



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



Dinámica Estacional de la Infección por el Hongo Quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* en una Población de Salamandras de la Especie *Pseudoeurycea leprosa* (Cope, 1869) en el Parque Nacional “La Malinche”.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

Presenta:

Aldo López Velázquez

DIRECTOR: Dra. GABRIELA PARRA OLEA

ASESOR: Dr. MANUEL FERIA ORTIZ

MÉXICO, D.F.

ABRIL 2014



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que el alumno **LÓPEZ VELÁZQUEZ ALDO**, con número de cuenta **409020287**, de la carrera de Biología se le ha fijado el día **29** del mes de **abril** de 2014 a las **10:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE	DR. ANTONIO ALFREDO BUENO HERNÁNDEZ
VOCAL	DRA. GABRIELA PARRA OLEA
SECRETARIO	DR. MANUEL FERIA ORTIZ
SUPLENTE	M. en C. MARÍA DE LAS MERCEDES LUNA REYES
SUPLENTE	DR. JUSTO SALVADOR HERNÁNDEZ AVILÉS

El título de la tesis que presenta es: **Dinámica Estacional de la Infección por el Hongo Quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* en una Población de Salamandras de la Especie *Pseudoeurycea leprosa* (COPE, 1869) en el Parque Nacional "La Malinche".**

Opción de titulación: tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F., a 18 de marzo de 2014

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

En mi búsqueda del secreto de la vida, empecé mi investigación en la histología. Insatisfecho por la información que la morfología celular podía proporcionarme acerca de la vida, recurrí a la fisiología. Al encontrar compleja a la fisiología, me dirigí a la farmacología. Encontré la situación también complicada y acudí a la bacteriología. Pero las bacterias fueron igual de complejas. Descendí al nivel molecular, estudié la química y la fisicoquímica. Después de veinte años de trabajo, llegué a la conclusión de que para entender la vida necesitamos descender al nivel electrónico y al mundo de las ondas mecánicas. Pero los electrones son solo electrones y no tienen vida del todo. Evidentemente en esta ruta perdí la pista de la vida; se me había escapado entre los dedos.

Albert Szent-Györgi

Memorias personales

Agradecimiento

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de la máxima casa de estudios.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza que me alojo en sus instalaciones mientras me convertía en profesionista.

Al Instituto de Biología por facilitarme la infraestructura para llevar a cabo este proyecto.

A la Dra. Gabriela Parra Olea por su enseñanza, paciencia, apoyo, tiempo y recursos, así como la amistad que siempre me brindo. Gracias por permitirme estar en tu laboratorio, por las comidas y por ser una tutora bien buena onda.

Al Dr. Manuel Fera Ortiz por su conocimiento transmitido tanto en este proyecto como durante la carrera y gracias por enseñarme a buscar el fundamento de las cosas.

Al Dr. Antonio Alfredo Bueno Hernández por el aprendizaje obtenido a lo largo de la carrera y mostrarme que la enseñanza no tiene por qué ser tediosa.

A la M. en C. María de las Mercedes Luna Reyes y al Dr. Justo Salvador Hernández Avilés por sus comentarios y su tiempo para la correcta realización de este proyecto.

A la M. en C. Cinthya Mendoza Almeralla sin tus enseñanzas y paciencia nunca hubiera hecho esto, gracias por todo.

Dedicatoria

A mi madre, por su entereza y esfuerzo, por que sin lugar a dudas llegue a donde estoy gracias a ti, por tus cariños que siempre me diste, pero sobre todo por ser la mejor mamá del mundo.

A mi padre, cuyo ejemplo máximo es trabajar sin descanso, que no importo las adversidades de pequeño tú siempre te esforzaste, te quiero mucho.

A mi hermano, sin ti no sería lo competitivo que soy, gracias por todo lo enseñado y por todos los juegos compartidos y a jugar hasta la muerte.

A “jiji” tu carita y sonrisa me alegran cada día, al “Cabage” cuyos pleitos y puntadas me divierten y a mi cuñada por sus muestras de apoyo.

A mi familia en general, por el apoyo brindado en cada una de mis etapas.

