., Rakotonirina, A., Weldon, C., Edmonds, D., Vences, M., and Harris, R.N. (2017b). Estimating Herd Immunity to Amphibian Chytridiomycosis in Madagascar Based on the Defensive Function of Amphibian Skin Bacteria. *Front. Microbiol.* *8*.

Bletz, M.C., Perl, R.G.B., and Vences, M. (2017c). Skin microbiota differs drastically between co-occurring frogs and newts. *R. Soc. Open Sci.* *4*, 170107.

Bletz, M.C., Vences, M., Sabino-Pinto, J., Taguchi, Y., Shimizu, N., Nishikawa, K., and Kurabayashi, A. (2017d). Cutaneous microbiota of the Japanese giant salamander (*Andrias japonicus*), a representative of an ancient amphibian clade. *Hydrobiologia* *795*, 153–167.

Bletz, M.C., Kelly, M., Sabino-Pinto, J., Bales, E., Van Praet, S., Bert, W., Boyen, F., Vences, M., Steinfartz, S., Pasmans, F., et al. (2018). Disruption of skin microbiota contributes to salamander disease. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* *285*, 20180758.

Borcard, D., Gillet, F., and Legendre, P. (2011). *Numerical Ecology with R* (Springer International Publishing).

Bordenstein, S.R., and Theis, K.R. (2015). Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes. *PLOS Biol.* *13*, e1002226.

Briggs, C.J., Knapp, R.A., and Vredenburg, V.T. (2010). Enzootic and epizootic dynamics of the chytrid fungal pathogen of amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 9695–9700.

Brucker, R.M., Harris, R.N., Schwantes, C.R., Gallaher, T.N., Flaherty, D.C., Lam, B.A., and Minbiole, K.P.C. (2008a). Amphibian Chemical Defense: Antifungal Metabolites of the Microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the Salamander *Plethodon cinereus*. *J. Chem. Ecol.* *34*, 1422–1429.

Brucker, R.M., Baylor, C.M., Walters, R.L., Lauer, A., Harris, R.N., and Minbiole, K.P.C. (2008b). The Identification of 2,4-diacetylphloroglucinol as an Antifungal Metabolite Produced by Cutaneous Bacteria of the Salamander *Plethodon cinereus*. *J. Chem. Ecol.* *34*, 39–43.

- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., and Holmes, S.P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* *13*, 581–583.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., and Holmes, S.P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J.* *11*, 2639–2643.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* *7*, 335–336.
- Carrillo-Araujo, M., Tañón, N., Alcántara-Hernández, R.J., Gaona, O., Schondube, J.E., Medellín, R.A., Jansson, J.K., and Falcón, L.I. (2015). Phyllostomid bat microbiome composition is associated to host phylogeny and feeding strategies. *Front. Microbiol.* *6*.
- Cassone, M., Serra, P., Mondello, F., Girolamo, A., Scafetti, S., Pistella, E., and Venditti, M. (2003). Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* Subtype *boulardii* Fungemia in Patients Neighboring Those Treated with a Probiotic Preparation of the Organism. *J. Clin. Microbiol.* *41*, 5340–5343.
- Cheeptham, N. (2013). *Cave microbiomes: a novel resource for drug discovery* (New York: Springer). First Edition. pp, 50-100.
- Cheng, T.L., Rovito, S.M., Wake, D.B., and Vredenburg, V.T. (2011). Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 9502–9507.
- Colombo, B.M., Scalvenzi, T., Benlamara, S., and Pollet, N. (2015). Microbiota and Mucosal Immunity in Amphibians. *Front. Immunol.* *6*, 1-5.
- Conlon, J.M., Kolodziejek, J., and Nowotny, N. (2004). Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* *1696*, 1–14.
- Culver, D.C. (2005). *Encyclopedia of caves* (Amsterdam: Elsevier). First Edition. pp, 166-196, 485-491.
- Darda, D.M. (1994). Allozyme Variation and Morphological Evolution among Mexican Salamanders of the Genus *Chiropoterotriton* (Caudata: Plethodontidae). *26*.
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., and Andersen, G.L. (2006). Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 5069–5072.
- Ding, T., and Schloss, P.D. (2014). Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature* *509*, 357–360.
- D.J. McLaughlin, and J.W. Spatafora (2002). *The Mycota. A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research.*

