



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO
UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA

**“Detección de patógenos fúngicos en salamandras cavernícolas de
México”**

Tesis que presenta:

IBQ. MIZRAIM OLIVARES MIRANDA

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias

En la Especialidad de:

Biotecnología de plantas

Director de tesis: Dr. Sean M. Rovito

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Genómica y Biodiversidad de Vertebrados en la Unidad de Genómica Avanzada del CINVESTAV Irapuato. Bajo la dirección del Dr. Sean M. Rovito y con la asesoría de los doctores Alfredo Heriberto Herrera Estrella y José Luis Delaye Arredondo. Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca para estudios de maestría No. 454240 otorgada durante el periodo comprendido de Septiembre del 2016 a Agosto del 2018. El proyecto No. 721 fue financiado bajo la convocatoria Investigación para Problemas Nacionales del CONACYT.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Diversidad de salamandras en México	3
1.1.1 Salamandras cavernícolas.....	4
1.1.2 <i>Chiropterotriton magnipes</i>	5
1.1.2.1 Morfología	5
1.1.2.2 Hábitat y distribución	5
1.1.2.3 Estatus de conservación.....	6
1.2 Declives en poblaciones de salamandras Neotropicales en México.....	7
1.3 Factores implicados con declives poblacionales en salamandras Neotropicales.....	8
1.3.1 Destrucción del hábitat	8
1.3.2 Cambio climático.....	9
1.3.3 Introducción de especies exóticas.....	10
1.3.4 Enfermedades infecciosas emergentes.	10
1.4 <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (Bd)	11
1.4.1 Taxonomía y Fisiología	12
1.4.2 Quitridiomycosis	13
1.5 Distribución, diagnóstico y diversificación de Bd.....	14
1.6 Bd y el declive en poblaciones de anfibios en México y la zona Neotropical.....	16
1.7 <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i>	20
JUSTIFICACIÓN.....	22
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVOS	24

II. MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1 Trabajo de campo	25
2.2 Prevalencia actual de patógenos fúngicos	27
2.3 Presencia de Bd en muestras históricas	29
2.4 Genotipificación de frotis positivos para Bd	32
III. RESULTADOS	34
3.1 Trabajo de campo	34
3.2 Prevalencia actual de patógenos fúngicos	35
3.3 Presencia de Bd en muestras históricas	37
3.4 Genotipificación de frotis históricos y contemporáneos positivos para Bd	38
IV. DISCUSION	42
CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXOS	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Salamandras cavernícolas	4
Figura 2. <i>Chiropterotriton magnipes</i>	5
Figura 3. Distribución de <i>Chiropterotriton magnipes</i>	6
Figura 4. Ciclo de vida de <i>B. dendrobatidis</i>	12
Figura 5. Signos clínicos y patología asociada a <i>B. dendrobatidis</i> (Modificado de Rooij et al 2015).....	13
Figura 6. Línea del tiempo con la media relativa de abundancia de salamandras y media de la prevalencia de Bd sitios y especies en México (Cheng et al. 2011).....	18
Figura 7. Sitios de muestreo para especímenes de <i>Chiropterotriton magnipes</i>	25
Figura 8. Patrón espacio temporal de prevalencia de Bd (barras en color rojo) contra la abundancia de ejemplares de <i>C. magnipes</i> (línea negra) en México.....	40
Figura 9. Ola epidémica de Bd	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sitios de muestreo para especímenes de <i>C. magnipes</i>	26
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la detección de Bd.....	27
Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para la detección de Bsal	29
Tabla 4. Lista de ejemplares muestreados y museos de procedencia.....	30
Tabla 5. Prevalencia de Bd en cuevas de México	35
Tabla 6. Prevalencia de Bsal en cuevas de México.....	36
Tabla 7. Prevalencia de Bd en ejemplares históricos de <i>C. magnipes</i> de México.....	37
Tabla 8. Ensayo de genotipificación de Bd	39

RESUMEN

Chiropterotriton magnipes es la única salamandra troglodítica de los Neotrópicos y es conocida por habitar solo una pequeña región de la Sierra Madre Oriental en México. Esta especie fue abundante en la década siguiente a su descripción en el año de 1965. Sin embargo, sus registros de avistamiento poblacionales fueron disminuyendo en años subsecuentes al punto de que desaparecieron de muchas localidades donde antes era común, siendo ahora clasificada como en peligro crítico de extinción. Este declive es coincidente con el de otras poblaciones de salamandras Neotropicales asociados con la emergencia de patógeno fúngico *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). Yo hipoteticé que la emergencia de Bd tuvo un rol clave en los declives de *C. magnipes*. Por medio de una técnica de muestreo no invasiva y ensayos de PCR en tiempo real se buscó la presencia de Bd en la piel de especímenes preservados en museo de *C. magnipes* colectados durante los años de 1952 a 2012. De igual manera se examinó la prevalencia de Bd en poblaciones extantes de *C. magnipes* y otras especies simpátricas de anfibios. Se examinó la prevalencia del patógeno fúngico recién descubierto *Batrachochytrium salamandivorans* (Bsal) que ha estado implicado en declives de salamandras en el continente europeo. Como resultado, obtuvimos el registro histórico más temprano del hongo en América Latina, proveyendo evidencia histórica adicional para la hipótesis sobre la “Ola pandémica de Bd”, se demostró la presencia contemporánea de Bd en cuevas de México y la ausencia de Bsal en las mismas. Mis resultados proveen un importante punto de partida histórico para el emprendimiento de acciones para preservar las pocas poblaciones extantes de *Chiropterotriton magnipes*.

ABSTRACT

Chiropterotriton magnipes is the only obligately troglodytic salamander from the Neotropics and is known from a small region of the Sierra Madre Oriental of Mexico. This species was abundant in the decade following its description in 1965, but records decreased in subsequent years to the point where it disappeared from several localities where it was common, and it is now classified as Critically Endangered. Its decline is coincident with that of other populations of Neotropical salamanders associated with the arrival of the fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). I hypothesize that the arrival of Bd played a key role in the declines of *C. magnipes*. I used a noninvasive sampling technique and qPCR assay to detect Bd in the skin of museum specimens of *C. magnipes* collected from 1952 to 2012. I also examined the prevalence of the fungus in extant populations of *C. magnipes* and other sympatric species of amphibians. Using a similar method, I examined the prevalence of the newly discovered *Batrachochytrium salamandivorans* (Bsal) a fungal pathogen that has been involved in declines of populations of salamanders in Europe. I obtained the earliest positive record of the fungus to date in Latin America, providing additional historical evidence for the “Bd epidemic wave” hypothesis, I show the current prevalence of Bd and the absence of Bsal in caves in Mexico. My results provide an important historical baseline for actions to preserve the few known remaining populations of *Chiropterotriton magnipes*.

I. INTRODUCCIÓN

La diversidad de herpetofauna en México constituye uno de los elementos más importantes de la biodiversidad del país (Flores-Villela, 1993; Flores-Villela & Gérez, 1994). Particularmente, los anfibios contribuyen considerablemente a que México sea considerado un país megadiverso, pues poseen un grado de endemismo cercano al 60% de sus especies (AmphibiaWeb, 2018). Este grupo de vertebrados es clasificado en tres órdenes: Anura (ranas y sapos), Caudata (salamandras y tritones) y Gymnophiona (cecilias) (Halliday & Adler, 2007).

1.1 Diversidad de salamandras en México

Las salamandras son un clado compuesto por 717 especies distribuidas alrededor del mundo. En México se encuentran 148 especies de este orden representadas principalmente en un solo linaje: la tribu Bolitoglossini (familia Plethodontidae o también conocidas como salamandras apulmonadas). En México se encuentran 129 especies pertenecientes a esta tribu, de las cuales 111 son endémicas, posicionando a México como uno de los países con mayor diversidad de este grupo de anfibios y particularmente con alta riqueza de esta familia de salamandras (AmphibiaWeb, 2018).

En México, la familia Plethodontidae se encuentra conformada por especies que se han diversificado en los trópicos del nuevo mundo las cuales tienen como principal característica una ausencia de pulmones por lo que la respiración se lleva a cabo completamente por medio de la piel. La mayoría de las salamandras tropicales viven a elevaciones que van desde moderadas a grandes con rangos geográficos pequeños, mientras que varias de las especies de poca altura tienen una distribución relativamente amplia. Los géneros de esta familia cuentan con diferentes grados de especialización tanto en su morfología como en su ecológica. Muchas de las especies cuentan con hábitos parcial o totalmente arborícolas, las cuales habitan en bosques mesófilos u otras asociaciones de bosques húmedos en montañas. La especialización morfológica es de manera general asociada a hábitats especializados; las especies arborícolas tienden a tener patas parcial o totalmente palmeadas y una cola prensil, mientras que especies con hábitos fosoriales

usualmente cuentan con cuerpos y colas elongados junto con piernas y patas diminutas (Wake & Lynch, 1976).

Existen 14 géneros de salamandras pertenecientes a la tribu Bolitoglossini, de los cuales cinco son endémicos a México. Uno de estos géneros endémicos al país, el género *Chiropterotriton*, está compuesto por 18 especies las cuales son generalmente parte de las especies más pequeñas, adaptadas a la vida montañosa y de hábitos terrestres, pero varias están adaptadas a la vida trepadora o arborícolas. Se le considera como un grupo ecológicamente diverso ya que algunas de estas especies viven en bromelias localizadas en bosques mesófilos, entre la hojarasca de bosques de pino, grietas de rocas e incluso en cuevas. La gran diversidad de microhábitats en los que pueden existir ha propiciado que las especies de este género y familia puedan presentar una gran variedad de ecomorfotipos especializados. Las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas al norte y este de México generalmente en áreas montañosas (Wake & Lynch, 1976; AmphibiaWeb, 2018).

1.1.1 Salamandras cavernícolas

El grupo denominado como salamandras cavernícolas es uno de los ecomorfotipos que pueden presentar algunos miembros de la familia Plethodontidae. En la zona Neotropical, este ecomorfotipo se encuentra conformado por algunas especies pertenecientes a los géneros *Chiropterotriton*, *Ixalotriton* y *Nyctanolis* (Fig. 1), las cuales han evolucionado para vivir específicamente en microhábitats troglodíticos. Este tipo de hábitats se refiere a cuevas, caracterizadas por una ausencia de luz y vegetación. Las especies cavernícolas son ejemplos únicos de adaptación en México y en la zona neotropical, por lo cual tienen un gran valor evolutivo y ecológico.



Fig. 1.- Salamandras cavernícolas. Algunas especies pertenecientes a la familia Plethodontidae que presentan un ecomorfotipo cavernícola: *Ixalotriton niger* (1), *Chiropterotriton magnipes* (2) y *Nyctanolis pernix* (3). (Fotografías: AmphibiaWeb.com, 2018).

1.1.2 *Chiropterotriton magnipes*

1.1.2.1 Morfología

Dentro del género *Chiropterotriton* se encuentra una especie que ha demostrado ser 100% especialista a estos hábitats, *Chiropterotriton magnipes*. Descrita por George B. Rabb (1965), fue considerada como una especie distinguible de todas las demás en el género debido al tamaño de sus patas y el palmeo de estas. Se consideró desde un principio verdaderamente troglodítica debido a la falta de pigmentación en la piel y sus ojos grandes y bulbosos, además de que la estructura de sus pies y extremidades largas indicarían hábitos de trepador. Desde su descripción la especie solo ha sido encontrada en cuevas siendo una especie única en el país y en el área neotropical.

La especie cuenta con un tamaño moderado teniendo una longitud total de 80–120 mm, con la cola siendo ligeramente menos de la mitad de su tamaño. La especie tiene una cabeza plana y ancha con ojos bulbosos. Cuenta con totalidad de palmeo en sus patas, con estructuras tipo almohadilla en las extremidades de sus dedos. La piel tiene una apariencia lisa y delgada de un color café claro con tonos lavanda y ligeramente más claro en la superficie ventral (Fig. 2).



Fig. 2.- *Chiropterotriton magnipes*. Adulto colectado en la cueva “El Coni”, Hidalgo (1). Adulto hembra colectado en la cueva de “La Trinidad”, San Luis Potosí (2). (Fotografías: Sean Rovito & Mizraim Olivares).

1.1.2.2 Hábitat y distribución

Chiropterotriton magnipes habita cuevas y grietas encontradas dentro de bosques de pino-encino, de igual manera diversos ejemplares han sido encontrados en un túnel debajo de una iglesia. La especie fue originalmente colectada en la Cueva de Potrerillos cerca de Ahuacatlán, San Luis Potosí, pero desde entonces ha podido ser encontrada en otras cuevas

las cuales usualmente se encuentran rodeadas por bosque mesófilo (Rabb, 1965; EDGE, 2018). Los registros de esta especie se han dado solo en cuevas encontradas dentro de la zona conformada por las provincias localizadas al sureste de San Luis Potosí, noreste de Querétaro y recientemente al norte de Hidalgo (Fig. 3).

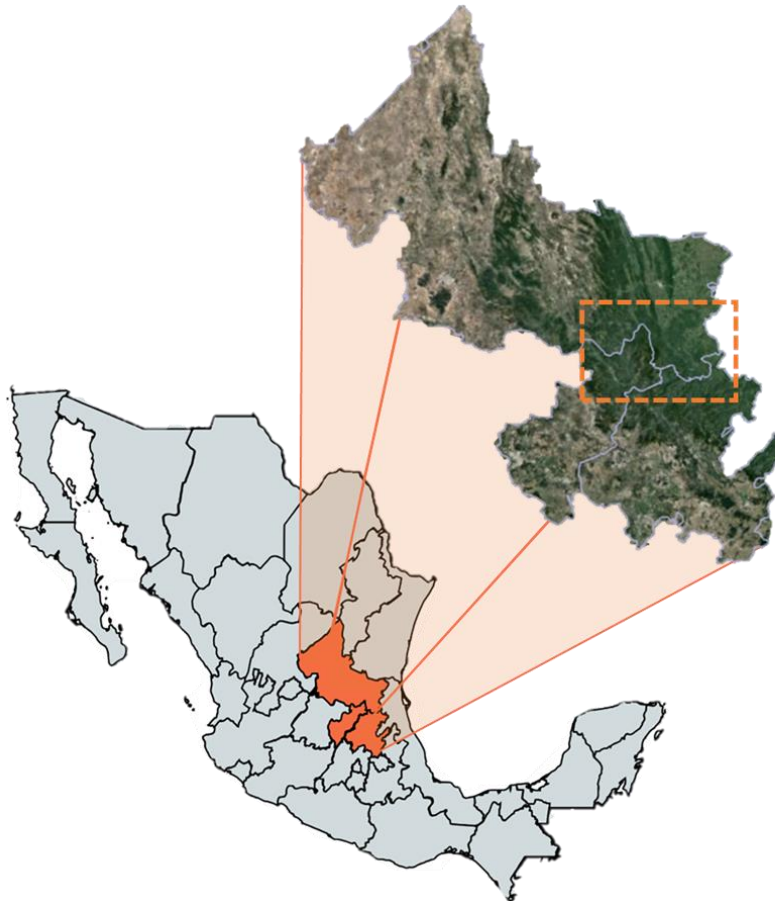


Fig. 3.- Distribución de *Chiropterotriton magnipes*.

1.1.2.3 Estatus de conservación

A pesar de no ser una especie “común”, durante los años posteriores a su descripción esta podía ser encontrada de manera regular en un microhábitat adecuado. Sin embargo, a finales de la década de los setenta sus registros fueron disminuyendo al punto de no ser encontrada en sitios donde antes era común. Lo anterior, aunado a su distribución severamente fragmentada, la ha llevado a estar en la categoría de peligro crítico siendo incluida en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) (IUCN, 2018).

1.2 Declives en poblaciones de salamandras Neotropicales en México

Chiropterotriton magnipes no es la única especie de anfibio amenazado. Actualmente, se considera que la biodiversidad global se encuentra en crisis pues se estima que un tercio de todas las especies de anfibios se encuentran amenazadas o en peligro de extinción con aproximadamente 40% de todas las especies actualmente en declive (Stuart *et al.*, 2004), siendo este el grupo de vertebrados los más amenazados en el planeta (IUCN, 2018). Las salamandras apulmonadas (familia Plethodontidae), al igual que muchos otros grupos de anfibios, han sufrido graves declives en el número de individuos en sus poblaciones durante las últimas décadas. En 2009, Rovito *et al.* documentaron declives mayores en poblaciones de salamandras Neotropicales en sitios de América Central y el sur de México, zonas que contienen una alta diversidad de especies pletodóntidas, por medio de la evaluación de cambios en poblaciones de salamandras a lo largo del tiempo mediante el uso de datos históricos (1970s) y recientes (2005–2007) de sitios de Guatemala y México. Como resultado los autores pudieron documentar declives dramáticos en abundancia en la mayoría de las especies de los cuatro sitios en México localizados al norte del Istmo de Tehuantepec (Oaxaca, Hidalgo, Veracruz). Se observó que especies del género *Pseudoeurycea* del Cerro San Felipe, Oaxaca, experimentaron declives abruptos en su densidad de población, comenzando a principios de los años 1980 hasta años recientes en los cuales ninguna de las especies ha sido vista en el sitio a pesar de los esfuerzos de búsqueda. El mismo patrón fue evidente para las especies del género *Chiropterotriton* estudiadas en el Parque Nacional El Chico, con el declive poblacional ocurriendo entre los años de 1974 y 1976. En el Cerro Chicahuaxtla, se encontró que durante 1980 hubo un descenso en el número de salamandras y ninguna de las especies (*Thorius pennatulus*, *Parvimolge towsendi* y *Pseudoeurycea nigromaculata*) pudo ser encontrada durante los años posteriores.