A los “metepequeños”, los amigos son los hermanos que uno elige, Gracias al mono Alex por su eterno apoyo y confianza, por ser la competencia para ser mejor, Al mono Oscar por tantas simbiosis juntos y a Martha e Irving mis más viejos amigos del FES-Z.

A mis amigos del IB, por todas las fiestas y el bailongo, Gracias Mirn que sin ningún interés siempre me brindaste lo mejor de ti, al Rafa porque eres un y un gran amigo, a Mariana de la noche por ser chida, al Jorch por ser la bandita, a mi Adri porque te rifas como las grandes y muy en especial a Cinthya.

A Ana, mi jefa de Sanborns que siempre me ayudaste a acomodar mis horarios para poder acceder a la Universidad, ala Vichyta por todos los buenos ratos que pasamos juntos.

A Ani, por compartir parte de su tiempo conmigo sabes que te quiero y que la FdStAHyS.

RESUMEN

I.	INTRODUCCIÓN.....	2
	1.1. Situación mundial.....	2
	1.2. Factores causales del declive de anfibios.....	2
	1.3. Quitridiomycosis.....	3
	1.3.1. Características de <i>Bd</i>	3
	1.3.2. Preferencias de Hábitat: temperatura, humedad y altitud.....	4
	1.3.3. Especies vulnerables a la infección por <i>Bd</i>	5
	1.3.4. Interacción de <i>Bd</i> con hospedero.....	6
	1.4. <i>Bd</i> en México.....	7
II.	JUSTIFICACIÓN.....	8
III.	PROBLEMÁTICA.....	8
IV.	HIPÓTESIS.....	9
V.	OBJETIVOS.....	9
VI.	METODOLOGÍA.....	9
	6.1. Muestreo.....	9
	6.2. Cultivo de <i>Bd</i>	11
	6.3. Reacción Cuantitativa de de la Cadena de Polimerasa (qPCR).....	12
	6.3.1. Preparación de los estándares.....	12
	6.3.2 Extracción de ADN de las muestras desconocidas.....	12
	6.3.3 Cuantificación de <i>Bd</i>	12
	6.4. Análisis estadísticos.....	14
VII.	RESULTADOS.....	16
	7.1. Muestreo.....	16
	7.2. Cuantificación.....	16
	7.3. Análisis estadísticos.....	16
VIII.	DISCUSIÓN	22
	8.1. Estacionalidad de la infección por <i>Bd</i>	22
	8.2. Prevalencia de individuos infectados por <i>Bd</i>	23
	8.3. Relación entre la infección por <i>Bd</i> y factores físicos.....	24
	8.4. Relación entre la prevalencia de la infección por <i>Bd</i> y estado de desarrollo..	25
IX.	FUTURAS INVESTIGACIONES.....	26
X.	CONCLUSIONES.....	27
XI.	REFERENCIAS.....	28

ANEXOS

El impacto que tiene la infección causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) y su asociación con respecto a las estaciones climáticas por lo general se ha estudiado más a detalle en anuros, sin embargo también afecta a caudados y es importante para entender el comportamiento de la infección en este grupo con el fin de tomar acciones de conservación.

La quitridiomycosis es una enfermedad causada por un hongo quítrido (Quitridiomycota; Quitridiales) llamado *Batrachochytrium dendrobatidis*, el cual infecta la piel de los anfibios, provocándoles búsqueda constante de agua, postramiento al sol, reducción de movimiento (con lo cual se aumenta la depredación) e incremento en la tasa de muda de piel, entre otros.

En este estudio se realizó un muestreo anual para detectar la prevalencia del hongo patógeno *Bd* en de una población de salamandras de la especie *Pseudoeurycea leprosa*, en el parque nacional La Malinche. El grado de infección de *Bd* se estimó mediante una prueba diagnóstica basada en PCR cuantitativo. A cada organismo se le tomó datos de temperatura corporal, longitud hocico-cloaca además de factores ambientales, como temperatura ambiental, humedad y temperatura del micro hábitat, con el fin de poder relacionar estas variables con la infección. Se encontró que la quitridiomycosis se distribuye de manera indistinta a lo largo del año y por lo tanto no está relacionada con ningún factor medio-ambiental, tampoco se encontró que tenga relación con alguna categoría de edad. El grado de infección varía de ser indetectable (cero equivalentes genómicos) hasta 7894 equivalentes genómicos. La prevalencia tuvo un rango que va desde 7.69% hasta 21.09%, es decir que casi la quinta parte de la muestra está infectada a lo largo del año. Los resultados indican que esta población mantiene a la infección en un estado alto (17.3%), muy probablemente debido a respuestas corporales de los organismos, lo que parece indicar que la población y la enfermedad coexisten.