- Dong, Y., Manfredini, F., and Dimopoulos, G. (2009). Implication of the Mosquito Midgut Microbiota in the Defense against Malaria Parasites. *PLOS Pathog.* 5, e1000423.
- Driver, F., Milner, R.J., and Trueman, J.W.H. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol. Res.* 104, 134–150.
- Ellison, S., Rovito, S., Parra-Olea, G., Vásquez-Almazán, C., Flechas, S.V., Bi, K., and Vredenburg, V.T. (2018). The Influence of Habitat and Phylogeny on the Skin Microbiome of Amphibians in Guatemala and Mexico. *Microb. Ecol.*
- Engel, A.S., Porter, M.L., Stern, L.A., Quinlan, S., and Bennett, P.C. (2004). Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic springs dominated by chemolithoautotrophic “Epsilonproteobacteria.” *FEMS Microbiol. Ecol.* 51, 31–53.
- Fisher, M.C., Koenig, G.L., White, T.J., San-Blas, G., Negroni, R., Alvarez, I.G., Wanke, B., and Taylor, J.W. (2001). Biogeographic range expansion into South America by *Coccidioides immitis* mirrors New World patterns of human migration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 4558–4562.
- Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L., and Gurr, S.J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484, 186–194.
- Fitzpatrick, B.M., and Allison, A.L. (2014). Similarity and differentiation between bacteria associated with skin of salamanders (*Plethodon jordani*) and free-living assemblages. *FEMS Microbiol. Ecol.* 88, 482–494.
- Fonseca-García, C., Coleman-Derr, D., Garrido, E., Visel, A., Tringe, S.G., and Partida-Martínez, L.P. (2016). The Cacti Microbiome: Interplay between Habitat-Filtering and Host-Specificity. *Front. Microbiol.* 7.
- Gargas, A., Trest, M.T., Christensen, M., Volk, T.J., and Blehert, D.S. (2009). *Geomyces destructans* sp. nov. associated with bat white-nose syndrome. *Mycotaxon* 108, 147–154.
- Garmyn, A., Rooij, P.V., Pasmans, F., Hellebuyck, T., Broeck, W.V.D., Haesebrouck, F., and Martel, A. (2012). Waterfowl: Potential Environmental Reservoirs of the Chytrid Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLOS ONE* 7, e35038.
- Goodrich, J.K., Di Rienzi, S.C., Poole, A.C., Koren, O., Walters, W.A., Caporaso, J.G., Knight, R., and Ley, R.E. (2014). Conducting a Microbiome Study. *Cell* 158, 250–262.
- Gorički, Š., Niemiller, M.L., and Fenolio, D.B. (2012). Salamanders. In *Encyclopedia of Caves*, (Elsevier), pp. 665–676.
- Gray, T.R.G., and Baxby, P. (1968). Chitin decomposition in soil: II. The ecology of chitinoclastic micro-organisms in forest soil. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 51, 293–309.
- Halwachs, B., Madhusudhan, N., Krause, R., Nilsson, R.H., Moissl-Eichinger, C., Högenauer, C., Thallinger, G.G., and Gorkiewicz, G. (2017). Critical Issues in Mycobiota Analysis. *Front. Microbiol.* 8.