Los resultados de este estudio sugieren de manera general un declive abrupto en la abundancia de salamandras pletodóntidas a finales de la década de 1970 y principios de 1980, coincidente con los declives ocurridos en poblaciones de especies de salamandras de los sitios estudiados en Guatemala (Rovito *et al.*, 2009). Estos datos son similares a otros anteriormente publicados, en los que se ha observado una tendencia similar en declives abruptos para poblaciones de muchas especies pletodóntidas mexicanas, cuya densidad actual es menor o mucho más baja que en el caso de hace 39 a 45 años (Parra-Olea *et*

al.,1999). El patrón anterior se repite para estudios bien documentados en especies de salamandras y otros grupos de anfibios (en su mayoría especies de *Atelopus*) en diferentes países de Latinoamérica (Lips *et al.*, 2005). Estos trabajos enfatizaron la urgente necesidad de documentar y entender los declives sufridos en poblaciones de salamandras Neotropicales y diferentes grupos de anfibios, como parte de los esfuerzos para la conservación de la diversidad de este grupo de vertebrados.

1.3 Factores implicados con declives poblacionales en salamandras Neotropicales

De manera histórica, han sido un gran número de factores los que se cree han estado implicados en los declives poblacionales de salamandras tanto en la zona Neotropical como en el resto del mundo. Estos factores incluyen la destrucción del hábitat, cambio climático, introducción de especies exóticas y la aparición de ciertas enfermedades infecciosas emergentes.

1.3.1 Destrucción del hábitat

La modificación del hábitat es una de las causas de declives en anfibios mejor documentadas. Se ha observado que la pérdida y modificación de hábitats terrestres o acuáticos reduce la abundancia e incluso puede llegar a eliminar la diversidad de anfibios en las áreas directamente afectadas (Hecnar & M'Closkey, 1996; Alford & Stephen, 1999). En base a lo anterior se ha determinado que algunas especies de anfibios son más susceptibles a declives poblacionales cuando estas tienen rangos geográficos pequeños y un tamaño de cuerpo grande, por lo cual, las especies de anfibios con una distribución restringida deberían ser objetivos prioritarios para conservación (Sodhi *et al.*, 2008).

En el caso de salamandras pletodóntidas tropicales, Wake y Vredenburg (2008) hipotetizaron que muchas de las especies endémicas de los cerros Cofre de Perote (centro oeste de Veracruz) y Cerro Pelón (norte Veracruz) han desaparecido en su mayoría debido a que el área es altamente poblada y han sufrido una modificación extensiva en su hábitat. Los autores resaltaron que las especies recién descubiertas se encuentran en peligro al sobrevivir en lo que parece ser un hábitat subóptimo y perturbado o incluso en pequeños fragmentos de bosque. Por otro lado ha habido estudios en los que de manera contraria se ha documentado que, aunque las alteraciones en el hábitat pueden reducir el tamaño de las poblaciones de

anfibios, en algunos casos, incluso modificaciones severas en este pueden tener un efecto muy pequeño sobre el tamaño de la población (Alford & Richards, 1999).

1.3.2 Cambio climático

El cambio climático que ha ocurrido a gran escala desde la segunda mitad del siglo veinte ha sido desde entonces una preocupación mayor para la comunidad científica. Sin embargo, son pocos los estudios que muestran una causalidad entre el fenómeno del cambio climático y los declives en poblaciones de anfibios. Algunos estudios han demostrado que la exposición a alta radiación UV puede reducir la esperanza de vida en especímenes de anfibios adultos debido a que estos sufren daño ocular (Fite *et al.*, 1998), debido a un incremento en la frecuencia de desarrollo de cáncer o en la aparición de tumores (Ovaska, 1997). De igual manera se ha demostrado que otro efecto de la radiación es el relacionado con un aumento en la mortalidad embrionaria, lo cual se ha observado en algunas especies en declive (Alford & Richards, 1999). Uno de los principales problemas que involucra la validación de hipótesis relacionadas con el cambio climático es la complejidad que implican los modelos de estos, debido a la naturaleza compleja y usualmente sutil de las interacciones que conectan el cambio global y las fluctuaciones en las poblaciones de anfibios. Por eso, Carey y Alexander (2003) argumentan que el rol de cambio climático en declives poblacionales en anfibios ha recibido una atención limitada. Ellos concluyen que, en base a los datos actuales, existe solo una relación tenue entre cambios en la temperatura global, patrones de humedad y los declives en anfibios.

Un efecto general del cambio climático para la zona Neotropical ha sido el propuesto para explicar la desaparición de 100 especies de ranas tropicales de montaña del género *Atelopus*, las cuales se encuentran distribuidas al sur de Centroamérica y norte de América del Sur (Wake & Vredenburg, 2008). Un análisis correlacional reveló que aproximadamente 80 especies fueron vistas por última vez después de un año cálido (Pounds *et al.*, 2006). Si bien como resultado del análisis se obtuvo una correlación significativa entre el aumento de temperatura en algunas áreas y el declive de las especies, esta no fue suficiente para explicar los declives abruptos en el tamaño de las poblaciones de algunas de las especies. Por lo que los autores hipotizaron que el cambio climático y precipitación aunado a un incremento en las temperaturas de la zona pudieron actuar de manera sinérgica para favorecer el aumento

en la virulencia de una enfermedad infecciosa emergente para los anfibios, la cual sería la responsable de la desaparición de estas especies de *Atelopus*.

1.3.3 Introducción de especies exóticas

Se ha comprobado que la introducción de especies exóticas puede causar declives e incluso extinciones en poblaciones endémicas. Se ha documentado que son múltiples los mecanismos que pueden actuar de manera individual o en conjunto para lograr dicho resultado, incluyendo la depredación por especies exóticas sobre las nativas, competencias entre una o más etapas de desarrollo entre las especies, la posible introducción de patógenos por especies no endémicas e hibridación. Uno de los casos mejor estudiados es el de la rana pata amarilla (*Rana muscosa*) en Sierra Nevada California, cuyas poblaciones sufrieron declives en sus poblaciones o desaparecieron de lagos en los cuales fue introducida una especie de trucha no nativa. En este caso, la predación por las truchas sobre los renacuajos fue el mecanismo directo por el cual las poblaciones sufrieron declives abruptos, de igual forma se cree que esta especie no nativa pudo transmitir enfermedades a las ranas (Collins & Storfer, 2013). Otro ejemplo es el observado por la introducción de la rana toro Americana del Norte (*Rana catesbeiana*), la cual se ha establecido fuera de su hábitat natural y ha estado implicada en declives de ranas nativas (Fisher & Shaffer, 1996; Hecnar & M'Closkey, 1997). En lugares donde se introdujo se observó que las ranas toro adulto consumen a las ranas nativas y superan las densidades poblacionales de las especies de anfibios nativas, compitiendo de manera directa por los recursos ecológicos, por lo que en zonas donde ha sido introducida han tenido un impacto severo sobre las poblaciones de anfibios locales (Schwalbe & Rosen, 1988).

1.3.4 Enfermedades infecciosas emergentes

Mientras algunos declives en poblaciones de anfibios pueden ser explicados de manera clara y directa debido a factores como destrucción de hábitat o introducción de especies exóticas, otros no han sido asociados con causas ambientales tan obvias. Prueba de esto son los abruptos declives ocurridos en poblaciones de anfibios localizados en áreas protegidas bien conservadas y la extirpación repentina de especies locales, los cuales llegan a ser catalogados como casos enigmáticos. Recientemente, ha habido un creciente interés

sobre el estudio de las denominadas enfermedades infecciosas emergentes (EIE) y su rol en los declives globales de anfibios, las cuales durante las últimas décadas se han posicionado como la principal causa de muerte en animales silvestres (Daszak *et al.*, 1999).

Se reconoce a una enfermedad infecciosa emergente como aquella que ha sido recién descubierta, que ha adquirido carácter epidémico, mayor gravedad o extensión a regiones en las que antes no existía y que tiene como principal característica un rápido incremento en su incidencia, virulencia o rango geográfico (Daszak *et al.*, 2003). Para el caso de anfibios, son dos los patógenos emergentes que han estado implicados en declives e incluso extinciones de este grupo de vertebrados: un hongo quítrido y una familia de iridovirus. De manera particular, el patógeno fúngico *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) es reconocido como la causa principal de muchos de los declives enigmáticos en poblaciones de anfibios ocurridos alrededor del mundo (Berger *et al.*, 1998; Daszak *et al.*, 2013). Por otra parte, en años recientes se descubrió un nuevo patógeno fúngico *Batrachochytrium salamandivorans* (Bsal), el cual se ha comprobado es la principal causa de declives en salamandras Holanda, Bélgica y Alemania (Van Rooij *et al.*, 2015) representando una nueva amenaza para la biodiversidad global de anfibios.

1.4 *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd)

Durante los años 1996–1998, especies de ranas dardo azules (*Dendrobates azuereus*), ranas dardo verde oscuras (*D. auratus*) y ranas arborícolas blancas (*Litora carulea*) del Parque Zoológico Nacional en Washington, DC, USA murieron a causa de una enfermedad epidérmica única asociada con la presencia de organismos eucarióticos esféricos localizados en la epidermis de los ejemplares encontrados muertos. Por medio de microscopía electrónica de la epidermis afectada, se observó que los organismos intracelulares en la piel producían zoosporas características de los hongos pertenecientes al filo Chytridiomycota (Pessier *et al.*, 1999). Esto resultó ser particularmente interesante pues hasta ese entonces este tipo de hongos eran conocidos como parásitos de protozoarios e invertebrados, siendo este el primer reporte de un hongo perteneciente a este filo parasitando un vertebrado. Posteriormente estos quítridos fueron observados por medio de histología en la piel de ranas muertas pertenecientes a diferentes zoológicos de Estados Unidos e instituciones de investigación (Nichols *et al.*, 1998). La incidencia de los quítridos sobre la piel de las ranas muertas llevo

a hipotetizar que estos organismos fueron la principal causa de muerte de los especímenes donde fueron detectados y posteriormente como el factor que podría explicar los declives en poblaciones de diversos grupos de anfibios en zonas de América Central y Australia (Berger *et al.*, 1998). En el mismo año, Longcore *et al.* (1999) aislaron estos organismos infectivos a partir de la epidermis de ranas dardo muertas y los caracterizaron por medio de la descripción de la morfología y características ultraestructurales de sus zoosporas. Debido a que estas eran diferentes a otras especies y géneros dentro del filo Chytridiomycota, describieron al organismo como uno nuevo recibiendo el nombre de *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov. (Bd).

1.4.1 Taxonomía y Fisiología

Batrachochytrium dendrobatidis (Bd) pertenece al filo de los “hongos inferiores” Chytridiomycota y está localizado en el orden de los Rhizophydiales. La morfología de estos hongos microscópicos se caracteriza por presentar zoosporas esféricas motiles, algunas zoosporas son capaces de desarrollar rizoides que se extienden a el área cercana. Cuentan con dos etapas de vida principales (Fig. 4), una zoospora motil con un solo flagelo dirigido y un cuerpo reproductivo o tallus en el cual las zoosporas asexuales son producidas y que recibe el nombre de zoosporangio (Longcore *et al.*, 1999). Bd, junto a otros quítridios (*B. salamandivorans* y *Ichthyochytrium vulgare*), son los únicos hongos en el filo que se conoce son capaces de parasitar a vertebrados. *In vitro*, el crecimiento del Bd es favorecido bajo condiciones húmedas, temperaturas bajas (4–25 °C) y un rango de pH de 4–8 (Piotrowski *et al.*, 2004).

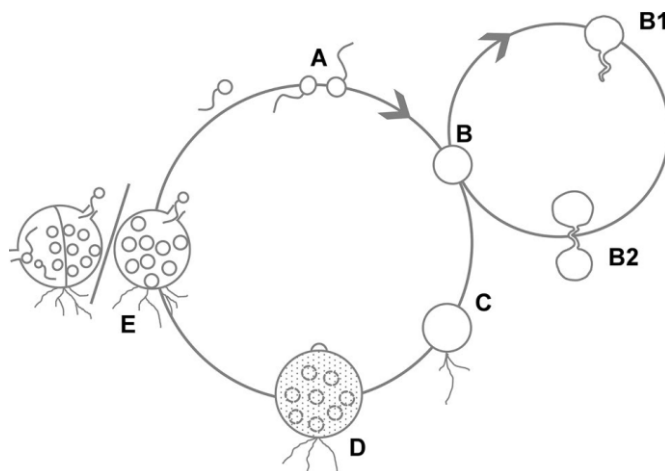


Fig. 4.- Ciclo de vida de *B. dendrobatidis*. El hongo crece siguiendo las etapas A-E, mientras que *B. salamandivorans* sigue las etapas adicionales B1 y B2. Etapas: (A) Zoosporas móviles flageladas; (B) Zoosporas enquistadas; (B1) germinando con un tubo germinal; (B2) transferencia del contenido celular en un nuevo tallo; (C) zoosporas enquistadas por rizoides; (D) zoosporangio inmaduro; (E) zoosporangio maduro con tubo de descarga el cual libera nuevas zoosporas (Van Rooij *et al.*, 2015).

1.4.2 Quitridiomicosis

La quitridiomicosis es una enfermedad infecciosa emergente responsable de declives en especies de anfibios en todo el mundo, causada por el quitrido fúngico *Batrachochytrium dendrobatidis* (Berger *et al.*, 1998; Longcore *et al.*, 1999). El ciclo de vida de *B. dendrobatidis* en la piel de los anfibios empieza por la colonización de esta por las zoosporas, las cuales se enquistan en las capas superficiales de la epidermis. Posteriormente el flagelo es absorbido y se forma una pared celular. La zoospora enquistada germina y desarrolla un tubo germinal que invade la epidermis del huésped, en la extremidad de este tubo se desarrolla un nuevo esporangio. El hongo se prolifera de manera intracelular, llevando a los esporangios inmaduros de las capas más profundas de la epidermis a la superficie de la piel, los cuales habrán desarrollado tubos de descarga y contendrán zoosporas maduras. Estas zoosporas maduras son liberadas al medio externo cuando el esporangio logra llegar a la superficie de la epidermis. Una vez que el anfibio es infectado, este puede mostrar signos de hiperqueratinización, decoloración, ulceración y erosión del estrato corneo de la piel, inapetencia, posturas anormales y ausencia de comportamiento de escape (Fig. 5) (Berger *et al.*, 1999; Longcore *et al.*, 1999). Esta enfermedad mata anfibios por medio de la disrupción de la integridad de la piel, órgano fisiológicamente importante que se encuentra involucrado en el intercambio de gases, balance electrolítico, hidratación y protección contra otros patógenos (Voyles *et al.*, 2009). Para las salamandras de la familia Plethodontidae la infección por Bd resulta ser particularmente letal pues estas carecen de pulmones llevando a cabo la respiración por medio de la piel.

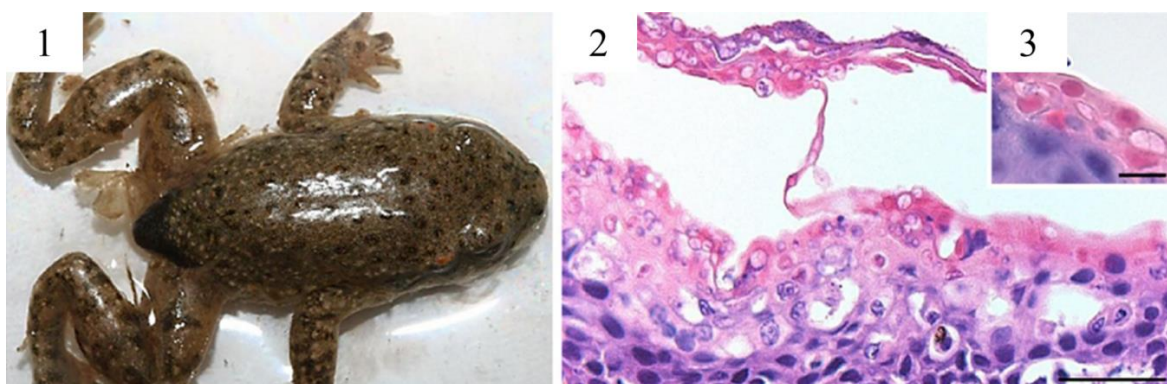


Fig. 5.- Signos clínicos y patología asociada a *B. dendrobatidis*. *Alytes obstetricans* infectada teniendo una postura anormal y pérdida de piel (1). Sección de la piel ventral mostrando hiperqueratosis e hiperplasia epidérmica combinada con la presencia de zoosporangios en distintas etapas de maduración (2). Zoosporangio septado intracelular (3). Modificado de Van Rooij *et al.*, 2015.