I.INTRODUCCIÓN

1.1 Situación Mundial

En la década de los años 80, se consideraba que el destino de los anfibios era común al de los otros grupos animales y que al conservar suficientes cantidades de hábitat, se podría conservar su biodiversidad (Young *et al.*, 2004). Posteriormente se hicieron observaciones que indicaban que poblaciones de anfibios estaban disminuyendo e incluso desapareciendo aún en hábitats conservados. Este fenómeno se documentó en varios lugares como, Australia (Berger *et al.*, 1998), Centroamérica (Berger *et al.*, 1998; Lips, 1999; Lips *et al.*, 2003b), Sudamérica (Ron y Merino, 2000), Puerto Rico, Estados Unidos (Carey, 1999), España (Bosch, *et al.*, 2000), Nueva Zelanda (Bishop, 2000) y otras partes de Asia (Une *et al.*, 2008; Goka *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2010; Kusrini *et al.*, 2008). Por lo tanto se determinó que el problema era a nivel mundial (Wake y Vredenburg, 2008) y que no eran necesariamente casos de extinción provocada por actividades antropogénicas (Blaustein *et al.*, 1994; Lips y Donnelly, 2002).

En un principio, se pensó que el declive podría corresponder a fluctuaciones poblacionales naturales que presentan algunas especies de anfibios. (Pechman y Wilbur, 1994). Sin embargo se demostró estadísticamente que las disminuciones eran significativamente más elevadas que las esperadas de manera natural, por lo que se dictaminó que algo específico y problemático estaba actuando en contra de los anfibios (Pounds *et al.*, 1997). Por ejemplo, se examinó la región de Monteverde en la Cordillera de Tilarán, Costa Rica, donde un colapso de poblaciones en 1987 produjo la desaparición del endémico sapo dorado (*Bufo periglenes*) y del 40% de las poblaciones de anfibios (Crump *et al.*, 1992). En este caso tratándose de una Reserva Biológica ("Bosque Nuboso de Monteverde"), el hábitat estaba sin cambio aparente, por lo tanto, las disminuciones de anfibios sólo podrían ser explicadas por factores que no son los impactos obvios y directos causados por los seres humanos (Pounds *et al.*, 1997).

1.2 Factores Causales del Declive de Anfibios

Los factores que se han asociado a la disminución y extinción de anfibios incluyen el calentamiento global, que modifica la distribución y abundancia de las especies (Pounds *et al.*, 1999), la pérdida del hábitat (Young *et al.*, 2004) y más recientemente la presencia de parásitos como virus, bacterias y hongos (Berger *et al.*, 1998; Lips, 1999). Con frecuencia las disminuciones poblacionales se deben a la acción sinérgica de varios de estos factores, que hace más sensibles a los anfibios a adquirir enfermedades o bien a ser afectados por contaminantes (Santos-Barrera, 2004). Algunos de los patógenos que afectan a las poblaciones de anfibios son las bacterias (como *Aeromonas sp.*) (Huys *et al.*, 2003), el hongo *Saprolegnia* (Kiesecker *et al.*, 2001) y algunos helmintos (Tantaleán *et al.*, 1992; Sarmiento *et al.*, 1999). Particularmente los helmintos ocasionan malformaciones en el cuerpo y ocasionalmente la muerte de algunos individuos. En pocos casos podía asociarse la presencia de alguno de estos parásitos con el declive en las poblaciones y no se consideran como la causa de extinción en alguna especie de determinada

localidad (Santos-Barrera, 2004). Posteriormente se detectó la presencia de un hongo quitridio en anuros muertos de Mesoamérica y Australia (Berger *et al.*, 1998).