- Han, G.G., Lee, J.-Y., Jin, G.-D., Park, J., Choi, Y.H., Kang, S.-K., Chae, B.J., Kim, E.B., and Choi, Y.-J. (2018). Tracing of the fecal microbiota of commercial pigs at five growth stages from birth to shipment. *Sci. Rep.* *8*, 6012.
- He, J., Yi, L., Hai, L., Ming, L., Gao, W., and Ji, R. (2018). Characterizing the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract segments of the Bactrian camel. *Sci. Rep.* *8*.
- Heard, M., Smith, K.F., and Ripp, K. (2011). Examining the Evidence for Chytridiomycosis in Threatened Amphibian Species. *PLoS ONE* *6*, e23150.
- Hegstrand, L.R., and Hine, R.J. (1986). Variations of brain histamine levels in germ-free and nephrectomized rats. *Neurochem. Res.* *11*, 185–191.
- van der Heijden, M.G., Bruin, S. de, Luckerhoff, L., van Logtestijn, R.S., and Schlaeppli, K. (2016). A widespread plant-fungal-bacterial symbiosis promotes plant biodiversity, plant nutrition and seedling recruitment. *ISME J.* *10*, 389–399.
- Hervant, F., Mathieu, J., and Durand, J. (2001). Behavioural, physiological and metabolic responses to long-term starvation and refeeding in a blind cave-dwelling (*Proteus anguinus*) and a surface-dwelling (*Euproctus asper*) salamander. *J. Exp. Biol.* *204*, 269–281.
- Hill, A.J., Leys, J.E., Bryan, D., Erdman, F.M., Malone, K.S., Russell, G.N., Applegate, R.D., Fenton, H., Niedringhaus, K., Miller, A.N., et al. (2017). Common Cutaneous Bacteria Isolated from Snakes Inhibit Growth of *Ophidiomyces ophidiicola*. *EcoHealth* *1–12*.
- Hird, S.M. (2017). Evolutionary Biology Needs Wild Microbiomes. *Front. Microbiol.* *8*.
- Hird, S.M., Sánchez, C., Carstens, B.C., and Brumfield, R.T. (2015). Comparative Gut Microbiota of 59 Neotropical Bird Species. *Front. Microbiol.* *6*.
- Huffnagle, G.B., and Noverr, M.C. (2013). The emerging world of the fungal microbiome. *Trends Microbiol.* *21*, 334–341.
- Jani, A.J., and Briggs, C.J. (2018). Host and Aquatic Environment Shape the Amphibian Skin Microbiome but Effects on Downstream Resistance to the Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* Are Variable. *Front. Microbiol.* *9*.
- Jeckel, A.M., Saporito, R.A., and Grant, T. (2015). The relationship between poison frog chemical defenses and age, body size, and sex. *Front. Zool.* *12*, 27.
- Jia, X., Dini-Andreote, F., and Falcão Salles, J. (2018). Community Assembly Processes of the Microbial Rare Biosphere. *Trends Microbiol.*
- Jousset, A., Bienhold, C., Chatzinotas, A., Gallien, L., Gobet, A., Kurm, V., Küsel, K., Rillig, M.C., Rivett, D.W., Salles, J.F., et al. (2017). Where less may be more: how the rare biosphere pulls ecosystems strings. *ISME J.* *11*, 853–862.

- Kauffman, C.A. (2007). Histoplasmosis: a Clinical and Laboratory Update. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 115–132.
- Kearns, P.J., Fischer, S., Fernández-Beascoetxea, S., Gabor, C.R., Bosch, J., Bowen, J.L., Tlustý, M.F., and Woodhams, D.C. (2017). Fight Fungi with Fungi: Antifungal Properties of the Amphibian Mycobiome. *Front. Microbiol.* 8.
- Kilpatrick, A.M., Briggs, C.J., and Daszak, P. (2010). The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends Ecol. Evol.* 25, 109–118.
- Koch, H., and Schmid-Hempel, P. (2011). Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 19288–19292.
- Kõljalg, U., Larsson, K.-H., Abarenkov, K., Nilsson, R.H., Alexander, I.J., Eberhardt, U., Erland, S., Høiland, K., Kjølner, R., Larsson, E., et al. (2005). UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* 166, 1063–1068.
- König, E., Bininda-Emonds, O.R.P., and Shaw, C. (2015). The diversity and evolution of anuran skin peptides. *Peptides* 63, 96–117.
- Kuchta, S.R., Parks, D.S., Mueller, R.L., Wake, D.B., and Riddle, B. (2009). Closing the Ring: Historical Biogeography of the Salamander Ring Species *Ensatina eschscholtzii*. *J. Biogeogr.* 36, 982–995.
- Kueneman, J.G., Parfrey, L.W., Woodhams, D.C., Archer, H.M., Knight, R., and McKenzie, V.J. (2014). The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages. *Mol. Ecol.* 23, 1238–1250.
- Kueneman, J.G., Woodhams, D.C., Van Treuren, W., Archer, H.M., Knight, R., and McKenzie, V.J. (2016). Inhibitory bacteria reduce fungi on early life stages of endangered Colorado boreal toads (*Anaxyrus boreas*). *ISME J.* 10, 934.
- Kwon-Chung, K.J., Fraser, J.A., Doering, T.L., Wang, Z.A., Janbon, G., Idnurm, A., and Bahn, Y.-S. (2014). *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4, a019760–a019760.
- Larsson, K.-H., Parmasto, E., Fischer, M., Langer, E., Nakasone, K.K., and Redhead, S.A. (2006). Hymenochaetales: a molecular phylogeny for the hymenochaetoid clade. 11.
- Lemieux-Labonté, V., Simard, A., Willis, C.K.R., and Lapointe, F.-J. (2017). Enrichment of beneficial bacteria in the skin microbiota of bats persisting with white-nose syndrome. *Microbiome* 5, 115.
- Ley, R.E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P., Ramey, R.R., Bircher, J.S., Schlegel, M.L., Tucker, T.A., Schrenzel, M.D., Knight, R., et al. (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 320, 1647.
- Li, F., Chen, L., Redmile-Gordon, M., Zhang, J., Zhang, C., Ning, Q., and Li, W. (2018). *Mortierella elongata*'s roles in organic agriculture and crop growth promotion in a mineral soil. *Land Degrad. Dev.* 29, 1642–1651.