1.5 Distribución, diagnóstico y diversificación de Bd

B. dendrobatidis es una infección fúngica globalmente ubicua que ha emergido para convertirse en la principal causa de pérdida de biodiversidad de anfibios, lo cual lo ha convertido en el grupo de vertebrados más amenazado. Actualmente existen registros positivos del hongo en todos los continentes donde habitan anfibios (Bd-maps, 2018). En un principio la infección por Bd podía ser identificada por medio de los signos clínicos que presentan los individuos infectados, sin embargo, se observó que la patología entre individuos presenta variaciones, además de que el método no podía ser empleado en individuos con etapas tempranas de infección por lo que se consideró como un método impreciso y poco útil. Posteriormente los quítridos fueron identificados por medio del desarrollo de protocolos de inmunohistoquímica e histología con lo que se mejoró el diagnóstico de infección por Bd en la piel de anfibios, sin embargo, estas técnicas resultan ser altamente invasivas (generalmente se requieren cortar extremidades del individuo vivo a analizar), requieren mucho tiempo y experiencia, presentan baja sensibilidad teniendo una alta tasa de falsos negativos y son incapaz de identificar Bd en etapas tempranas de infección (Boyle *et al.*, 2004). El hongo también puede ser identificado por aislamiento y cultivo con las desventajas de requerir gran cantidad de tiempo y experiencia, además de implicar un método de muestreo invasivo para los anfibios (Longcore *et al.* 1999). La falta de un método de diagnóstico efectivo para la detección de Bd fue por un tiempo una limitante para el entendimiento de la dinámica y distribución del patógeno. En 2004, Boyle y colaboradores desarrollaron un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real Taqman® que es capaz de detectar y cuantificar una zoospora a partir de una sola muestra, teniendo un alto grado de especificidad y sensibilidad. Los autores demostraron que el ensayo es capaz de detectar el patógeno en etapas tempranas de infección convirtiéndose en herramienta útil en el diagnóstico de poblaciones silvestres o cautivas. La detección de Bd por medio de ensayos de PCR en tiempo real aunado a la optimización de un método de muestreo no invasivo ha permitido mejorar el entendimiento sobre la emergencia y dispersión de Bd en poblaciones de anfibios pertenecientes a diferentes partes del mundo, desde un enfoque histórico y contemporáneo (Lips *et al.*, 2008; Rooij *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2011; Muletz *et al.*, 2014).

Diversos estudios han provisto evidencia espaciotemporal y genética, sobre la emergencia y distribución de Bd a lo largo de regiones geográficas donde este no se ha encontrado históricamente. De igual manera, se ha reportado la existencia de cepas del hongo que al parecer no son hipervirulentas, consideradas de esta forma al no causar síntomas de infección ni mortalidad en especímenes expuestos a cantidades mortales de zoosporas (Lips *et al.*, 2006). Debido a lo anterior se han realizado diversos estudios con el fin de determinar cuál es la historia evolutiva y la diversidad genética del hongo. Por medio del uso de herramientas de genómica comparada de poblaciones, Ferrer *et. al.* (2011) analizaron el genoma de 20 aislados de Bd distribuidos globalmente (Europa, Norte y Central América, África del Sur, Australia) de 11 especies de anfibios. Una vez realizados los estudios de secuenciación y comparación del genoma se pudieron distinguir tres linajes ampliamente divergentes de Bd asociados a anfibios (Bd-GPL, Bd-CH y Bd-CAPE). Dos de estos linajes fueron encontrados en múltiples continentes y su presencia fue asociada con introducciones conocidas por el comercio de anfibios. Los autores encontraron que los aislados pertenecientes a un clado, el linaje panzoótico global (Bd-GPL), ha emergido a lo largo de cinco continentes y ha sido asociado con eventos epizoóticos en poblaciones de anfibios en las regiones de América del Norte, América Central, el Caribe, Australia y Europa. De igual manera identificaron dos nuevos linajes divergentes, el linaje “Cape” (Bd-CAPE) y el linaje “Swiss” (Bd-CH), los cuales son morfológicamente diferentes cuando son comparados contra Bd-GPL. Al comparar el nivel de virulencia de cada uno de estos linajes, se encontró que Bd-GPL es hipervirulento en comparación a los linajes endémicos Bd-CAPE y Bd-CH. Lo anterior se determinó exponiendo diversas especies de anfibios a cantidades de zoosporas letales (<10,000) de cepas pertenecientes a cada uno de los linajes. Las cepas pertenecientes al linaje BD-GPL fueron las únicas en causar síntomas de infección y mortalidad en todas las especies de anfibios expuestos. Se observó que las cepas aisladas provenientes de diversas partes del mundo presentan grandes diferencias a lo largo de su genoma, en cuanto al número de copias cromosomales, patrones de heterocigocidad y nivel de virulencia en diferentes especies de anfibios.

Recientemente por secuenciación total del genoma de 234 aislados de Bd procedentes de todas las partes del mundo, O’Hanlon *et al.* (2018) identificaron que el linaje BdASIA-1 junto con el linaje Bd-GLP tuvieron su origen en Asia del Este, específicamente en la

península de Corea. Los autores determinaron que la posible fecha del origen del Bd-GPL se remonta a principios del siglo 20, lo cual es coincidente con la expansión global del comercio de anfibios. Este comercio de anfibios ha favorecido la transmisión intercontinental del patógeno a lo largo de los siguientes años, pudiendo ser encontrado en diferentes tipos de hábitats siendo capaz de infectar a diversas especies de anfibios alrededor del mundo (O’Hanlon et al., 2018). Los estudios anteriores prueban que Bd es un hongo con una gran complejidad evolutiva y filogenética, el cual a lo largo del tiempo ha desarrollado una amplia diversidad y distribución junto con una arquitectura genómica dinámica y heterogénea (Rosenblum *et al.*, 2013).

Si bien la secuenciación total del genoma es la herramienta más eficaz para describir la filogenia y estructura genómica de diferentes aislados de Bd, este enfoque resulta ser costoso a comparación de métodos tradicionales como la caracterización por medio de cultivos puros los cuales resultan ser poco prácticos y laboriosos. Lo anterior ha provocado que pocos aislados del hongo hayan podido ser caracterizados genéticamente. En 2017, Byrne et al. desarrollaron un método de genotipificación de Bd usando el sistema Fluidigm Access Array, mediante lo cual amplificaron 192 regiones altamente polimórficas del genoma de Bd. El ensayo de genotipificación desarrollado permitió obtener información sobre el genotipo de muestras de Bd obtenidas a partir de hisopos cutáneos, permitiendo discriminar entre los clados de Bd y recuperando la misma topología genómica reportada por Ferrer et al. (2011) y Roseblum et al. (2013) obtenida por medio de la secuenciación total del genoma de 25 aislados de diferentes partes del mundo. Este nuevo ensayo permite obtener información sobre el genotipo de Bd a partir de cultivos del hongo, así como de muestras colectadas de manera no invasiva a partir de la piel de anfibios. Este método resulta ser una buena opción para muestras que presentan una baja calidad de ADN o cantidad mínima de equivalentes genómicos (EG) del hongo, pudiendo genotipificar muestras con una carga inicial de al menos 150 EG. El método representa una opción altamente escalable, rápida y con un costo menor a comparación de métodos tradicionalmente usados.

1.6 Bd y el declive en poblaciones de anfibios en México y la zona Neotropical

B. dendrobatidis se encuentra distribuido en todos los continentes y es capaz de infectar a más de 600 especies de anfibios (Bd-maps, 2018), siendo letal para muchas de

estas, disminuyendo de manera drástica la densidad poblacional de la especie infectada o incluso llevándola a la extinción. Muchas de las especies que han sufrido una disminución abrupta en el tamaño de su población se han encontrado comúnmente en hábitats ribereños en las altiplanicies Neotropicales o Paleotropicales, incluso en áreas protegidas. Muchos de estos declives fueron categorizados como “enigmáticos” por la carencia de una causa obvia para el declive (por ejemplo: deforestación o la introducción de depredadores no endémicos a la región), en estos casos la hipótesis relacionada a la emergencia y dispersión del patógeno Bd en nuevas poblaciones hospedantes, puede ser un punto clave para el entendimiento de los declives abruptos en especies de anfibios en los neotrópicos y otras regiones del mundo.

Van-Rooij et al. (2011) examinaron 14 diferentes especies de salamandras pletodóntidas mexicanas para la detección de Bd. Encontraron resultados positivos para el hongo en 48% de los 33 individuos encontrados muertos en cautiverio pertenecientes a las especies *Bolitoglossa platydactyla*, *B. rufescens*, *Isthmura bellii*, *Aquiloerycea cephalica*, *P. leprosa* y *P. longicauda*. En estos individuos, aunado a la presencia de zoosporas, se pudieron observar signos clínicos de la infección como hiperqueratosis de la epidermis junto con pérdida de la cola en algunos de ellos. Los autores concluyeron que debido a la alta prevalencia de Bd en salamandras encontradas muertas, su ausencia en especímenes sanos y su presencia en algunos especímenes silvestres es consistente con la hipótesis de que Bd ha arribado a nuevas poblaciones hospedantes infectando estas y provocando los recientes declives en poblaciones de la tribu Bolitoglosiini.

Por otra parte, muchos trabajos han demostrado la existencia de una causalidad entre la emergencia del hongo y el declive en poblaciones de diferentes especies de anfibios dentro de la zona Neotropical. Cheng et al. (2011) examinaron especímenes colectados antes, durante, y después de un evento mayor de declive en anfibios. De manera específica, se estudió el caso enigmático de la desaparición de salamandras pletodóntidas de las montañas al sur de México en las décadas de 1970 y 1980, declive bien documentado por Rovito et al. (2009), y el declive de anfibios en Monteverde, Costa Rica. Los autores usaron una técnica molecular no invasiva que mediante ensayos de PCR en tiempo real (qPCR) permitió realizar por primera vez la detección de zoosporas de Bd en la epidermis de especímenes de museo preservados en formalina. Por su rapidez y debido a que preserva la integridad física de los especímenes la técnica resultó tener mayor eficacia para la detección de Bd que métodos

tradicionales como el histológico, teniendo también una mayor sensibilidad junto a una menor tasa de falsos negativos. Por la anterior, esta técnica se puede emplear para detectar la presencia de Bd en especímenes de museos pertenecientes a poblaciones en declive o desaparecidas. Los resultados son clave para descubrir la dispersión geográfica e histórica de este patógeno, siendo evidencia sobre la emergencia de Bd en diferentes poblaciones de salamandras neotropicales de México y un subsecuente declive de anfibios. Si bien el patrón obtenido no es evidencia directa sobre Bd como el factor causante de los colapsos poblacionales en salamandras, la emergencia y aumento en la prevalencia del patógeno Bd seguido por los declives dramáticos sugiere un papel importante de la enfermedad en estos (Fig. 6).

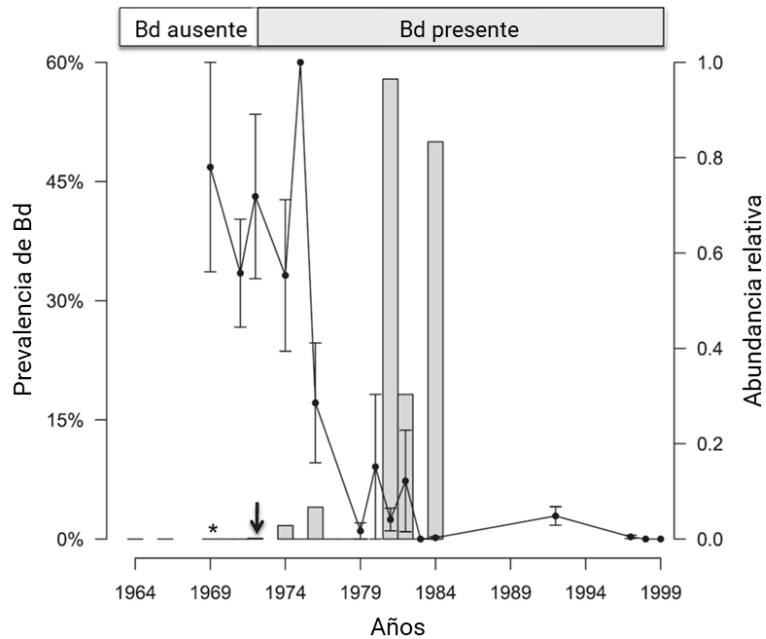


Fig. 6.- Línea del tiempo con la media relativa de abundancia de salamandras (línea) y media de la prevalencia de Bd (barras) para todos los sitios y especies en México. Los asteriscos indican prevalencia de 0 de Bd para un tamaño de muestra grande y la probabilidad de un falso negativo fue baja (<10%). La flecha indica el año de detección de Bd más temprano en México (1972). Figura modificada de Cheng et al. (2011).

Con base a los resultados de todos los sitios en México se determinó el hongo estaba ausente durante años de alta abundancia de especies y es seguido por la emergencia de Bd. El incremento en su prevalencia es coincidente con el marcado declive en la abundancia de salamandras en todos los sitios de México, siendo evidencia para la hipótesis de que Bd tuvo

un rol mayor en estos declives. Bd fue detectado en especies pertenecientes a la familia Plethodontidae como *Pseudoeurycea smithi*, *P. unguidentis*, *Chiropterotriton chico*, *C. dimidiatus* y *P. nigromaculata*. Este patrón fue similar al observado al examinar especímenes de Guatemala, dentro de las especies en las que se encontraron resultados positivos a la detección del hongo fueron *Bolitoglossa engelhardti*, *B. flavimembris*, *B. occidentalis*, entre otras pertenecientes a la familia Plethodontidae. En resumen, el análisis de especímenes históricos junto con información anteriormente reportada, describir la emergencia geográfica y cronológica del hongo en estas localidades, describiendo así una “ola epidémica de Bd” que comenzó durante los años setenta en la zona sur de México para extenderse a Guatemala después del año 1980, resultados que fueron consistentes con los obtenidos por Mendelson et al. (2014) quienes detectaron Bd en baja prevalencia en los años de 1980 y 1981, inmediatamente antes del declive de anfibios en la región en 1983. Hay evidencia de su emergencia posterior en Monteverde, Costa Rica durante 1987 y de su extensión territorial a Panamá siendo detectado el hongo en los años de 1993 a 2004. De igual manera este trabajo resaltó la importancia de la preservación y el uso de colecciones de especímenes de museo, los cuales representan una fuente invaluable de información sobre patrones demográficos, patógenos y otro de información ecológica.

En América Central, Lips et al. (2006 & 2008) presentaron un trabajo a nivel comunidad y de largo termino realizado en El Cope (Panamá), en el cual los autores demuestran que en el sitio hubo una reducción taxonómica y de linaje de anfibios, con 25 especies perdidas coincidente con la emergencia del hongo y un posterior evento epizoótico. Los autores no detectaron Bd durante los primeros años de muestreo, encontrando el primer registro positivo a partir del muestreo en un anfibio encontrado muerto. De manera subsecuente pudieron observar un aumento en la mortalidad de anfibios en el sitio de estudio hasta el punto de que la abundancia de anfibios se redujo de manera drástica. Las especies de salamandras pletodóntidas que se encontraron infectadas y muertas correspondieron a ejemplares de *Bolitoglossa colonea*, *B. schizodactyla* y *Oedipina collaris*. Esto sirvió como evidencia directa acerca la llegada de la “ola pandémica de Bd” y los declives ocurridos en esta parte de América, teniendo un patrón de ausencia del hongo durante múltiples años seguido por la emergencia de Bd en las poblaciones y un posterior incremento en su prevalencia coincidente con el aumento en la mortalidad de anfibios y una clara reducción

en la abundancia de especies en el lugar afectado. Los datos obtenidos sirvieron como evidencia espacio-temporal para una distribución direccional de Bd a lo largo de las principales cordilleras de parte baja de América Central para posteriormente extenderse por Nicaragua, Costa Rica y Panamá. La evidencia refuerza la hipótesis de que Bd es un patógeno exótico que fue introducido a América del Sur a finales de la década de 1970 y principios de 1980. Por lo que se ha propuesto que la emergencia del hongo en una nueva población, causando múltiples declives de anfibios en los últimos 30 años teniendo como consecuencia una evidente reducción en la abundancia y diversidad de especies en los sitios en los cuales ha emergido este patógeno.

Todos estos declives enigmáticos siguen un patrón observado en otros sitios con eventos epizooticos, en el cual la enfermedad se encuentra ausente o en baja prevalencia durante varios años antes de un incremento abrupto en su prevalencia y seguido de una mortalidad generalizada en muchas especies de anfibios y extirpaciones en las poblaciones locales. Esto lleva a la hipótesis general sobre que la emergencia y dispersión del patógeno dentro de nuevas poblaciones hospedantes puede explicar los declives de anfibios en los neotrópicos.