1.3 Quitridiomicosis

Berger *et al.* (1998) detectaron un hongo quitrido que fue el causante de las disminuciones de anfibios, tres especies de anuros de Australia y diez especies de Costa Rica y Panamá. El hongo quitridio fue aislado, cultivado y descrito por Longcore *et al.* (1999) y fue nombrado *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). La comparación de este organismo con las muestras tomadas de ejemplares de anuros de Australia y Centroamérica permitió definir que se trataba de la misma especie de hongo (Berger *et al.*, 1998 y Longcore *et al.*, 1999).

El posible origen y diseminación de éste, fue descrito con base en los datos de las secuencias de ADN y el rastreo de organismos infectados depositados en colecciones científicas, esto ha permitido plantear algunas hipótesis sobre su origen y dispersión (Morehouse, 2003). Aparentemente *Bd* proviene de África y fue transportado a América en las décadas de los 60's y 70's cuando se exportaban grandes cantidades de ranas del género *Xenopus*, las cuales eran usadas por la industria farmacéutica (Daszak *et al.* 1999). Otra hipótesis basada en un estudio que se centró en la re-secuenciación del genoma de *Bd*, obtuvo que uno de los linajes evolutivos se encuentra en Brasil, sin embargo en el mismo artículo se aclara que es prematuro fijar un origen para *Bd* (Rosemblum, 2013).

El *Bd* se ha dispersado por casi todo el mundo a través de océanos y otras importantes barreras geográficas alcanzando nuevos continentes. Aparentemente *Bd* se propaga a través de su propio movimiento en cuerpos de agua, a través de las aguas superficiales en caso de lluvia, o por la actividad de cada uno de los anfibios infectados (Speare *et al.* 2001). También se ha postulado que *Bd* puede ser transportado por uno o más vectores como aves, peces migratorios, o por la presencia del hombre (Laurance *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 2003).

1.3.1 Características de *Bd*

Los hongos Quitridiomicetos son un grupo grande y diverso que se encuentran en casi todos los tipos de medio ambiente, incluyendo selvas tropicales, los desiertos y la tundra ártica (Powell, 1993). Estos se encuentran con frecuencia en el suelo y el agua, donde digieren sustratos tales como quitina de cadáveres de insectos, celulosa a partir de materia vegetal, la queratina del cabello y la piel, o el polen.

El *Bd* es un hongo quítrido (Quitridiomicota;Quitridiales), el cual tiene dos etapas de vida conocidas que son típicas de quitridios: una sésil en la cual éste se constituye por un talo con un solo zoosporangio, y una móvil, caracterizada por zoosporas uniflageladas, que pueden nadar hasta 24 horas (Fig.1) (Longcore *et al.*, 1999; Berger *et al.*, 2005a; Piotrowski *et al.*, 2004)

Las zoosporas de *Bd* son transmitidas por el agua, (Berger *et al.*, 1998) y pueden infectar tanto la piel de los organismos adultos así como las partes bucales de las larvas de anuros (Bosch, 2003). Las Zoosporas producen un adhesivo con el cual se enquistan a su hospedero (Bartnicki-García y Sing, 1987). Las zoosporas enquistadas forman finos rizoides, estos rizoides suministran nutrientes para el desarrollo del zoosporangio joven; éste tarda entre 4-5 días para convertirse en un zoosporangio maduro que contiene numerosas zoosporas (Longcore *et al.*, 1999). Los zoosporangios de *Bd* crecen en el estrato córneo de la epidermis en la parte queratinizada (parte superficial) (Berger *et al.*, 2005a), sin embargo también se han encontrado zoosporangios en los estratos internos de la epidermis (Berger *et al.*, 2005b). *Bd* es inoperculado y se desarrolla monocéntrica o colonialmente (Longcore *et al.*, 1999).

Los zoosporangios de *Bd* también pueden ser capaces de existir y proliferar como saprobios en el medio ambiente (Longcore *et al.*, 1999). Aunque algunos quitridios poseen una etapa de reposo caracterizada por una gruesa pared de esporas, las cuales pueden sobrevivir durante décadas en condiciones extremas (Powel, 1993), esta etapa no se ha observado en *Bd* puesto que pareciera ser una especie relativamente frágil (Longcore *et al.*, 1999).