- Li, K., Bihan, M., and Methé, B.A. (2013). Analyses of the Stability and Core Taxonomic Memberships of the Human Microbiome. *PLoS ONE* 8, e63139.
- Li, Q., Han, Y., Dy, A.B.C., and Hagerman, R.J. (2017). The Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorders. *Front. Cell. Neurosci.* 11.
- Li, X.-Y., Pietschke, C., Fraune, S., Altrock, P.M., Bosch, T.C.G., and Traulsen, A. (2015). Which games are growing bacterial populations playing? *J. R. Soc. Interface* 12, 20150121.
- Lilleskov, E.A., and Bruns, T.D. (2005). Spore dispersal of a resupinate ectomycorrhizal fungus, *Tomentella sublilacina*, via soil food webs. *Mycologia* 97, 762–769.
- Lorch, J.M., Knowles, S., Lankton, J.S., Michell, K., Edwards, J.L., Kapfer, J.M., Staffen, R.A., Wild, E.R., Schmidt, K.Z., Ballmann, A.E., et al. (2016). Snake fungal disease: an emerging threat to wild snakes. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 371, 20150457.
- Loudon, A.H., Woodhams, D.C., Parfrey, L.W., Archer, H., Knight, R., McKenzie, V., and Harris, R.N. (2014a). Microbial community dynamics and effect of environmental microbial reservoirs on red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*). *ISME J.* 8, 830–840.
- Loudon, A.H., Holland, J.A., Umile, T.P., Burzynski, E.A., Minbiole, K.P.C., and Harris, R.N. (2014b). Interactions between amphibians' symbiotic bacteria cause the production of emergent anti-fungal metabolites. *Front. Microbiol.* 5.
- Luna-Reyes, R., Pérez-López, P.E., García-Jiménez, M.A., Jiménez-Lang, O., Gutiérrez-Morales, O.S., Cundapí-Pérez, C., Coss, J.E.D., Peña, L.J.C., Pérez-Sánchez, J.E., and Serrano, A.R. Registros adicionales recientes, distribución potencial y notas sobre el hábitat y ecología de la salamandra saltarina negra *Ixalotriton niger* (Caudata: Plethodontidae). 14.
- Lurie, Y., Wasser, S.P., Taha, M., Shehade, H., Nijim, J., Hoffmann, Y., Basis, F., Vardi, M., Lavon, O., Suaed, S., et al. (2009). Mushroom poisoning from species of genus *Inocybe* (fiber head mushroom): a case series with exact species identification. *Clin. Toxicol.* 47, 562–565.
- Mailho-Fontana, P.L., Antoniazzi, M.M., Sciani, J.M., Pimenta, D.C., Barbaro, K.C., and Jared, C. (2018). Morphological and biochemical characterization of the cutaneous poison glands in toads (*Rhinella marina* group) from different environments. *Front. Zool.* 15, 46.
- Man, B., Wang, H., Xiang, X., Wang, R., Yun, Y., and Gong, L. (2015). Phylogenetic diversity of culturable fungi in the Heshang Cave, central China. *Front. Microbiol.* 6.
- Martel, A., Spitzen-van der Sluijs, A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M.C., Woeltjes, A., Bosman, W., Chiers, K., Bossuyt, F., et al. (2013). *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 15325–15329.
- Martel, A., Blooi, M., Adriaensen, C., Rooij, P.V., Beukema, W., Fisher, M.C., Farrer, R.A., Schmidt, B.R., Tobler, U., Goka, K., et al. (2014). Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science* 346, 630–631.