1.7 *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal)

Como se mencionó anteriormente la quitridiomycosis causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* es considerada como la principal causa de declives y extinción en anfibios. Sin embargo, algunos declives en este grupo de vertebrados no pueden ser explicados por la presencia de este patógeno u otro tipo de factores. Uno de estos casos es el de los abruptos declives que han ocurrido en poblaciones de la salamandra de fuego (*Salamandra salamandra*) que han llevado a la especie a un estado crítico de peligro de extinción en países como Holanda, Bélgica y Alemania reduciendo las poblaciones hasta en un 99% (Spitzen-Van Der Sluijs *et al.*, 2013). A partir de ejemplares de *S. salamandra* encontrados muertos en campo, se pudo aislar y caracterizar un hongo quitrido único y diferente a Bd, *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal). Este quitrido causa una enfermedad erosiva en la piel y generalmente seguida por una rápida mortalidad en ejemplares infectados en laboratorio. Junto con *B. dendrobatidis*, este taxón forma el clado bien soportado de los quitridiomycetos, teniendo como hospedero a vertebrados y altamente

patogénicos para anfibios. La patología ocasionada por Bsal se caracteriza por la presencia lesiones erosivas en la piel, hiperqueratosis e hiperplasia de este órgano junto con numerosos flagelos que se distribuyen a lo largo de la epidermis junto con necrosis en los queratinocitos cercanos (Martel *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que *B. salamandrivorans* es restringido y altamente patogénico para algunas especies de salamandras, especialmente las de la familia Salamandridae. Se ha estimado que Bsal divergió de Bd hace aproximadamente 67.3 millones de años y siendo posiblemente originado en Asia en donde pudo haber permanecido en coexistencia con un clado de salamandras hospedantes por millones de años, lo cual se determinó calculando el tiempo en el que se originó el clado de salamandras asiáticas susceptibles comparándolo con el tiempo en el que Bsal divergió de Bd, sugiriendo que Asia ha sido un reservorio para Bsal durante los últimos 30 millones de años. La detección de Bsal en un espécimen de museo (*Cynops ensicauda*) de >150 años es consistente con esta hipótesis (Martel *et al.*, 2014). Como resultado de la globalización y falta de normas de bioseguridad, Bsal fue introducido a nuevas poblaciones en anfibios de Europa en las cuales ha causado pérdida en la biodiversidad de este grupo de vertebrados. Los registros positivos de este hongo se han dado solamente en los continentes de Asia y Europa (Martel *et al.*, 2017), pudiendo ser detectado en poblaciones silvestres de salamandras en Holanda y Bélgica (Martel *et al.*, 2013; Spitzen-van der Sluijs *et al.* 2016). De igual forma el patógeno ha sido documentado en especies pertenecientes a colecciones privadas en los países de Reino Unido (Cunningham *et al.*, 2015), Alemania (Sabino-Pinto *et al.*, 2015) y posteriormente documentado en España (Fitzpatrick *et al.*, 2018). Si bien este no ha sido detectado en ningún país del continente de América, no se sabe cuál sería el efecto en caso de su llegada a este, representando una nueva amenaza para la diversidad de anfibios en especial para el orden Caudata habiendo un alto riesgo de un segundo evento pandémico en países con alta diversidad de salamandras como Estados Unidos y México (Yap *et al.*, 2017). Bsal representa una gran amenaza, especialmente para la biodiversidad de salamandras pletodóntidas mexicanas, pues se ha observado que estas se encuentran en el espectro de especies susceptibles a la infección por el patógeno y para algunas especies siendo letal (Martel *et al.*, 2014; Fitzpatrick *et al.*, 2018).

JUSTIFICACIÓN

Chiropterotriton magnipes es un ejemplo único de adaptación a microhábitats troglodíticos en la zona neotropical, sin embargo, se desconoce cuál es la causa de los declives poblacionales que ha sufrido la especie en las últimas décadas. Para la implementación de técnicas de conservación eficaces, es necesario el conocimiento preciso sobre las amenazas que enfrentan estas poblaciones de salamandras.

HIPÓTESIS

Los declives observados en poblaciones de la salamandra cavernícola *Chiropetrotriton magnipes* son coincidentes con la emergencia del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*. Hipotetizamos que se encontrará un patrón en el que Bd estaba ausente por múltiples años, seguido por la emergencia de este en las poblaciones de *C. magnipes*, con un subsecuente incremento en su prevalencia coincidente con los declives poblacionales de la especie de salamandra.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el patrón espacio temporal de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) en ejemplares históricos y contemporáneos de *Chiropterotriton magnipes*, determinando si la emergencia del patógeno se encuentra relacionada con los declives poblacionales de la especie.

Objetivos específicos

1. Encontrar poblaciones extantes de *Chiropterotriton magnipes* en cuevas de México.
2. Determinar la prevalencia contemporánea de *Batrachochytrium dendrobatidis* y *Batrachochytrium salamandivorans* en salamandras cavernícolas de localidades en México.
3. Determinar la prevalencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en ejemplares históricos de *Chiropterotriton magnipes* preservados en museo, con el fin de determinar si el patrón espacio temporal de emergencia del hongo es coincidente con los declives en las poblaciones de esta salamandra cavernícola.
4. Genotipificar las muestras de Bd obtenidas con el fin de determinar a qué linaje pertenecen.

II. MATERIALES Y METODOS

2.1 Trabajo de campo

El trabajo de campo se llevó a cabo durante los meses de Marzo a Agosto del año 2017, en la zona correspondiente a la Sierra Gorda y la Huasteca encontrada en la zona conformada por los estados de Querétaro, San Luis Potosí e Hidalgo (Fig. 7). Todos los especímenes muestreados fueron encontrados por el Dr. Sean M. Rovito o alguno de los miembros del Grupo de Genómica y Biodiversidad de Vertebrados.

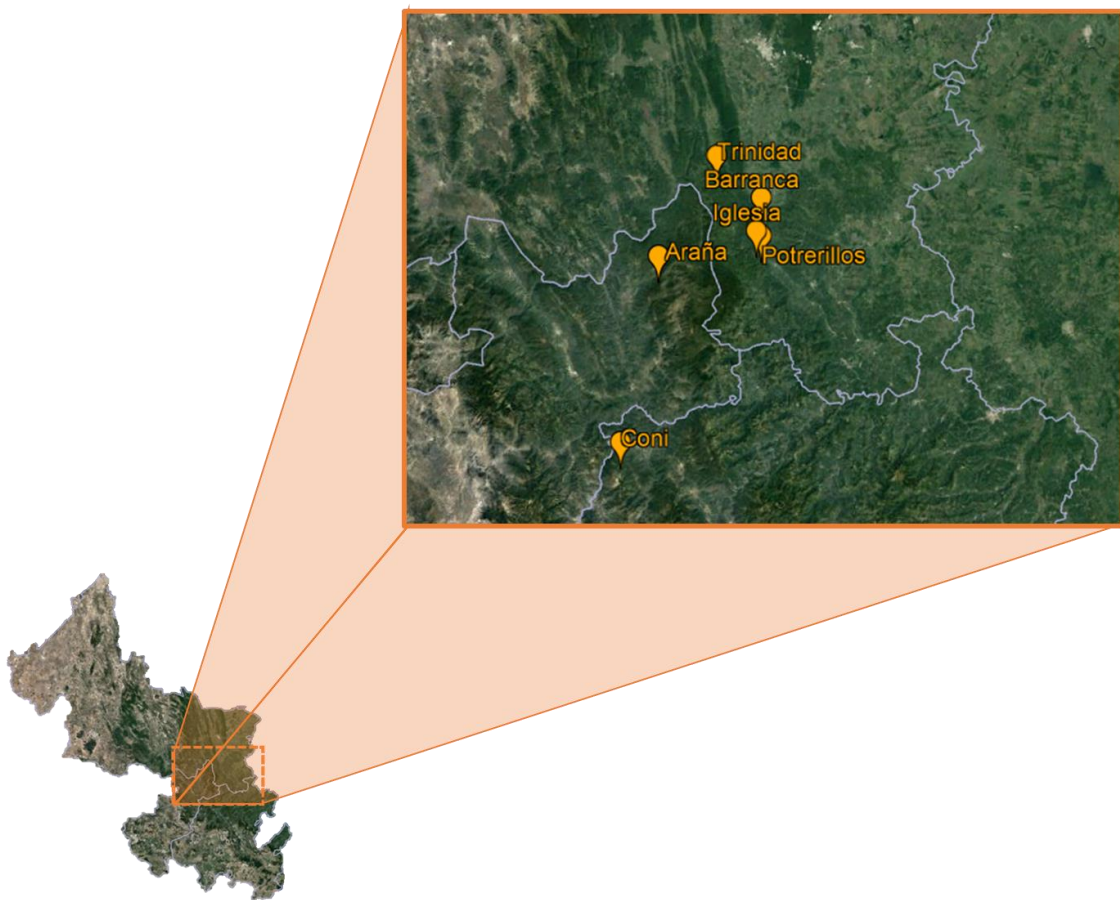


Fig. 7.- Sitios de muestreo para especímenes de *Chiropterotriton magnipes*. Puntos elegidos en base a la existencia de registros históricos o en su probabilidad de tener poblaciones actuales de la especie.

Durante el periodo de tiempo se visitaron localidades con registros históricos de poblaciones de *Chiropterotriton magnipes* (Adler, 1969; Greer, 1975; Wake, 1981; Darda & Sessions, 1982; Rovito, 2010) así como otras cuevas que fueron consideradas como

probables sitios para la existencia de poblaciones de la especie, las cuales fueron encontradas dentro de la misma zona. Se pudieron visitar un total de 15 cuevas, las cuales fueron visitadas en repetidas ocasiones (dos o tres veces más). Logrando tener un total de 6 puntos de muestreo en los cuales se tomó frotis de la piel de los anfibios encontrados (Tabla 1).







	ID	Localidad	Estado	Registro histórico
	“La Araña”	Landa de Matamoros	Querétaro	Si
	“La Barranca”	Xilitla	San Luis Potosí	No
	“La Trinidad”	Xilitla	San Luis Potosí	No
	“La Iglesia”	Ahuacatlán	San Luis Potosí	Si
	“Potrerillos”	Xilitla	San Luis Potosí	Si
	“El Coni”	Zimapán	Hidalgo	Si

Tabla 1.- Sitios de muestreo para especímenes de *C. magnipes*. Puntos elegidos en base a la existencia de registros históricos o en su probabilidad de tener poblaciones actuales de la especie.

En las localidades visitadas (Tabla 1) se muestrearon 11 ejemplares de *Chiropterotriton magnipes*, dos ejemplares de la especie *Chiropterotriton mosaueri*, tres de la especie *Aquiloerycea* sp., tres ejemplares de ranas pertenecientes al género *Eleutherodactylus* y dos del género *Craugastor*. Junto a estas muestras se incluyeron frotis cutáneos de salamandras cavernícolas encontradas en cuevas de Chiapas; se analizaron dos muestras pertenecientes a las especies *Ixalotriton niger* y una de la especie *Nyctanolis pernix*. Las muestras consistieron en frotis de la piel de los individuos tomados con hisopos estériles, los cuales se obtuvieron por medio de una técnica de muestreo no invasiva (Cheng *et al.*, 2011). Cada individuo fue tomado con una bolsa de plástico estéril teniendo cuidado de no tocarlo con las manos. Con ayuda de guantes estériles se enjuagó el espécimen con 50 mL de agua destilada estéril. Posteriormente usando un hisopo estéril (Medical Wire & Equipment #MW113), se procedió a la toma del frotis cutáneo para lo cual se frotó con la punta del hisopo la superficie ventral del espécimen 10 veces de cuello a cola y cinco veces para la parte ventral de la pata, repitiendo el procedimiento para cada una de las extremidades. La punta del hisopo fue colocada en un tubo de 1.5 mL estéril, previamente etiquetado, el cual se conservó en nitrógeno líquido hasta su posterior almacenamiento a -80 °C, donde

permaneció hasta su procesamiento. Una vez tomada la muestra, el espécimen fue liberado al lugar donde fue recolectado, observando primero que este no haya sufrido ningún tipo de estrés. Para evitar cualquier tipo de contaminación los guantes y bolsa de plástico fueron cambiados entre cada toma de muestra.

2.2 Prevalencia contemporánea de patógenos fúngicos

Se extrajo ADN genómico de los 24 hisopos colectados adicionando 40 µL de la solución PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems™) siguiendo el protocolo estándar de extracción y recuperando un mínimo de 20 µL del sobrenadante de cada hisopo extraído. Todas las extracciones fueron diluidas usando el factor 1:10 en 0.25x de la solución TE Buffer teniendo un volumen total final de 50 µL. Para realizar los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR TaqMan®) se visitó el laboratorio a cargo del Dr. Vance Vredenburg. El Dr. Vredenburg es parte del departamento de biología de la Universidad Estatal de San Francisco (SFSU) localizada en el estado de California, Estados Unidos de América. Cada dilución sirvió como templado para los ensayos de qPCR TaqMan® (Termo Fisher Scientific™), los cuales fueron realizados siguiendo el protocolo estándar para la reacción y usando los oligonucleótidos diseñados por Boyle et al. (2004) para la amplificación de la región génica que abarca desde la secuencia de espaciadores transcritos internos (ITS1-3) a la región ribosomal 5.8S altamente conservada del hongo. Para la reacción se usó una sonda específica de unión al surco menor correspondiente a la región ITS-1/5.8S del quítrido (*Chytr MGMB2*) (Tabla 2). El ensayo de qPCR Taqman® desarrollado por Boyle et al. (2004) permite detectar y cuantificar la presencia de *Bd* en cantidades de hasta una zoospora en una manera sencilla y no invasiva para los especímenes empleados, pudiendo detectar la presencia del hongo durante etapas tempranas de infección cuando los niveles de zoosporas del hongo son muy bajos.

Oligonucleótido / Sonda	Secuencia
ITS1 – 3 CHYTRID	5' – CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC – 3'
5.8S - CHYTRID	5' – AGCCAAGAGATCCGTTGTCAA – 3'
Chytr MGB2	5' – 6FAM CGAGTCGAACAAAAT MGBNFQ – 3'

Tabla 2.- Oligonucleótidos empleados para la detección de GE de *Batrachochytrium dendrobatidis*.

A la placa de reacción se agregaron diluciones de equivalentes genómicos (EG) de zoosporas de *Batrachochytrium dendrobatidis* a los niveles de concentración correspondientes a 0.1, 1.0, 10 y 100, los cuales sirvieron como estándares y controles positivos para la reacción de qPCR. Tres controles negativos (agua junto a buffer TE) fueron incluidos para evitar la presencia de falsos positivos. Como resultado se obtuvo una placa de reacción con volúmenes individuales de 25 μ L. El ensayo de qPCR fue corrido en el sistema para PCR en tiempo real ABI 7300 PCR machine (Termo Fisher Scientific™) en la Universidad Estatal de San Francisco. Una vez tenidos los resultados, los datos de cuantificación de la corrida fueron multiplicados por 80 (en base al factor de dilución) con el fin de obtener la intensidad de infección relativa medida en términos de equivalentes genómicos (EG).

Para la detección de *B. salamandivorans* en las muestras contemporáneas se utilizó la misma técnica de PCR en tiempo real TaqMan® (Termo Fisher Scientific™) descrita anteriormente, las muestras fueron enviadas y analizadas en el laboratorio del Dr. Alessandro Catenazzi ubicado en The Florida International University (FIU), ubicada en el estado de Florida, Estados Unidos de América. Como templados para la placa de reacción se usaron únicamente 17 extracciones de ADN genómico de hisopos cutáneos correspondientes a especímenes de salamandras encontrados en cuevas, debido a que se ha demostrado que *Bsal* es capaz de infectar y causar mortalidad solamente en individuos pertenecientes al orden Caudata siendo restringido a este orden de anfibios. Para la amplificación de EG del hongo se utilizaron los oligonucleótidos específicos de unión a la región génica ITS-1 a la región ribosomal 5.8S rRNA (Tabla 3) diseñados por Blooi et al. (2013) junto con la sonda Cy5-STERC de unión a la región ITS-2 del hongo. Blooi et al. concluyeron que el ensayo de qPCR para la detección de *Bsal* es una opción eficaz para la detección de hasta 0.1 EG de zoosporas del hongo provenientes de ADN extraído a partir de muestras de tejido de especímenes infectados o por medio de muestreo no invasivo usando hisopos estériles. De igual manera demostraron la especificidad de los oligonucleótidos SterF y SterR al no ser capaces de detectar equivalentes genómicos en estándares pertenecientes a zoosporas de *Batrachochytrium dendrobatidis*, probando su especificidad al ser usados en un ensayo doble de qPCR para la detección de *Bd* y *Bsal*.

Al igual que el ensayo para Bd este método es capaz de detectar EG de Bsal incluso a bajas intensidades de infección siendo ideal para la detección temprana de la infección provocada por estos patógenos (Bloo *et al.*, 2013).