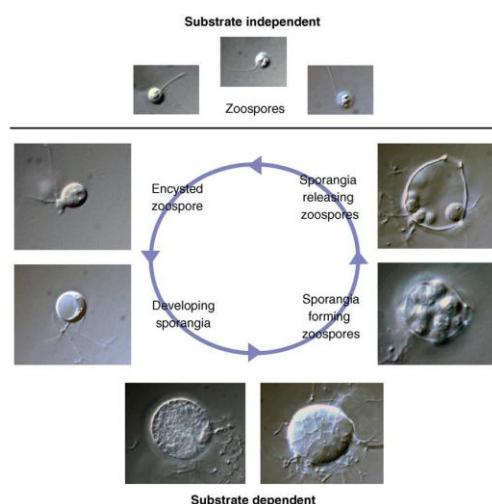


Fig. 1. Ciclo de vida del hongo quitrido *Batrachochytrium dendrobatidis* (Killpatrick *et al.*, 2010).

1.3.2 Preferencias de hábitat: temperatura, humedad y altitud

Bd se encuentra mundialmente distribuido con excepción de la Antártida (Young *et al.*, 2004) aunque la mayoría de los registros se encuentran en zonas montañosas entre altitudes de 1000 a 3500 msnm (Ron, 2005). Los rangos a los cuales crece y se reproduce *Bd* oscilan entre las temperaturas de 4-25 °C y el pH de 4-8, a su vez también puede soportar la congelación en cierto grado (Gleason *et al.*, 2008). El crecimiento óptimo se produce entre 17-25 °C y un pH de 6-7. La maduración del zoosporangio aumenta con la temperatura, y el número de zoosporas producido por el mismo es mayor a menor temperatura (Woodhams *et al.*, 2008). Sin embargo, varias cepas muestran la reducción del crecimiento y/o mortalidad por encima de 28 °C, y esto parece influir en los patrones de infección (Piotrowski *et al.*, 2004). Se han hecho estudios en cuanto a la

supervivencia de *Bd* fuera de su hospedero, los cuales reportan que en arena estéril y agua proveniente de un lago en condiciones de laboratorio, *Bd* persistió hasta por tres meses (Johnson y Speare, 2005); sin embargo, su persistencia en condiciones no estériles cuando se enfrentan a la competencia de otros microorganismos no se conoce (Longcore *et al.*, 1999).

Las zonas tropicales, debido a sus características medio-ambientales, como temperatura, humedad y precipitación, favorecen el crecimiento del patógeno (La Marca *et al.*, 2005); estudios como el de Retallick *et al.* (2004) mostraron un pico estacional de las infecciones durante los meses más fríos del año en una localidad en Australia, a su vez, Kriger y Héroe (2006) encontraron que las ranas que fueron infectados durante el invierno podrían eliminar la infección durante los meses más cálidos. Sin embargo, estudios de este tipo en el Neotrópico, no se han realizado (Lips *et al.*, 2003b).

1.3.3 Especies vulnerables a la infección por *Bd*

Las comunidades de anfibios que han sido devastadas en Costa Rica han dejado muestra de pocas especies resistentes entre las cuales destacan las de desarrollo directo que no se encuentran en contacto directo con el agua (Lips *et al.*, 2003a, 2006); también se ha encontrado que las especies que tienen hábitos predominantemente terrestres son menos vulnerables puesto que no tienen contacto directo con el patógeno. Estudios han demostrado que la dinámica huésped-patógeno está influenciada por las condiciones climáticas y que las cargas de *Bd* en organismos infectados en la naturaleza sería mayor durante la estación seca cuando las temperaturas son menores y los organismos están estresados por la sequía (Joglar *et al.*, 2007; Burrowes *et al.*, 2004).

La mortalidad entre especies de caudados y otras de anuros ha sido sometida a experimentación. Aparentemente la mortalidad fue esporádica y no se relaciona con la dosis o la tensión por estrés causado por la quitridiomycosis (Davidson *et al.*, 2003). Otros factores, tales como la salud inicial de los animales (Rollins-Smith, 2001), o factores de estrés, tales como exposición a los pesticidas, bacterias, o la temperatura pueden contribuir a la mortalidad o recuperación del individuo (Carey *et al.*, 1999; Davidson *et al.*, 2001; Hopkins y Channing, 2002).