- McKendrick, S.L., Leake, J.R., Taylor, D.L., and Read, D.J. (2002). Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. *New Phytol.* *154*, 233–247.
- McKenzie, V.J., Bowers, R.M., Fierer, N., Knight, R., and Lauber, C.L. (2012). Co-habiting amphibian species harbor unique skin bacterial communities in wild populations. *ISME J.* *6*, 588–596.
- Meason-Smith, C., Diesel, A., Patterson, A.P., Older, C.E., Mansell, J.M., Suchodolski, J.S., and Rodrigues Hoffmann, A. (2015). What is living on your dog's skin? Characterization of the canine cutaneous mycobiota and fungal dysbiosis in canine allergic dermatitis. *FEMS Microbiol. Ecol.* *91*, fiv139.
- Minnis, A.M., and Lindner, D.L. (2013). Phylogenetic evaluation of *Geomyces* and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. nov., in bat hibernacula of eastern North America. *Fungal Biol.* *117*, 638–649.
- Najafzadeh, M.J., Suh, M.K., Lee, M.H., Ha, G.Y., Kim, J.R., Kim, T.H., Lee, H.J., Choi, J.S., Meis, J.F., and De Hoog, G.S. (2013). Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Exophiala equina*, with susceptibility to eight antifungal drugs. *J. Med. Microbiol.* *62*, 797–800.
- Nilsson, R.H., Larsson, K.-H., Taylor, A.F.S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T.S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F.O., Tedersoo, L., et al. (2018). The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Res.* *47*, D259–D264.
- Oehl, F., Sieverding, E., Palenzuela, J., Ineichen, K., and Alves da Silva, G. (2011). Advances in Glomeromycota taxonomy and classification.
- O'Hanlon, S.J., Rieux, A., Farrer, R.A., Rosa, G.M., Waldman, B., Bataille, A., Kosch, T.A., Murray, K.A., Brankovics, B., Fumagalli, M., et al. (2018). Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science* *360*, 621–627.
- Oromí Durich, J. (2000). Enfermedades emergentes y reemergentes: algunas causas y ejemplos. *Med. Integral* 79–82.
- Parra-Olea, G. (2003). Phylogenetic relationships of the genus *Chiropterotriton* (Caudata: Plethodontidae) based on 16S ribosomal mtDNA. *Can. J. Zool.* *81*, 2048–2060.
- Parra-Olea, G., Flores-Villela, O., and Mendoza-Almeralla, C. (2014). Biodiversidad de anfibios en México. *Rev. Mex. Biodivers.* *85*, 460–466.
- Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J.A., Bonazzi, V., McEwen, J.E., Wetterstrand, K.A., Deal, C., et al. (2009). The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* *19*, 2317–2323.
- Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C.M., and Bakker, P.A.H.M. (2014). Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* *52*, 347–375.