Oligonucleótido / Sonda	Secuencia
SterF	5' – TGCTCCATCTCCCCCTCTTCA – 3'
SterR	5' – TGAACGCACATTGCACTCTAC – 3'
	5' –
Cy5: SterC	/Cy5/ACAAGAAAATACTATTGATTCTCAAACAGGCA/ IAbRQsp – 3'

Tabla 3.- Oligonucleótidos empleados para la detección de EG de *Batrachochytrium salamandivorans*.

Las muestras fueron consideradas como positivas para la presencia de Bd y Bsal cuando ambos duplicados resultaron en una cuantificación positiva (>0.1 EG) y la curva de amplificación obtenida fue adecuada de acuerdo con los estándares de reacción. La prevalencia de *B. dendrobatidis* y *B. salamandivorans* fue calculada para cada especie como el porcentaje de individuos positivos para Bd y Bsal sobre el total de individuos muestreados respectivamente. Se uso la prueba Clopper-Pearson (también conocido como test de intervalos de confianza para una distribución binomial) para determinar los intervalos de confianza del 95% para la prevalencia de Bd y Bsal para cada especie. Los cálculos se realizaron usando la función “exactci” incluida en el paquete “PropsCI” y usando el programa estadístico R Studio versión 3.4.1.

2.3 Presencia de Bd en muestras históricas

Para determinar la presencia de *B. dendrobatidis* en ejemplares históricos de *C. magnipes*, se tomó muestra por frotis cutáneo de un total de 280 especímenes fijados en formalina y preservados en etanol. Estos ejemplares fueron colectados en cuevas de México durante los años de 1952 a 2012. Estos ejemplares pertenecen a diferentes colecciones herpetológicas de museos localizados en Estados Unidos (Tabla 4).

Año de colecta	No. de especímenes	Museo
1952	3	Museum of Zoology University of Michigan
1955	1	Museum of Comparative Zoology University of Harvard
1964	46	Museum of Zoology University of Michigan
1965	4	Museum of Natural Science Louisiana State University
1968	41	Biodiversity Research and Collections Texas A&M University
1969	81	Museum of Vertebrate Zoology University of California
1970	45	Biodiversity Research and Collections Texas A&M University
1971	11	Biodiversity Research and Collections Texas A&M University
1975	33	Museum of Vertebrate Zoology University of California
1979	3	Museum of Vertebrate Zoology University of California
1981	2	Museum of Vertebrate Zoology University of California
1982	9	Museum of Vertebrate Zoology University of California
2012	1	Museum of Vertebrate Zoology University of California

Tabla 4.- Lista de ejemplares muestreados y museos de procedencia.

Estos especímenes son una muestra muy representativa sobre las poblaciones históricas de *C. magnipes*, ya que en estos se encuentran los ejemplares más antiguos pertenecientes a años anteriores a la descripción de la especie (1965). De igual forma se

cuenta con un gran tamaño de muestra en años antes, durante y después del declive poblacional observado a principios de la década de los setentas, siendo estos todos los especímenes disponibles en colecciones herpetológicas de museos para toma de muestra. De acuerdo con el número de especímenes disponibles, se decidió visitar los museos de Museum of Vertebrate Zoology (University of California), Biodiversity Research and Teaching Collections (Texas A&M University) y el Museum of Zoology (University of Michigan) los cuales contienen más del 90% de especímenes disponibles y permitieron el acceso a las colecciones herpetológicas para la toma de muestras. Por otro lado, los museos de Museum of Natural Science (Louisiana State University), Museum of Comparative Zoology (University of Harvard) y The Field Museum (University of Chicago) que contienen dos o tres ejemplares históricos de la especie, se les envió el material necesario para la toma de muestra de la piel, los cuales fueron regresadas para su análisis. Cada espécimen se tomó desde el frasco con pinzas y se lavó con aproximadamente 50 mL de etanol al 70% para disminuir posible contaminación por restos de piel de otros especímenes u zoosporas contenidas en los frascos de preservación. El frotis cutáneo fue tomado usando hisopos de algodón estéril (Medical Wire & Equipment #MW113) frotando la superficie ventral del espécimen 10 veces de cuello a cola y cinco veces para la parte ventral de la pata, repitiendo el procedimiento para cada una de las extremidades. La punta del hisopo se dejó secando por 60 segundos antes de ser colocada en un tubo de 1.5 mL estéril previamente etiquetado y almacenándolo a 4 °C hasta su procesamiento.

Se extrajo ADN genómico de cada uno de los 280 hisopos adicionando 40 µL de la solución PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems™), siguiendo el protocolo estándar de extracción y recuperando un mínimo de 20 µL del sobrenadante de cada hisopo extraído. Las extracciones fueron diluidas usando un factor 1:10 en 0.25X solución TE Buffer teniendo un volumen total final de 50 µL. Las diluciones de ADN sirvieron como templado para las corridas en triplicado de PCR en tiempo real TaqMan® (Termo Fisher Scientific™) usando los mismos métodos descritos anteriormente. Cheng et al. (2011) mostraron que mediante el ensayo de qPCR usando un método de muestreo no invasivo se puede determinar la presencia de *B. dendrobatidis* en especímenes históricos fijados en formalina. Los autores pudieron recuperar el ADN correspondiente a Bd con un éxito del 83 al 90% en especímenes preservados en formalina y que fueron previamente

identificados como positivos por métodos tradicionales como histología. Atribuyeron el éxito de detección a factores como el corto tamaño de la secuencia a detectar del hongo (146 pb), a la cantidad de copias de Bd presentes por celular y por último debido a la cantidad de células recuperadas por el método de muestreo. Demostraron que la sensibilidad del ensayo aumenta cuando este se lleva a cabo por triplicado, por lo cual en este trabajo se utilizó el mismo enfoque para cada una de las muestras históricas. Sin embargo, determinaron que el ensayo de qPCR se limita a determinar la prevalencia del hongo en ejemplares históricos, no es posible determinar la intensidad de infección en estos debido a la degradación del ADN, pudiendo solo reportar los resultados del ensayo como positivos o negativos. Una vez tenidos los resultados de los ensayos de qPCR, las muestras fueron consideradas como positivas para Bd cuando uno de los triplicados cuantificó positivamente (>0.1 EG) observando que la curva de amplificación obtenida fue adecuada de acuerdo con los estándares adicionados en la placa de reacción. Cheng et al. (2011) demostraron que un resultado positivo en los triplicados es suficiente para determinar la presencia del patógeno en muestras provenientes de ejemplares fijados en formalina. El ensayo de qPCR en triplicado tiene la misma sensibilidad para determinar la prevalencia que el ensayo de histología, pudiendo ser recuperados los mismos resultados en un experimento simultáneo. La prevalencia de *B. dendrobatidis* fue calculada para cada año como el porcentaje de especímenes positivos para Bd sobre el total de especímenes muestreados. Para determinar los intervalos de confianza del 95% para la prevalencia de Bd en cada año, se usó la prueba Clopper-Pearson para una distribución del tipo binomial. Los cálculos se realizaron usando la función “exactci” perteneciente al paquete “PropsCI” y usando el programa estadístico R Studio versión 3.4. 1. Para los años en los cuales se obtuvo una prevalencia de Bd igual a cero y se contaba con un tamaño de muestra grande, se calculó la probabilidad de la existencia de un falso negativo tomando en cuenta una prevalencia verdadera de Bd del 5% en la población y por medio de la fórmula $(1 - 0.05)^S$, donde S representa el tamaño de muestra (Cheng et al. 2011).

2.4 Genotipificación de frotis positivos para Bd

Para la genotipificación de las muestras positivas para *B. dendrobatidis* se empleó el método desarrollado por Byrne et al (2017) el cual usa el sistema “Fluidigm Access Array”,

un sistema designado para la secuenciación de regiones seleccionadas a partir de un gran número de muestras para obtener la información genética de Bd.

Este ensayo de genotipificación tiene como objetivo la amplificación de 192 regiones del genoma de Bd seleccionadas a partir del genoma total de 49 aislados del hongo globalmente distribuidos. El ensayo comienza con la extracción de ADN genómico a partir del frotis cutáneo seguido de un paso de pre-amplificación que enriquece la cantidad de ADN para las regiones blanco. Posteriormente el ADN sirve como templado para el ensayo de amplificación usando el sistema Fluidigm Access Array el cual permite realizar múltiples (48 pares de iniciadores) PCR en múltiples (48) muestras de ADN realizando un total de 2,304 PCR simultáneos. Durante este PCR múltiple cada uno de los amplicones es etiquetado con un barcode doble para cada muestra y adaptadores para secuenciación por Illumina. Después de la amplificación todas las muestras son agrupadas para su secuenciación por Illumina MiSeq, una vez tenido las secuencias estas con procesadas e identificadas generando secuencias consenso. Las secuencias consenso para todos los amplicones compartidos son entonces concatenadas para generar una sola secuencia consenso, estas secuencias son alineadas e inspeccionadas para buscar errores. Como parte final se crea un árbol filogenético usando el criterio de máxima parsimonia.

El ensayo permite determinar a cuál de los clados previamente reportados (Bd-GPL, Bd-Brazil, Bd-Cape, Bd-CH) pertenece el frotis incluso cuando esta cuenta con una baja calidad o cantidad, siendo ideal para el análisis de muestras provenientes de hisopos obtenidos de una manera no invasiva. Desde su desarrollo este método de genotipificación solo ha sido empleado para el análisis de muestras contemporáneas, por lo que su éxito en muestras históricas obtenidas a partir de especímenes preservados en formalina representaría una herramienta útil para el entendimiento sobre la emergencia de las diferentes cepas de Bd, sus distribución histórica, y su rol en los declives poblacionales de anfibios Para el ensayo de genotipificación se analizaron seis de las muestras históricas y una de las muestras contemporáneas positivas para la presencia del hongo.

III RESULTADOS

3.1 Trabajo de campo

Mediante el trabajo de campo se pudieron encontrar dos poblaciones extantes de *Chiropterotriton magnipes* en las cuevas correspondientes a las localidades de “El Coni” en el estado de Hidalgo (HG) y “La Trinidad” en San Luis Potosí (SP) (Fig. 7), siendo esta una nueva localidad, la cual no cuenta con registros históricos de la especie. Sin embargo, las poblaciones encontradas de *C. magnipes* presentan un tamaño reducido en cuanto a su número de individuos, ya que por cada visita solo se pudieron observar un máximo de tres a cinco ejemplares en cada localidad. Este número de individuos es drásticamente menor en comparación a los registros históricos correspondientes a las localidades de “Potrerillos” y “La Iglesia” en San Luis Potosí, en las que durante las décadas de los cincuentas y sesentas se podían encontrar poblaciones con más de 70 individuos por visita. A pesar de realizar múltiples visitas a localidades con registros históricos de la especie (“Potrerillos” (SP), “La Iglesia” (SP) y “La Araña” (QT)), no se pudo encontrar ningún ejemplar de *C. magnipes*; sin embargo, en algunas de estas cuevas se pudieron encontrar especies de ranas pertenecientes a los géneros *Craugastor* y *Eleutherodactylus* de las cuales se tomó muestra de la piel. En la localidad de “El Coni” (HG) se encontraron otras especies pertenecientes a la familia Plethodontidae como es el caso de la salamandra *Chiropterotriton mosaueri*, especie considerada como cavernícola y que se ha observado es capaz de vivir en simpatria con *C. magnipes*, así como tres especies correspondientes al género *Aquiloephycea* sp. y un ejemplar de la rana *Eleutherodactylus cystignathoides*. Por otro lado, no fue posible encontrar ninguna especie de anfibio en ninguna de las cuevas que se creía podían ser nuevos puntos de muestreo localizadas en los estados de Querétaro y San Luis Potosí. De igual manera se analizaron muestras de las especies *Ixalotriton niger* y *Nyctanolis pernix* provenientes de las cuevas “Cerro Baúl” y “Leyva Velázquez” pertenecientes al estado de Chiapas, las cuales son especies que han mostrado tener hábitos tanto arborícolas como cavernícolas. Por medio del método de muestreo no invasivo en estas especies se obtuvieron un total de 24 muestras de frotis cutáneos que fueron procesadas para determinar la prevalencia contemporánea de los patógenos *B. dendrobatidis* (Bd) y *B. salamandivorans* (Bsal) en especies cavernícolas.

3.2 Prevalencia actual de patógenos fúngicos

Mediante las técnicas de extracción swab/Prepman y los posteriores ensayos de qPCR se analizaron las 24 muestras para la detección de *Batrachochytrium dendrobatidis*. Los resultados de estos ensayos se resumen en la siguiente tabla (Tabla 4).

Especie	Localidad	Positivos / Muestra	% prevalencia de Bd (IC del 95%)	Intensidad de infección (EG)
Caudata				
<i>Chiropoterotriton magnipes</i>	El Coni (HG)	2/5	40 (5–85)	4.34 243.2
<i>Chiropoterotriton magnipes</i>	La Trinidad (SP)	0/6	0 (0–46)	-
<i>Chiropoterotriton mosaueri</i>	El Coni (HG)	0/2	0 (0–84)	-
<i>Ixalotriton niger</i>	Cerro Baúl (CS)	0/2	0 (0–84)	-
<i>Nyctanolis pernix</i>	Leyva Velazquez (CS)	0/1	0 (0–97)	-
<i>AquiloEURYCEA sp.</i>	El Coni (HG)	0/3	0 (0–70)	-
Anura				
<i>Craugastor decoratus</i>	La Barranca (SP)	1/2	50 (13–98)	1779.47
<i>Eleutherodactylus cystignathoides</i>	El Coni (HG)	0/2	0 (0–84)	-
<i>Eleutherodactylus cystignathoides</i>	La Iglesia (SP)	0/1	0 (0–97)	-
Total		3/24	13 (3–32)	

Tabla 5.- Prevalencia de Bd en cuevas de México. Lista de especímenes muestreados y sitios de procedencia, los números rojos y en negrita indican resultados positivos para la prevalencia de Bd. Localidades: Hidalgo (HG), San Luis Potosí (SP), Chiapas (CS).

Del total de muestras analizadas pertenecientes a ejemplares encontrados en cuevas, 13% de estas resultaron ser positivas para la presencia de Bd. Se detectó la presencia del hongo en una de las dos poblaciones extantes de *C. magnipes*, la cual corresponde a la población de “El Coni” en el estado de Hidalgo, con un 40% de los especímenes muestreados

teniendo presencia de equivalentes genómicos (EG) del hongo. La intensidad de infección de Bd obtenida en estos especímenes de *Chiropterotriton magnipes* tuvo un promedio resultante de las corridas en duplicado de valores entre 4.34 EG y 243.2 EG. Por otro lado, el espécimen de *Craugastor decoratus* muestreado en la localidad de “La Barranca” tuvo una intensidad promedio de infección de 1779.46 EG, siendo el individuo con mayor carga de equivalentes genómicos de zoosporas de entre los tres individuos positivos para Bd.

Los resultados del ensayo de qPCR de las 17 muestras usadas para la detección de equivalentes genómicos de *B. salamandivorans* se muestran en la tabla siguiente (Tabla 5).

Especie	Localidad	Positivos / Muestra	% prevalencia de Bsal (IC del 95%)
Caudata			
<i>Chiropterotriton magnipes</i>	El Coni (HG)	0/4	0 (0–60)
<i>Chiropterotriton magnipes</i>	La Trinidad (SP)	0/5	0 (0–52)
<i>Chiropterotriton mosaueri</i>	El Coni (HG)	0/2	0 (0–84)
<i>Ixalotriton niger</i>	Cerro Baúl (CS)	0/2	0 (0–84)
<i>Nyctanolis pernix</i>	Leyva Velazquez (CS)	0/1	0 (0–97)
<i>Aquiloerycea sp.</i>	El Coni (HG)	0/3	0 (0–70)
Total		0/17	0 (0–19)

Tabla 6.- Prevalencia de Bsal en cuevas de México. Lista de especímenes muestreados y sitios de procedencia, los números rojos y en negrita indican resultados positivos para la prevalencia de Bsal. Localidades: Hidalgo (HG), San Luis Potosí (SP), Chiapas (CS).

Como se puede observar en la tabla anterior, todas las muestras provenientes de salamandras encontradas en cuevas tuvieron un resultado negativo para la detección de Bsal. Por lo cual concluyo que no hay prevalencia contemporánea de *B. salamandivorans* en cuevas de México.

3.3 Prevalencia histórica de Bd en ejemplares históricos de *C. magnipes*

Usando las técnicas swab/Prepman, se analizaron las 280 muestras de *C. magnipes* provenientes de museos. Como resultado obtuvo una prevalencia general del hongo en un 2.5% de los ejemplares muestreados. La prevalencia de Bd en los diferentes años en ejemplares históricos se resume en la siguiente tabla (Tabla 6):

Año de colecta	No. de muestra	No. positivos para Bd	% prevalencia de Bd (IC del 95%)
1952	3	0	0 (0–60)
1955	1	0	0 (0–84)
1964	46	0	0 (0–8)
1965	4	0	0 (0–52)
1968	41	0	0 (0–13)
1969	81	1	1.2 (0–7)
1970	45	1	2.2 (0–11)
1971	11	0	0 (0–26)
1975	33	3	9.1 (3–24)
1979	3	0	0 (0–60)
1981	2	1	50 (9–91)
1982	9	1	11.1 (3–44)
2012	1	0	0 (0–84)
Total	280	7	2.5 (1–5)

Tabla 7.- Prevalencia de Bd en ejemplares históricos de *C. magnipes* colectados en México. La prevalencia positiva del hongo se indica por medio de texto en color rojo y en negritas.

Como se puede observar, Bd no fue detectado en las poblaciones de *C. magnipes* durante el periodo correspondiente a los años de 1952 a 1968; este periodo incluye al año en el cual fue descrita por primera vez la especie por George Rabb (1965). Para los años de 1964 y 1968, se calculó la probabilidad de la existencia de un falso negativo tendiendo como resultado una baja probabilidad con valores de 0.09 y 0.12 respectivamente. El primer registro del hongo se obtuvo al analizar los frotis correspondientes a ejemplares del año de

1969 teniendo Bd una prevalencia del 1.2% sobre el total de muestras de dicho año. Posteriormente el patógeno fue detectado en los ejemplares históricos de *C. magnipes* en años subsecuentes a 1969 hasta la actualidad, con excepción de los años de 1971, 1979 y 2012 (probabilidad de un falso negativo: 0.56, 0.85 y 0.95 respectivamente).

Por medio de nuestros resultados logramos elucidar el patrón espacio temporal de dispersión de *B. dendrobatidis* en las poblaciones de *C. magnipes* que se puede observar en la figura 8. Un patrón de emergencia de Bd en las poblaciones de *C. magnipes* puede ser observado en el que Bd se encuentra ausente por múltiples años, seguido por su emergencia y aumento en su prevalencia coincidente con los declives poblacionales de la especie. Nuestros resultados indican que el año de emergencia del quítrido Bd en poblaciones de *C. magnipes* data al año de 1969 (línea punteada roja). Este resultado nos permite distinguir entre tres periodos temporales: uno denominado como pre-declive en el que Bd se encuentra ausente en las poblaciones (1952–1968) con una probabilidad de la existencia de un falso negativo de 0.007, en un tiempo donde de acuerdo con registros históricos y observaciones hechas por herpetólogos que visitaron las cuevas existía gran abundancia de ejemplares de *C. magnipes*. Para posteriormente emerger en las mismas en 1969 causando un declive poblacional hasta el año 1971 y aumentar su prevalencia en años posteriores de una manera coincidente con la reducción en el tamaño poblacional de la especie, en un periodo que podemos denominar post declive. Es necesario especificar que en la figura 8, la abundancia de salamandras durante el periodo en el cual Bd se encuentra ausente solo está basada en base a los especímenes encontrados en museos. Durante este periodo de tiempo la abundancia de salamandras alcanzaba números de hasta 100 individuos por visita, por lo que la tendencia observada en el grafico no debe ser confundida con fluctuaciones naturales en el tamaño de población. Para el periodo de tiempo en el cual Bd se encuentra presente en las poblaciones, la abundancia de salamandras observada en el grafico es igual a la observada en las visitas a las cuevas, afirmaciones basadas en notas de campo y observaciones propias de herpetólogos que colectaron estos especímenes.

3.4 Genotipificación de muestras históricas y contemporáneas de Bd

Los resultados del ensayo de genotipificación de *B. dendrobatidis* a partir de las seis muestras históricas y una contemporánea se muestran en la siguiente tabla (Tabla 7).

ID	Especie	Tipo	Genotipificación	Clado
MVZ129020	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Histórica	No	-
MVZ129014	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Histórica	No	-
MVZ223590	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Histórica	No	-
MVZ200620	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Histórica	No	-
MVZ178694	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Histórica	No	-
MVZ200676	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Histórica	No	-
C1	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Contemporánea	Si	Linaje pandémico global (GPL)

Tabla 8.- Ensayo de genotipificación de Bd.

Como se puede observar en la tabla anterior ninguna de las muestras históricas pudo ser genotipificada, probablemente debido a la baja cantidad de ADN presente en las muestras. La muestra contemporánea perteneciente a la cueva del Coni pudo ser exitosamente amplificada y secuenciada. Después de comparar la secuencia concatenada obtenida con las secuencias de aislados de Bd pertenecientes a diferentes linajes y de acuerdo con el árbol filogenético obtenido, se pudo determinar que esta muestra pertenece al clado denominado como linaje pandémico el cual se encuentra globalmente distribuido (Bd-GPL).

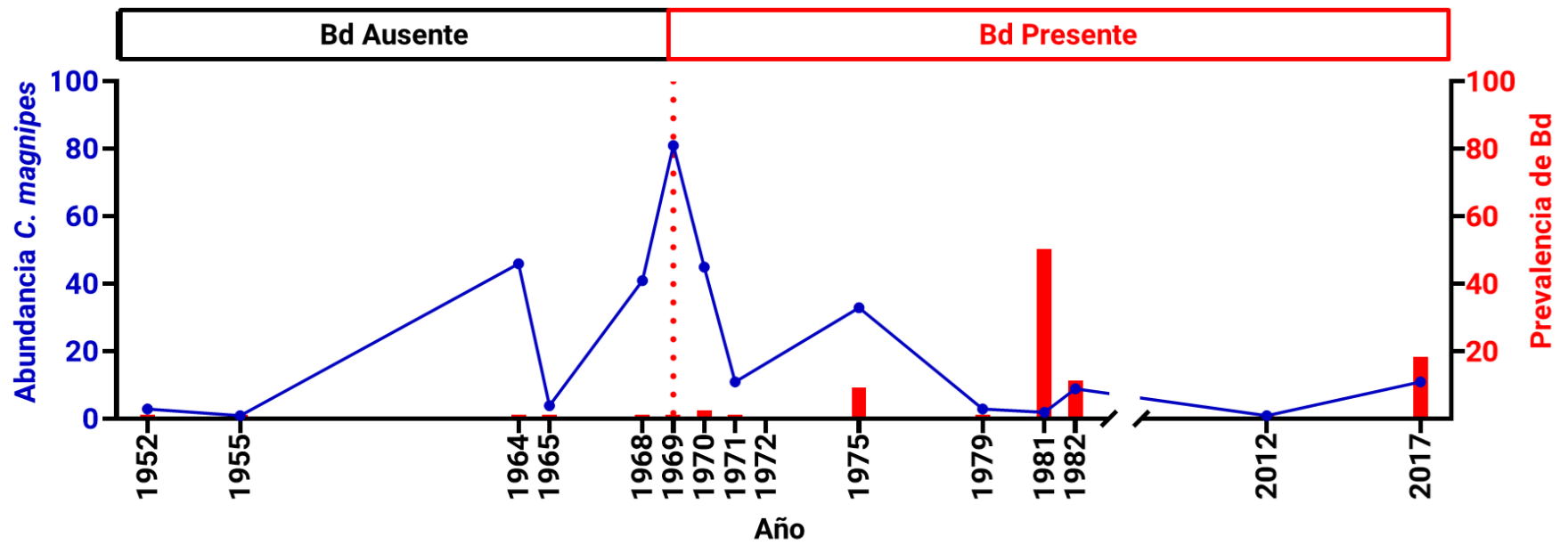


Fig. 8.- Patrón espacio temporal de prevalencia de Bd (barras en color rojo) contra la abundancia de ejemplares de *C. magnipes* (línea azul) en México. La línea punteada roja indica el primer registro positivo del hongo. La abundancia de salamandras esta basada en solo los especímenes históricos disponibles.

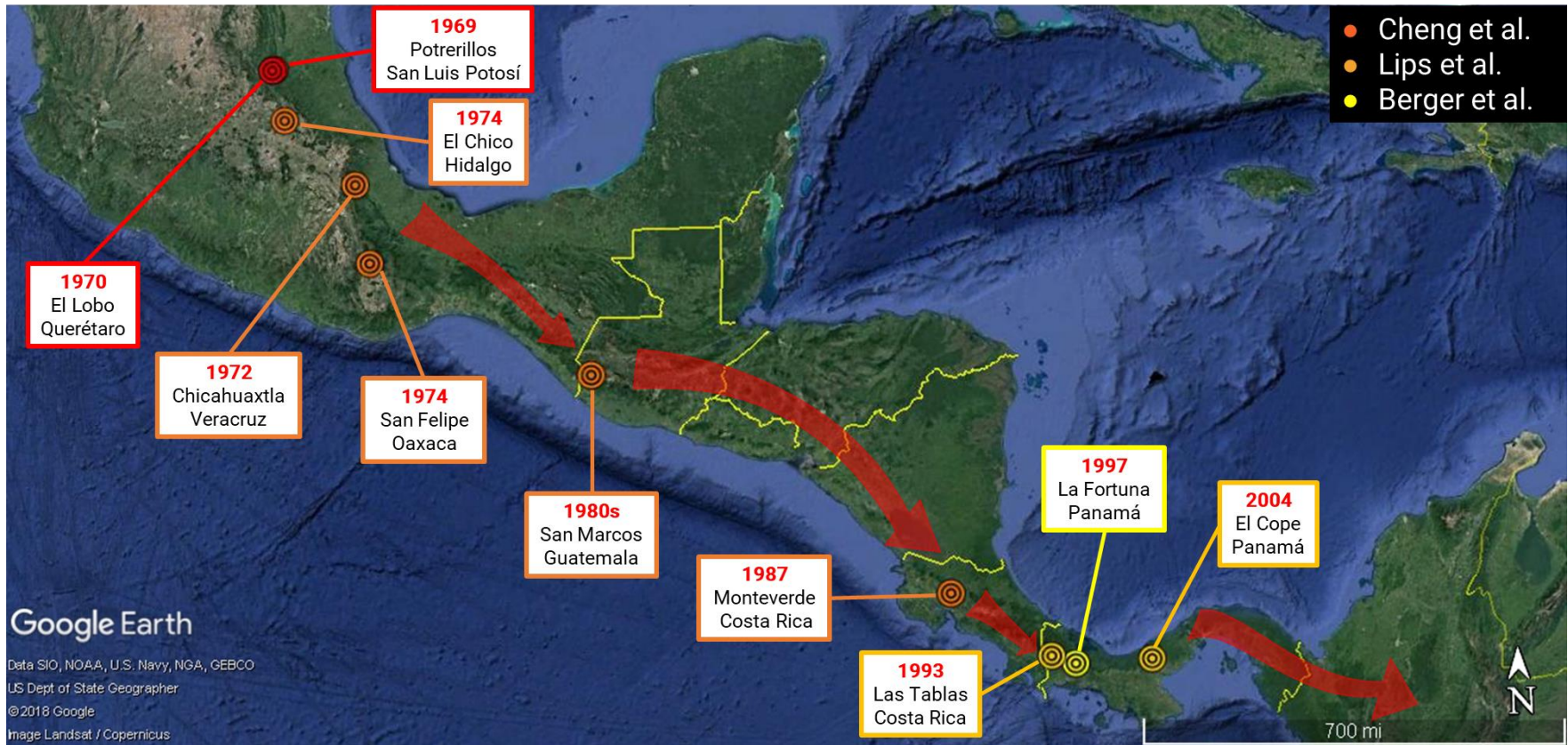


Fig. 9.- Ola epidémica de Bd. Mapa de la distribución espacio – temporal de Bd, comenzando durante los años de 1969 y 1970 al este de México, para dispersarse por el sur del país (1972 y 1974) hasta Guatemala (1980s) y llegar a Monteverde, Costa Rica (1987 - 1993) y posteriormente a Panamá (1997 – 2004). Los círculos rojos representan los puntos de emergencia de Bd reportados en este trabajo. Los círculos naranjas representan puntos de emergencia reportados por Cheng et. al. (2011). Los círculos amarillos representan puntos de emergencia de Bd en América Central reportados por Berger et. al. (1998) y Lips et. al. (2004).

IV DISCUSION

Nuestros resultados para los ejemplares históricos de *C. magnipes* analizados, permitieron obtener el primer registro positivo en el año de 1969, el cual es el registro más temprano de *B. dendrobatidis* reportado en América Latina. Hasta este momento los registros tempranos del patógeno en el país corresponden a los reportados por Cheng et al. (2011), quienes detectaron la presencia del quítrido en ejemplares colectados en los años de 1972 y 1974 en poblaciones de salamandras pletodóntidas pertenecientes a los estados de Hidalgo, Oaxaca y Veracruz. Por otro lado, Hale et al. (2005) detectaron al patógeno en ejemplares pertenecientes al año de 1981 y que fueron colectados al norte del país. Los registros históricos de Bd obtenidos, contribuyen al reforzamiento de la hipótesis para la llamada “ola epidémica de Bd” (Fig. 9). De acuerdo a nuestros resultados, esta “ola epidémica” tuvo su origen en el este de México a finales del año de 1969 y principios de 1970 para posteriormente dispersarse por el sur del país siendo detectado el hongo en los estados de Oaxaca y Veracruz hasta llegar a Guatemala durante la década de los ochenta (Cheng *et al.* 2011) para posteriormente tener registros positivos en países al sur de América Central como Costa Rica (Lips *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2011) y Panamá (Berger *et al.*, 1998; Lips *et al.*, 2004). El patrón de emergencia de Bd obtenido corresponde al observado durante eventos epizoóticos en otras poblaciones de anfibios. En estos, la emergencia y dispersión del patógeno dentro de una nueva población hospedante resulta ser el factor que explica el declive en la densidad de población. Por lo cual podemos argumentar que la prevalencia histórica de Bd obtenida coincidente con la reducción poblacional observada, es evidencia sobre el importante rol que tuvo el hongo patógeno *B. dendrobatidis* en el declive poblacional de la salamandra cavernícola *C. magnipes*. Lo anterior se vería reforzado probando la susceptibilidad de *C. magnipes* al patógeno, sin embargo, en el presente trabajo no se realizaron ensayos de susceptibilidad con especímenes de *C. magnipes* debido a que el número de especímenes encontrados en las cuevas fue reducido (tres o cuatro individuos por visita) y debido al estatus de conservación de la especie.

Las muestras históricas positivas para Bd no pudieron ser genotipificadas, probablemente debido el nivel de degradación que puede presentar el ADN histórico ya que hasta el momento el ensayo desarrollado por Byrne et al (2017) solo ha sido empleado con

éxito para la genotipificación de muestras contemporáneas. De la misma forma podemos atribuir la falta de un resultado positivo para la genotipificación de muestras históricas a la baja calidad y concentración de ADN presente en las muestras (<50 EG), a pesar de que el ensayo mostró eficacia para la genotipificación de muestras con una cantidad mínima de ADN (150 EG). Es necesario optimizar un método de extracción para obtener un mayor rendimiento de ADN a partir de frotis cutáneos obtenidos de especímenes preservados en formalina con el fin de obtener ADN de mejor calidad para el ensayo de genotipificación. El patrón obtenido en nuestros resultados discrepa de la hipótesis epidémica relacionada con el clima propuesta por Pounds et al. (2006). Los autores proponen que un aumento en la temperatura en años anormalmente cálidos propició un desequilibrio en la relación patógeno-hospedero provocando una mayor virulencia de Bd y de igual manera una mayor susceptibilidad a la infección del hongo en los anfibios debido a un estrés fisiológico provocado por la temperatura inusual, provocando declives abruptos en áreas particulares. Por medio de nuestros resultados podemos confirmar que Bd se encontró ausente de las poblaciones de *C. magnipes* durante aproximadamente 17 años (1952 a 1968 con una probabilidad de la existencia de un falso negativo de 0.7%) después de su descubrimiento para posteriormente ser introducido a estas por medio de factores ambientales o antropogénicos. El patrón espacio temporal de dispersión del hongo obtenido permite reforzar nuestra hipótesis sobre la introducción del patógeno a una nueva población como la principal causa de declive en estas poblaciones de salamandras y no a causa de la presencia basal de este y un cambio en la virulencia derivado de un cambio en la temperatura del microambiente. Nuestros resultados históricos contribuyen al entendimiento sobre la presencia de Bd en el país, al ser uno de los pocos estudios hasta ahora realizados.

La detección histórica de Bd refuerza la utilidad sobre el uso de técnicas no invasivas y ejemplares históricos como fuentes de información para la comprensión de la dinámica del patógeno en México, permitiéndonos determinar su presencia espaciotemporal en el país. La detección de Bd en este tipo de salamandras cavernícolas resulta ser particularmente interesante, ya podríamos considerar estos microhábitats como lugares aislados quedando una nueva incógnita sobre cómo es que el hongo logró llegar a estas poblaciones y permitiéndonos reforzar la hipótesis sobre el papel de Bd en estos declives. Al hablar de este tipo de microhábitats podemos descartar que la introducción de especies exóticas pudo

contribuir al declive poblacional, pues se ha observado que depredadores comunes de salamandras como lo son especies de serpientes, aves y otros mamíferos pequeños, no han sido observados en cuevas probablemente debido a que no están adaptados a estos microhábitats troglodíticos. Otros factores como cambio climático o cambios en el hábitat necesitarían ser estudiados de manera histórica y con profundidad para poder determinar en qué manera pudieron contribuir al declive en esta especie. Tomando en cuenta el punto anterior, es importante resaltar que hay años en los que parece haber un problema de sobre muestreo en las poblaciones de *C. magnipes*. Este factor pudo haber contribuido a la existencia de un desequilibrio en la dinámica poblacional de la especie, poniéndola en peligro.