- Prescott, S.L. (2017). History of medicine: Origin of the term microbiome and why it matters. *Hum. Microbiome J.* 4, 24–25.
- Pusz, W., Baturó-Cieśniewska, A., and Zwiłacz-Kozica, T. (2017). Culturable Fungi in Brown Bear Cave Dens. *Pol. J. Environ. Stud.* 27, 247–255.
- Pusz, W., Król, M., and Zwiłacz-Kozica, T. (2018). Airborne fungi as indicators of ecosystem disturbance: an example from selected Tatra Mountains caves (Poland). *Aerobiologia* 34, 111–118.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65.
- R. Silva, L., Bento, C., Carolina Gonçalves, A., David Flores-Félix, J., Helena Ramírez-Bahena, M., Peix, A., and Velázquez, E. (2017). Legume bioactive compounds: influence of rhizobial inoculation. *AIMS Microbiol.* 3, 267–278.
- Raymundo, T., Contreras, M., Bautista-Hernández, S., and Díaz-Moreno, R. (2012). Hongos Tremeloides del bosque Las Bayas, Municipio de Pueblo Nuevo, Durango, México. 19.
- Rebollar, E.A., Antwis, R.E., Becker, M.H., Belden, L.K., Bletz, M.C., Brucker, R.M., Harrison, X.A., Hughey, M.C., Kueneman, J.G., Loudon, A.H., et al. (2016). Using “Omics” and Integrated Multi-Omics Approaches to Guide Probiotic Selection to Mitigate Chytridiomycosis and Other Emerging Infectious Diseases. *Front. Microbiol.* 7.
- Rebollar, E.A., Gutiérrez-Preciado, A., Noecker, C., Eng, A., Hughey, M.C., Medina, D., Walke, J.B., Borenstein, E., Jensen, R.V., Belden, L.K., et al. (2018). The Skin Microbiome of the Neotropical Frog *Craugastor fitzingeri*: Inferring Potential Bacterial-Host-Pathogen Interactions From Metagenomic Data. *Front. Microbiol.* 9.
- Reynolds, H.T., and Barton, H.A. (2014). Comparison of the White-Nose Syndrome Agent *Pseudogymnoascus destructans* to Cave-Dwelling Relatives Suggests Reduced Saprotrophic Enzyme Activity. *PLoS ONE* 9, e86437.
- Rimer, R., L., and Briggler, J., T. (2010). Occurrence of the Amphibian Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in Ozark Caves, Missouri, USA. 41, 175–177.
- Rollins-Smith, L.A., Ramsey, J.P., Pask, J.D., Reinert, L.K., and Woodhams, D.C. (2011). Amphibian Immune Defenses against Chytridiomycosis: Impacts of Changing Environments. *Integr. Comp. Biol.* 51, 552–562.
- Rovito, S.M., and Parra-Olea, G. (2015). Two new species of Chiropterotriton (Caudata: Plethodontidae) from northern Mexico. *Zootaxa* 4048, 57.
- Rovito, S.M., Parra-Olea, G., Vásquez-Almazán, C.R., Papenfuss, T.J., and Wake, D.B. (2009). Dramatic declines in neotropical salamander populations are an important part of the global amphibian crisis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 3231–3236.

Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., and Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur. J. Nutr.* *57*, 1–24.

Schumacher, J. (2017). How light affects the life of *Botrytis*. *Fungal Genet. Biol.* *106*, 26–41.

Schüßler, A., Schwarzott, D., and Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* *105*, 1413–1421.

Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol.* *14*, e1002533.

Shin, N.-R., Whon, T.W., and Bae, J.-W. (2015). Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* *33*, 496–503.

Smith, D.P., and Peay, K.G. (2014). Sequence Depth, Not PCR Replication, Improves Ecological Inference from Next Generation DNA Sequencing. *PLOS ONE* *9*, e90234.

Stewart, R.D., Auffret, M.D., Warr, A., Wisner, A.H., Press, M.O., Langford, K.W., Liachko, I., Snelling, T.J., Dewhurst, R.J., Walker, A.W., et al. (2018). Assembly of 913 microbial genomes from metagenomic sequencing of the cow rumen. *Nat. Commun.* *9*.

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

Tisch, D., and Schmoll, M. (2010). Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *85*, 1259–1277.

Torres, D.E., Rojas-Martínez, R.I., Zavaleta-Mejía, E., Guevara-Fefer, P., Márquez-Guzmán, G.J., and Pérez-Martínez, C. (2017). *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium pseudocladosporioides* as potential new fungal antagonists of *Puccinia horiana* Henn., the causal agent of chrysanthemum white rust. *PLOS ONE* *12*, e0170782.

Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., et al. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* *457*, 480–484.

Van Rooij, P., Martel, A., Haesebrouck, F., and Pasmans, F. (2015). Amphibian chytridiomycosis: a review with focus on fungus-host interactions. *Vet. Res.* *46*.

Vandenkoornhuysse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., and Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol.* *206*, 1196–1206.

Vanderwolf, K., Malloch, D., McAlpine, D., and Forbes, G. (2013). A world review of fungi, yeasts, and slime molds in caves. *Int. J. Speleol.* *42*, 77–96.

Vanderwolf, K., Malloch, D., Ivanova, N., and McAlpine, D. (2016). Lack of cave-associated mammals influences the fungal assemblages of insular solution caves in eastern Canada. *J. Cave Karst Stud.* *78*, 198–207.