Podemos hipotetizar sobre cómo el hongo pudo llegar a las cuevas. Algunas especies de ranas o salamandras con hábitos tanto terrestres como cavernícolas resistentes a Bd, pudieron servir como vectores para la transmisión de la enfermedad haciendo posible la llegada del hongo a las cuevas. Por lo cual es necesario llevar a cabo la detección de Bd en especies no cavernícolas, así como ensayos de susceptibilidad con el fin de determinar el papel de diferentes especies de anfibios durante los eventos epizoóticos relacionados al patógeno. Otro posible escenario para la introducción de Bd a este tipo de microhábitats es el relacionado con factores antropogénicos. Mucho del trabajo para la exploración de las cuevas del este del país, fue realizado por herpetólogos en años precedentes a la descripción del hongo, por lo cual no se consideraban las medidas necesarias para la evitar la transmisión de patógenos como Bd. Diversos estudios han demostrado que *B. dendrobatidis* es capaz de crecer y persistir en suelo por varias semanas, por lo que se ha hipotetizado que las zoosporas del hongo pueden ser dispersadas en nuevos ambientes por medio de suelo contaminado encontrado en equipo e instrumentos usados para el trabajo de campo, teniendo mayores posibilidades de ser transportadas por medio de vehículos o incluso excursionistas (Laurence *et al.*, 1996; Johnson & Speare, 2005). Lo anterior nos permite sugerir que la introducción de Bd a este tipo de microhábitats aislados tiene que ver con factores antropogénicos, en los que los que el equipo usado por excursionistas en estas cuevas fueron los vectores para la transmisión del patógeno. De igual manera, el patógeno pudo haber sido introducido por medio de científicos que realizaron trabajo de campo en estas cuevas. Durante las décadas de los sesentas y setentas se llevaron a cabo incursiones por parte de herpetólogos

estadounidenses para investigar mas sobre la diversidad de anfibios en las cuevas de México y otros microhábitats del país. De manera no intencionada ellos pudieron transportar Bd al país desde los Estados Unidos; país en el que el patógeno fue detectado desde aproximadamente dos décadas antes del primer registro positivo de Bd en México. El transporte del patógeno puede haber sido por medio del equipo y materiales empleados para el trabajo de campo.

La detección histórica de Bd en poblaciones de *C. magnipes* permitió determinar que Bd probablemente fue un factor implicado en el declive de esta especie. Lo anterior aunado con la presencia actual del hongo en especies cavernícolas, son prueba sobre la amenaza que representa Bd para estas poblaciones de salamandras. Debido a lo anterior es necesario el desarrollo de medidas para la protección de estas poblaciones extantes con el fin de contribuir a la conservación de estas especies. Como primera medida de protección se recomienda el monitoreo de cuevas en las cuales no se detectó la presencia de Bd, así como la implementación de medidas para evitar la dispersión de las zoosporas del hongo en nuevos microhábitats como el uso de hipoclorito de sodio (NaOCl) para la desinfección de equipo e instrumentos usados para el trabajo de campo. El uso de hipoclorito de sodio como desinfectante en condiciones de campo y en laboratorio ha demostrado ser eficaz para matar por completo a las zoosporas y aislados del hongo pertenecientes al linaje pandémico global (Becker & Gratwicke, 2017).

Nuestros resultados permitieron detectar la presencia de *B. dendrobatidis* en ejemplares de *C. magnipes* pertenecientes a la localidad de “El Coni” en Hidalgo y en un ejemplar de *Craugastor decoratus* en “La Barranca” perteneciente al estado de San Luis Potosí. De acuerdo con la hipótesis propuesta por el Dr. Vance Vredenburg (Vredenburg’s 10,000 Zoospore Rule), una intensidad de infección de aproximadamente 10,000 EG del hongo es necesaria para causar mortalidad en anfibios, hipótesis que ha sido reforzada mediante experimentos de supervivencia en laboratorio junto a observaciones y análisis en poblaciones silvestres (Kinney *et al.*, 2011; Catenazzi *et al.*, 2017). En base a lo anterior, podemos considerar que en ambos la intensidad de infección es baja, con valores promedio de infección de 4.3–243.2 EG para ejemplares de *C. magnipes* y 1779.5 EG para el espécimen de *C. decoratus*. En ninguno de estos ejemplares se pudieron observar signos clínicos de infección por el hongo al momento del muestreo. En los años recientes se ha reportado que

algunas poblaciones de anfibios en los neotrópicos han comenzado a recuperarse después de haber sufrido un abrupto declive poblacional a causa de la emergencia de Bd. Se ha hipotetizado que algunas de estas especies han sufrido una transición en sus poblaciones de una fase epizoótica a una enzoótica.

La fase epizoótica o epidémica se caracteriza por una alta abundancia de individuos los cuales sufren un aumento en su mortalidad debido a la emergencia de Bd en sus poblaciones presentando altos niveles de infección ($> 10,000$ EG). Después de esta fase epizoótica, algunos individuos sobrevivieron y adaptado algún mecanismo de resistencia habiendo un cambio en la respuesta de los anfibios a la infección por Bd. Esta resistencia permite a los pocos individuos restantes coexistir con el patógeno, teniendo este una prevalencia alta pero una intensidad de infección baja, pasando de la fase epizoótica a una fase enzoótica o endémica (Catenazzi *et al.*, 2017; Voyles *et al.*, 2018). En nuestros resultados encontramos intensidades de infección bajas (< 250 EG) para los especímenes de *C. magnipes*, sugiriendo que esta población quizás se encuentra en un estado enzoótico. Estos especímenes pudieron haber adaptado algún método de resistencia o puede ser un ejemplo del desarrollo de una relación huésped-patógeno más estable. Nuestra hipótesis sobre la transición de un estado epizoótico a una fase enzoótica, se ve reforzada por la genotipificación de nuestra muestra contemporánea, la cual resultó pertenecer al linaje pandémico global (Bd-GPL) el cual es el linaje altamente virulento y globalmente distribuido. El resultado de genotipificación coincide con cepas anteriormente aisladas en el país, pues hasta el momento todas han pertenecido al linaje pandémico global.

Para el caso de las poblaciones en estado enzoótico es necesario un mejor entendimiento de la compleja interacción entre el huésped y el patógeno, por lo que es necesario un monitoreo continuo sobre el número de individuos en esta población y la prevalencia de Bd e intensidad de infección en los mismos. Las poblaciones de salamandras que al parecer se encuentran en un estado enzoótico pueden considerarse como poblaciones estables, por lo que podríamos considerarlas como blancos no prioritarios de conservación. Como parte de las acciones de conservación es necesario determinar la capacidad y mecanismos de dispersión tanto del huésped como del patógeno en poblaciones que se encuentran en un estado enzoótico, con el fin de prevenir que este pueda ser introducido a nuevas poblaciones de anfibios en los que Bd pueda ser letal. El entendimiento sobre como

los factores antropogénicos contribuyen a la dispersión de anfibios infectados o del patógeno es otra de las acciones requeridas para la protección de áreas a las que posiblemente no haya presencia del patógeno. De igual manera determinar los patrones de variación espacio temporal de infección podría permitir delimitar zonas con mayor riesgo de sufrir un evento epizoótico.

Nuestros resultados positivos para la detección de Bd en cuevas de México, son evidencia clara sobre la capacidad de dispersión del patógeno a diferentes tipos de microhábitats por lo cual es necesario hacer un estudio extensivo para determinar la prevalencia actual de Bd y otros patógenos fúngicos como Bsal en otras poblaciones de salamandras pletodóntidas en México localizadas en diferentes tipos de microhábitats. El llevar a cabo el aislamiento de diferentes cepas provenientes de poblaciones silvestres junto con la genotipificación de estas, es un punto importante para el conocimiento sobre la diversidad de cepas y linajes de Bd que se encuentran presentes en el país. De igual manera es necesario llevar a cabo ensayos de susceptibilidad con el fin de determinar su virulencia en especies pletodóntidas del país para identificar especies con mayor vulnerabilidad a un evento epizoótico ocasionado por el patógeno, siendo estos objetivos prioritarios de conservación.

Como se mencionó anteriormente los resultados obtenidos permitieron determinar la presencia de Bd en poblaciones extantes de *C. magnipes*, las cuales no mostraron signos de infección por el hongo pudiendo ser resistentes al patógeno, sugiriendo que estas se encuentran en un estado enzoótico. Lo anterior representa una oportunidad única para indagar sobre qué factores están favoreciendo la defensa de esta especie ante Bd. En años recientes el estudio de microbioma de la piel de anfibios ha tomado importancia debido a que se ha demostrado que este se encuentra compuesto por una alta diversidad de especies bacterianas, las cuales pueden tener un papel importante en la defensa del huésped ante patógenos (Kueneman *et al.*, 2014). El conocimiento sobre la composición del microbioma bacteriano y fúngico de especies cavernícolas puede servir como un primer paso para el desarrollo de una estrategia contra patógenos como Bd, debido a que algunas de estas especies microbianas pueden estar compitiendo contra el hongo o produciendo algún tipo de metabolito secundario proporcionando protección y resistencia a Bd en la piel de los anfibios. El microbioma cavernícola puede tener una composición única pues se ha encontrado que la conformación

de éste en salamandras se encuentra influenciada por la locación geográfica y el tipo de microhábitat en el que se encuentra la especie, teniendo los factores ambientales un rol significativo en el ensamble del microbioma cutáneo de estos anfibios (Bird *et al.*, 2018). El descubrimiento acerca de bacterias u hongos que pudieran propiciar propiedades antifúngicas ante Bd podría servir para el desarrollo de estrategias de conservación como biomagnificación.

Nuestros resultados indican que no hay presencia contemporánea de *B. salamandivorans* en especies cavernícolas. Este resultado no es sorprendente pues hasta el momento no se ha detectado la presencia del patógeno en el continente Americano, a pesar de los esfuerzos de monitoreo en países como Estados Unidos (Klocke *et al.* 2017; Bales *et al.*, 2015; Muletz *et al.* 2014). Norte América es uno de los puntos más importantes para la biodiversidad de salamandras, teniendo más de la mitad de las especies de todo el mundo, de manera particular zonas en México y las montañas Apalaches albergan más de 190 especies de salamandras pletodóntidas, muchas de estas endémicas de cada región (AmphibiaWeb, 2018). Debido a la alta patogenicidad y especificidad que ha demostrado tener Bsal a este tipo de anfibios aunado al gran potencial de distribución en poblaciones nuevas con gran riqueza de especies de salamandras, su posible introducción a las áreas antes mencionadas representa un gran riesgo y amenaza para la biodiversidad teniendo un gran impacto en las poblaciones silvestres nativas y ecosistemas (Martel *et al.*, 2017; Yap *et al.*, 2017). Por lo anterior se debe de implementar un muestreo constante para la detección de Bsal tanto en poblaciones silvestres de México como en especímenes cautivos provenientes de procesos de importación, como medida primaria de prevención.

CONCLUSIONES

El presente trabajo permitió determinar la presencia de *B. dendrobatidis* en ejemplares históricos de la especie cavernícola *C. magnipes*, teniendo el registro histórico más temprano en México y en los Neotrópicos. Lo anterior permitió establecer el patrón espacio-temporal del hongo en las poblaciones de *C. magnipes* sirviendo como evidencia sobre el papel de Bd en los declives poblacionales de esta especie y generando así nuevos registros para elucidar la historia del patógeno en el país. Estos nuevos registros contribuyen al entendimiento sobre la historia del patógeno en el país, siendo uno de los pocos estudios hasta ahora publicados. Se pudo determinar que Bd se encuentra presente en una de las poblaciones extantes y que este pertenece al linaje pandémico global. La población de *C. magnipes* en el Coni parece encontrarse en un estado enzoótico con Bd, sin embargo, es necesario realizar nuevos estudios para determinar cuál es la dinámica de la interacción huésped-patógeno en esta población que de acuerdo con lo observado son capaces de coexistir con el patógeno. Se pudo confirmar la ausencia de Bsal en cuevas de México, lo cual representa uno de los primeros esfuerzos de monitoreo del patógeno en el país.

BIBLIOGRAFÍA

- Alford, R. A., & Richards, S. J. (1999).** Global Amphibian Declines: A Problem in Applied Ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 30(1), 133-165. doi:10.1146/annurev.ecolsys.30.1.133
- AmphibiaWeb:** Information on amphibian biology and conservation. [web application]. 2013. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Disponible: <http://amphibiaweb.org/>; Ultima consulta: 10/10/2018.
- Bales, E. K., Hyman, O. J., Loudon, A. H., Harris, R. N., Lipps, G., Chapman, E., Roblee, K., Kleopfer, J., & Terrell, K. A. (2015).** Pathogenic Chytrid Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*, but Not *B. salamandrivorans*, Detected on Eastern Hellbenders. *Plos One*, 10(2). doi:10.1371/journal.pone.0116405
- Becker, M. H., & Gratwicke, B. (2017).** Minimum lethal concentration of sodium hypochlorite for the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Plos One*, 12(4). doi: 10.1371/journal.pone.0176439
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A. A., Goggin, C. L., Slocombe, R., Ragan, M. K., Hyatt, A. D., McDonald, K. R., Hines, H. B., Lips, K. R., Marantelli G., & Parkes, H. (1998).** Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15), 9031-9036. doi:10.1073/pnas.95.15.9031
- Berger, L., Speare, R., & Hyatt, A. D. (1999).** Chytrid fungi and amphibian declines: Overview, implications and future directions. *Declines and Disappearances of Australian Frogs*, 22-33.
- Bird, A. K., Prado-Irwin, S. R., Vredenburg, V. T., & Zink, A. G. (2018).** Skin Microbiomes of California Terrestrial Salamanders Are Influenced by Habitat More Than Host Phylogeny. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.00442
- Boyle, D., Boyle, D., Olsen, V., Morgan, J., & Hyatt, A. (2004).** Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60, 141-148. doi:10.3354/dao060141

- Blooi, M., Pasmans, F., Longcore, J. E., Sluijs, A. S., Vercammen, F., & Martel, A. (2013).** Duplex Real-Time PCR for Rapid Simultaneous Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* in Amphibian Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(12), 4173-4177. doi:10.1128/jcm.02313-13
- Byrne, A. Q., Rothstein, A. P., Poorten, T. J., Erens, J., Settles, M. L., & Rosenblum, E. B. (2017).** Unlocking the story in the swab: A new genotyping assay for the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Molecular Ecology Resources*, *17*(6), 1283-1292. doi:10.1111/1755-0998.12675
- Carey, C., & Alexander, M. A. (2003).** Climate change and amphibian declines: Is there a link? *Diversity Distributions*, *9*(2), 111-121. doi:10.1046/j.1472-4642.2003.00011.x
- Cheng, T. L., Rovito, S. M., Wake, D. B., & Vredenburg, V. T. (2011).** Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(23), 9502-9507. doi:10.1073/pnas.1105538108
- Collins, J. P., & Storfer, A. (2003).** Global amphibian declines: Sorting the hypotheses. *Diversity Distributions*, *9*(2), 89-98. doi:10.1046/j.1472-4642.2003.00012.x
- Crawford, A. J., Lips, K. R., & Bermingham, E. (2010).** Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(31), 13777-13782. doi:10.1073/pnas.0914115107
- Cunningham, A. A., Beckmann, K., Perkins, M., Fitzpatrick, L., Cromie, R., Redbond, J., O'Brien, M. F., Ghosh, P., Shelton, J., & Fisher, M. C. (2015).** Emerging disease in UK amphibians. *Veterinary Record*, *176*(18), 468-468. doi:10.1136/vr.h2264
- Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A. A., Hyatt, A. D., Green, D. E., & Speare, R. (1999).** Emerging Infectious Diseases and Amphibian Population Declines. *Emerging Infectious Diseases*, *5*(6), 735-748. doi:10.3201/eid0506.990601
- Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2003).** Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity Distributions*, *9*(2), 141-150. doi:10.1046/j.1472-4642.2003.00016.x