- Varela, B.J., Lesbarrères, D., Ibáñez, R., and Green, D.M. (2018). Environmental and Host Effects on Skin Bacterial Community Composition in Panamanian Frogs. *Front. Microbiol.* *9*.
- Vences, M., Lyra, M.L., Kueneman, J.G., Bletz, M.C., Archer, H.M., Canitz, J., Handreck, S., Randrianiaina, R.-D., Struck, U., Bhujju, S., et al. (2016). Gut bacterial communities across tadpole ecomorphs in two diverse tropical anuran faunas. *Sci. Nat.* *103*.
- Virgin, H.W. (2014). The Virome in Mammalian Physiology and Disease. *Cell* *157*, 142–150.
- Vo, A.-T.E., and Jedlicka, J.A. (2014). Protocols for metagenomic DNA extraction and Illumina amplicon library preparation for faecal and swab samples. *Mol. Ecol. Resour.* *14*, 1183–1197.
- Walke, J.B., Becker, M.H., Loftus, S.C., House, L.L., Cormier, G., Jensen, R.V., and Belden, L.K. (2014). Amphibian skin may select for rare environmental microbes. *ISME J.* *8*, 2207–2217.
- Wang, W., Ma, X., Ma, Y., Mao, L., Wu, F., Ma, X., An, L., and Feng, H. (2011). Molecular characterization of airborne fungi in caves of the Mogao Grottoes, Dunhuang, China. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* *65*, 726–731.
- Warcup, J.H. (1951). The ecology of soil fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* *34*, 376–399.
- White, J.R., Navlakha, S., Nagarajan, N., Ghodsi, M.-R., Kingsford, C., and Pop, M. (2010). Alignment and clustering of phylogenetic markers - implications for microbial diversity studies. *BMC Bioinformatics* *11*, 152.
- Woodhams, D.C., Bletz, M., Kueneman, J., and McKenzie, V. (2016). Managing Amphibian Disease with Skin Microbiota. *Trends Microbiol.* *24*, 161–164.
- Woodhams, D.C., LaBumbard, B.C., Barnhart, K.L., Becker, M.H., Bletz, M.C., Escobar, L.A., Flechas, S.V., Forman, M.E., Iannetta, A.A., Joyce, M.D., et al. (2018). Prodigiosin, Violacein, and Volatile Organic Compounds Produced by Widespread Cutaneous Bacteria of Amphibians Can Inhibit Two *Batrachochytrium* Fungal Pathogens. *Microb. Ecol.* *75*, 1049–1062.
- Xia, Y., and Sun, J. (2017). Hypothesis testing and statistical analysis of microbiome. *Genes Dis.* *4*, 138–148.
- Xue, Z., Zhang, W., Wang, L., Hou, R., Zhang, M., Fei, L., Zhang, X., Huang, H., Bridgewater, L.C., Jiang, Y., et al. (2015). The Bamboo-Eating Giant Panda Harbors a Carnivore-Like Gut Microbiota, with Excessive Seasonal Variations. *MBio* *6*, e00022-15.
- Yildirim, S., Yeoman, C.J., Sipos, M., Torralba, M., Wilson, B.A., Goldberg, T.L., Stumpf, R.M., Leigh, S.R., White, B.A., and Nelson, K.E. (2010). Characterization of the Fecal Microbiome from Non-Human Wild Primates Reveals Species Specific Microbial Communities. *PLoS ONE* *5*, e13963.
- Zeller, S.L., Brandl, H., and Schmid, B. (2007). Host-Plant Selectivity of Rhizobacteria in a Crop/Weed Model System. *PLOS ONE* *2*, e846.
- Zhang, T., Victor, T.R., Rajkumar, S.S., Li, X., Okoniewski, J.C., Hicks, A.C., Davis, A.D., Broussard, K., LaDeau, S.L., Chaturvedi, S., et al. (2014). Mycobiome of the bat white nose syndrome affected

caves and mines reveals diversity of fungi and local adaptation by the fungal pathogen *Pseudogymnoascus* (*Geomyces*) *destructans*. *PloS One* 9, e108714.

Zhou, J., Gu, Y., Zou, C., and Mo, M. (2007). Phylogenetic Diversity of Bacteria in an Earth-Cave in Guizhou Province, Southwest of China. *J. Microbiol.* 45, 105–112.