- Farrer, R. A., Weinert, L. A., Bielby, J., Garner, T. W., Balloux, F., Clare, F., Bosch, J., Cunningham A. A., Weldon, C., Preez, L. H., Anderson, L., Kosakovsky, S. L., Shahar-Golan, R., Henk, D. A., & Fisher, M. C. (2011).** Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(46), 18732-18736. doi:10.1073/pnas.1111915108
- Fisher, R. N., & Shaffer, H. B. (1996).** The Decline of Amphibians in California's Great Central Valley. *Conservation Biology*, 10(5), 1387-1397. doi:10.1046/j.1523-1739.1996.10051387.x
- Fite, K. V., Blaustein, A., Bengston, L., & Hewitt, H. E. (1998).** Evidence of Retinal Light Damage in *Rana cascadae*: A Declining Amphibian Species. *Copeia*, 1998(4), 906. doi:10.2307/1447337
- Flores-Villela, O. (1993).** Herpetofauna of Mexico: distribution and endemism. In Biological diversity of Mexico: origins and distributions, T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa. (eds.). Oxford University Press, New York. 253-280 p.
- Flores-Villela, O. & P. Gerez. (1994).** Biodiversidad y conservación en México: vertebrados, vegetación y uso del suelo. Conabio/UNAM. México. 439 p.
- Halliday, T., & Adler, K. (2007).** *La Gran enciclopedia de los anfibios y reptiles*. Alcobendas, Madrid: Editorial Libsa.
- Hecnar, S. J., & Mcloskey, R. T. (1996).** Regional Dynamics and the Status of Amphibians. *Ecology*, 77(7), 2091-2097. doi:10.2307/2265703
- Hecnar, S. J., & Mcloskey, R. T. (1997).** Changes in the Composition of a Ranid Frog Community Following Bullfrog Extinction. *American Midland Naturalist*, 137(1), 145. doi:10.2307/2426763
- IUCN (2017).** The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-3. Disponible: <http://www.iucnredlist.org>; última consulta: 10/10/2018.
- Johnson, M., & Speare, R. (2005).** Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Diseases of Aquatic Organisms*, 65, 181-186. doi:10.3354/dao065181
- Klocke, B., Becker, M., Lewis, J., Fleischer, R. C., Muletz-Wolz, C. R., Rockwood, L., Aguirre, A. A., & Gratwicke, B. (2017).** *Batrachochytrium salamandrivorans* not

- detected in U.S. survey of pet salamanders. *Scientific Reports*, 7. doi:10.1038/s41598-017-13500-2
- Kueneman, J. G., Parfrey, L. W., Woodhams, D. C., Archer, H. M., Knight, R., & Mckenzie, V. J. (2013).** The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages. *Molecular Ecology*, 23(6), 1238-1250. doi:10.1111/mec.12510
- Laurance, W. F., Mcdonald, K. R., & Speare, R. (1996).** Epidemic Disease and the Catastrophic Decline of Australian Rain Forest Frogs. *Conservation Biology*, 10(2), 406-413. doi:10.1046/j.1523-1739.1996.10020406.x
- Lips, K. R., Burrowes, P. A., Mendelson, J. R., & Parra-Olea, G. (2005).** Amphibian Declines in Latin America: Widespread Population Declines, Extinctions, and Impacts. *Biotropica*, 37(2), 163-165. doi:10.1111/j.1744-7429.2005.00023.x
- Lips, K. R., Diffendorfer, J., Mendelson, J. R., & Sears, M. W. (2008).** Riding the Wave: Reconciling the Roles of Disease and Climate Change in Amphibian Declines. *PLoS Biology*, 6(3). doi:10.1371/journal.pbio.0060072
- Longcore, J. E., Pessier, A. P., & Nichols, D. K. (1999).** *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a Chytrid Pathogenic to Amphibians. *Mycologia*, 91(2), 219. doi:10.2307/3761366
- Martel, A., Sluijs, A. S., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M. C., Woeltjes, A., Bosman, W., Chiers, K., Bossuyt, F., & Pasmans, F. (2013).** *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(38), 15325-15329. doi:10.1073/pnas.1307356110
- Mendelson, J. R., Jones, M. E., Pessier, A., Toledo, G., Kabay, E. H., & Campbell, J. A. (2014).** On the Timing of an Epidemic of Amphibian Chytridiomycosis in the Highlands of Guatemala. *South American Journal of Herpetology*, 9(2), 151-153. doi:10.2994/sajh-d-14-00021.1
- Muletz, C., Caruso, N. M., Fleischer, R. C., Mcdiarmid, R. W., & Lips, K. R. (2014).** Unexpected Rarity of the Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Appalachian Plethodon Salamanders: 1957–2011. *PLoS ONE*, 9(8). doi:10.1371/journal.pone.0103728

- Nichols, D. K., Pessier, A. P., & Longcore, J.E. (1998).** Cutaneous chytridiomycosis in amphibians: an emerging disease?. Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians American Association of Wildlife Veterinarians Joint Conference. 269-271.
- O'Hanlon, S. J., Rieux A., Farrer R. A., Rosa, G. M., Waldman, B., Bataille, A., Kosch, T., Murray, K. A., Brankovics, B., Fumagalli, M., Martin, M., Wales, N., Alvarado-Rybak, M., Bates, K., Berger, L., Boll, S., Brookes, L., Clare, F., Courtois, E. A., Cunningham, A. A., Doherty-Bone, T. M., Ghosh, P., Gower, D. J., Hintz, W. E., Høglund, J., Jenkinson, T. S., Lin, C., Laurila, A., Loyau, A., Martel, A., Meurling, S., Miaud, C., Minting, P., Pasmans, F., Schmeller, D. S., Schmidt, B., Shelton, J. M., Skerratt, L. F., Smith, F., Soto-Azat, C., Spagnoletti, M., Tessa, G., Toledo, L., Valenzuela-Sanchez, A., Verster, Ruhan., Voross, J., Webb, R. J., Wierzbicki, C., Wombwell, E., Zamudio, K., Aanensen, D., James, T., Gilbert, M. P., Weldon, C., Bosch, J., Balloux, F., Garner, T. W. J., & Fisher, M. C. (2018).** Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science*, 360, 621-627. doi:doi:10.1126/science.aar1965.
- Parra-Olea G., García-París M. & Wake D. B. (1999).** Status of some populations of Mexican salamanders (Amphibia: Plethodontidae). *Revista de Biología Tropical* 47:217–223
- Parra-Olea, G., Martínez-Meyer, E., & Leon, G. P. (2005).** Forecasting Climate Change Effects on Salamander Distribution in the Highlands of Central Mexico. *Biotropica*, 37(2), 202-208. doi:10.1111/j.1744-7429.2005.00027.x
- Pessier, A. P., Nichols, D. K., Longcore, J. E., & Fuller, M. S. (1999).** Cutaneous Chytridiomycosis in Poison Dart Frogs (*Dendrobates* spp.) and Whites Tree Frogs (*Litoria Caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11(2), 194-199. doi:10.1177/104063879901100219
- Piotrowski, J. S., Annis, S. L., & Longcore, J. E. (2004).** Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a Chytrid Pathogen of Amphibians. *Mycologia*, 96(1), 9. doi:10.2307/3761981
- Pounds, J. A., Bustamante, M. R., Coloma, L. A., Consuegra, J. A., Fogden, M. P., Foster, P. N., LaMarca, E., Masters, K. L., Merino-Viteri, A., Puschendorf, R.,**

- Ron, S. R., Sanchez-Azofeita, A., Still, C. J., & Young, B. E. (2006).** Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439(7073), 161-167. doi:10.1038/nature04246
- Rooij, P. V., Martel, A., Nerz, J., Voitel, S., Immerseel, F. V., Haesebrouck, F., & Pasmans, F. (2011).** Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Mexican Bolitoglossine Salamanders Using an Optimal Sampling Protocol. *EcoHealth*, 8(2), 237-243. doi:10.1007/s10393-011-0704-z
- Rooij, P. V., Martel, A., Haesebrouck, F., & Pasmans, F. (2015).** Amphibian chytridiomycosis: A review with focus on fungus-host interactions. *Veterinary Research*, 46(1). doi:10.1186/s13567-015-0266-0
- Rosenblum, E. B., James, T. Y., Zamudio, K. R., Poorten, T. J., Ilut, D., Rodriguez, D., Eastman, J. M., Richards-Hrdlicka, K., Joneson, S., Jenkinson, T. S., Longcore, J. E., Parra-Olea, G., Toledo, L. P., Arellano, M. L., Medina, E. M., Restrepo, S., Flechas S. V., Berger, L., Briggs, C., & Stajich, J. E. (2013).** Complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed with genome resequencing data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(23), 9385-9390. doi:10.1073/pnas.1300130110
- Rovito, S. M., Parra-Olea, G., Vasquez-Almazan, C. R., Papenfuss, T. J., & Wake, D. B. (2009).** Dramatic declines in neotropical salamander populations are an important part of the global amphibian crisis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3231-3236. doi:10.1073/pnas.0813051106
- Sabino-Pinto, J., Bletz, M., Perl, R. B., Schmeller, D. S., Mutschmann, F., Wagner, N., Marte, A., Pasmans, F., Lotters, S., Schmidt, B., Veith, M., Vences, M., Steinfartz, S., & Hendrix, R. (2015).** First detection of the emerging fungal pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans* in Germany. *Amphibia-Reptilia*, 36(4), 411-416. doi:10.1163/15685381-00003008
- Schwalbe, C. R., & Rosen, P. C. (1988).** Preliminary report on effect of bullfrogs in wetland herpetofaunas in southeastern Arizona. *General Technical Report - US Department of Agriculture, Forest Service (RM-166 ed., pp. 166-173)*
- Sodhi, N. S., Bickford, D., Diesmos, A. C., Lee, T. M., Koh, L. P., Brook, B. W., Sekercioglu, C., & Bradshaw, C. J. (2008).** Measuring the Meltdown: Drivers of

Global Amphibian Extinction and Decline. *PLoS ONE*, 3(2): e1636.
doi:10.1371/journal.pone.0001636

Spitzen-van der Sluijs, A., Spikmans F., Bosman W., Zeeuw M., Van der Meij T., Goverse E., Kik, M., Pasmans, F., & A. Martel (2013): Rapid enigmatic decline drives the fire salamander (*Salamandra salamandra*) to the edge of extinction in the Netherlands. *Amphibia-Reptilia*, 34, 233–239. doi: 10.1163/15685381-00002891

Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S., Fischman, D. L., & Waller, R. W. (2004). Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science*, 306(5702), 1783-1786.
doi:10.1126/science.1103538

Voyles, J., Young, S., Berger, L., Campbell, C., Voyles, W. F., Dinudom, A., . . . Speare, R. (2009). Pathogenesis of Chytridiomycosis, a Cause of Catastrophic Amphibian Declines. *Science*, 326(5952), 582-585. doi:10.1126/science.1176765

Wake, D.B., & J.F. Lynch. (1976). The distribution, ecology and evolutionary history of plethodontid salamanders in tropical America. *Natural History Museum of Los Angeles County Science Bulletin* 25:1– 65.

Wake, D. B., & Vredenburg, V. T. (2008). Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(Supplement 1), 11466-11473. doi:10.1073/pnas.0801921105

Yap, T. A., Nguyen, N. T., Serr, M., Shepack, A., & Vredenburg, V. T. (2017). *Batrachochytrium salamandrivorans* and the Risk of a Second Amphibian Pandemic. *EcoHealth*, 14(4), 851-864. doi:10.1007/s10393-017-1278-

ANEXOS

Tabla 1. – Localidades visitadas y número de individuos muestreados.

Localidad	Estado	Elevación (m)	Latitud	Longitud	Número de individuos
Las Arañas	Querétaro	1620	21.27557	-99.15775	0
La Trinidad	San Luis Potosí	1984	21.40281	-99.07204	6
La Barranca	San Luis Potosí	879	21.33092	-99.04805	2
Potreriillos	San Luis Potosí	1195	21.30706	-99.06547	0
La Iglesia	San Luis Potosí	1193	21.31886	-99.05264	1
El Coni	Hidalgo	2234	20.88812	-99.22618	12
Cerro el Baúl	Chiapas	1592	16.55935	-94.17205	2
Leyva Velázquez	Chiapas	2133	16.46315	-91.79237	1

Tabla 2. - Especímenes muestreados para la detección histórica de Bd por medio de los ensayos de qPCR. Las celdas sobresaltadas representan a los especímenes positivos para la detección de GE del hongo.

Museo	ID	Fecha colecta	Especie	Estado	Localidad
UMMZ	8	01/1952	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	
FMNH	142457	01/1952	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	
MCZ	44033	01/1952	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MCZ	30607	11/1955	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
UMMZ	9852	07/1964	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
UMMZ	9854	07/1964	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
UMMZ	9880	07/1964	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
UMMZ	9881	07/1964	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
UMMZ	9898	07/1964	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
UMMZ	9868	07/1964	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
UMMZ	9870	07/1964	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
UMMZ	9857	07/1964	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
UMMZ	9869	07/1964	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
UMMZ	9871	07/1964	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
UMMZ	9891	07/1964	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
UMMZ	9886	07/1964	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
UMMZ	9856	07/1964	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
UMMZ	9860	07/1964	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
UMMZ	9890	07/1964	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
UMMZ	9877	07/1964	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos

ATM	27672	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27683	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27686	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27704	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27684	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27691	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27670	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27705	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27700	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27694	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27695	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27669	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27675	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27699	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27708	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27667	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27703	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27692	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27706	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27665	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27678	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27689	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27702	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27707	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27701	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27666	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27676	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27685	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27696	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	27700	09/1968	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	30572	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30087	07/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	EL Lobo
ATM	30028	08/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	30570	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	29998	03/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	30012	08/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	30564	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30073	09/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30085	07/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	29999	07/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	30580	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	EL Lobo
ATM	30588	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	EL Lobo
ATM	2996	07/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	30022	08/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	30011	07/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño

ATM	30086	07/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
ATM	30574	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30562	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30563	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30581	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MVZ	223600	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos
MVZ	223582	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos
MVZ	223573	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos
MVZ	223598	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos
MVZ	223603	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos
MVZ	223578	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos
MVZ	223607	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos
MVZ	223574	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos
MVZ	223580	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos
MVZ	223575	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos
MVZ	223596	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos
MVZ	128260	08/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MVZ	128259	08/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MVZ	128257	08/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MVZ	128256	08/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MVZ	128255	08/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MVZ	128241	08/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MVZ	128254	08/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MVZ	128253	08/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MVZ	128252	08/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MVZ	128251	08/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MVZ	128250	08/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MVZ	128248	08/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MVZ	128247	08/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MVZ	128246	08/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MVZ	128244	08/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MVZ	128245	08/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MVZ	128243	08/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MVZ	128242	08/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MVZ	223610	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos
MVZ	223576	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos
MVZ	223591	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos
MVZ	223577	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos
MVZ	223579	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos
MVZ	223583	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos
MVZ	223588	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos
MVZ	223589	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos
MVZ	223597	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos
MVZ	223599	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos
MVZ	223592	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potrerillos

MVZ	223609	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	223594	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	223586	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	223604	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	223572	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	223590	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	223593	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	223595	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	223584	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	223603	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	223608	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	223613	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	223606	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	223611	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	223581	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	223602	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	223601	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	223612	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	223614	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	223587	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	223585	12/1969	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
ATM	31619	06/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30620	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30621	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	31617	06/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	31628	06/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30602	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30616	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30590	06/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	31629	06/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	31624	06/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30614	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	31614	06/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30618	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	32995	06/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	31622	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30595	06/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	31627	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30626	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30619	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30611	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30619	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	31615	06/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30598	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	31631	06/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo

ATM	30613	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	31623	06/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30593	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30623	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	31613	06/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30617	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	31625	06/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30591	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30581	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30609	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30606	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30604	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30627	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30625	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30610	01/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	30603	16/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	31612	06/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	31620	06/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	31621	06/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	31626	06/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	31630	06/1970	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MCZ	85403	06/1971	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	32030	04/1971	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	36029	04/1971	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	36035	04/1971	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	37675	06/1971	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	36033	04/1971	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	36034	04/1971	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	36028	04/1971	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	36032	04/1971	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	36031	04/1971	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
ATM	36036	04/1971	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MVZ	129025	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129048	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129047	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129043	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129041	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129040	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129039	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129038	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129037	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129035	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129034	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129033	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129032	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia

MVZ	129031	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129038	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129027	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129024	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129023	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129022	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129020	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129019	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129017	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129016	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129014	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129009	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129008	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	200620	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129030	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129026	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129018	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129045	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129012	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	129046	04/1975	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	163966	08/1979	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
MVZ	163964	08/1979	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
MVZ	163963	08/1979	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Madroño
MVZ	178692	10/1981	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Querétaro	El Lobo
MVZ	178694	10/1981	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	185971	01/1982	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	185970	01/1982	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	178693	01/1982	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	201386	09/1982	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	201385	09/1982	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	201384	09/1982	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	La Iglesia
MVZ	200676	09/1982	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	200678	09/1982	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	200677	09/1982	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	San Luis Potosí	Potreriillos
MVZ	269536	01/2012	<i>Chiropterotriton magnipes</i>	Hidalgo	El Coni

UMMZ = Museum of Zoology. University of Michigan.

FMNH = Field Museum of Natural History. Chicago.

MCZ = Museum of Comparative Zoology. University of Harvard.

LSUMZ = Museum of Zoology. Louisiana State University.

ATM = Museum of Vertebrates. Texas A&M University.

MVZ = Museum of Vertebrate Zoology. University of Berkeley.