En conclusión los organismos con fases larvarias dependientes del agua y aquellos con fases larvarias prolongadas son más vulnerables, ya que están en contacto por más tiempo con el patógeno (Berger *et al.*, 1998; Berger *et al.*, 1999). En contraste, los organismos con desarrollo directo son menos vulnerables. Por otra parte, cada especie presenta diferentes defensas inmunológicas lo que los hace en cierta medida resistente a la quitridiomycosis.

1.3.4 Interacciones de *Bd* con hospedero.

La dinámica de *Bd* en poblaciones de anuros está bien documentada en su mayoría, para urodelos no es así, debido a que éstos son más crípticos en sus ambientes. Dentro de los estudios realizados se encuentra el de Davidson *et al.* (2003) en el que infectó salamandras del género *Ambystoma* y ranas de distintas especies con la misma cepa de *Bd* para delimitar si existe distinta susceptibilidad. Los resultados indican que no existe diferencia, aunque la sobrevivencia a la infección puede estar delimitada por mecanismos tales como la producción de péptidos antimicrobianos (Fredericks y Dankert, 2000) o al rápido desprendimiento de la piel infectada (Davidson *et al.*, 2003).

Un estudio de Marca-Recaptura en una población *Rana muscosa* a lo largo de tres años mostró que organismos infectados por *Bd* estaban presentes de manera permanente sin notar una clara incidencia para determinada época, sin embargo, el verano fue el que mostró más consistencia en la infección. Una de las cosas más significativas que arrojó este estudio fue que el 95% de los individuos que en un momento dieron positivos en algún otro muestreo resultaron negativos con lo que la infección se pierde y gana a través del tiempo (Brigs *et al.*, 2005). Otro estudio similar realizado durante 9 meses en Australia con *Litoria pearsoniana* mostró que *Bd* reducía la supervivencia mensual aparente de las ranas infectadas en una población endémica en un 38% (Murray *et al.*, 2009).

Algunos de los cambios conductuales que provoca la infección por *Bd* son la búsqueda constante de agua, tomar el sol, reducción de movimiento (con lo cual se aumenta la depredación), incremento en la tasa de muda de piel, entre otros (Parris *et al.*, 2004a), todos estos cambios pueden alterar las dinámicas poblacionales incluso a gran escala (Killpatrick *et al.*, 2010). Hay dos lesiones importantes provocadas por la quitridiomycosis, la primera la pérdida de secciones en la piezas bucales de las larvas con lo cual se pierde la eficiencia del pastoreo, la ingesta de alimentos y la supervivencia (Parris *et al.*, 2004b; Parris *et al.*, 2004c) y en segundo lugar, en organismos adultos, la proliferación de células keratinizadas (hiperplasia) y la fusión de las capas de queratina (queratosis), estas últimas lesiones podrían interferir en el equilibrio osmótico (Berger *et al.*, 1998; Voyles *et al.*, 2007).

Por último hay un factor que se involucra con la recuperación de los organismos. Debido a que *Bd* afecta la parte queratinizada externa de la piel, los anfibios en respuesta, pueden producir péptidos antimicrobianos en esta misma capa, así pues está parece ser la principal defensa contra estos patógenos (Rollins-Smith, 2001); estos péptidos se han encontrado en anuros de la familia Ranidae y en salamandras de las especies *Plethodon cinereus* (Fredericks y Dankert, 2000), y *Ambystoma tigrinum* (Rollins-Smith, 2002). La eficacia de estos péptidos es dependiente de la temperatura y los factores que puedan influir en el medio ambiente para su síntesis y liberación (Matutte *et al.* 2000).

1.4 *Bd* en México

El primer registro que se tiene de la presencia de *Bd* en México fue el reportado por Lips *et al.* (2004) en el cual se realizó una evaluación de la conservación de especies de anuros en las montañas de la Sierra de Juárez, Oaxaca y Agua de Obispo, Guerrero; en bosques mesófilos y de encino. Algunos de los individuos muertos muestreados en estas localidades se examinaron por un patólogo y se determinó que estaban infectados por el *Bd*.

Hasta el año 2006 solo se tenían registradas en México 17 especies de anfibios infectadas por *Bd* (Rollin-Smith *et al.*, 2002; Lips *et al.*, 2004; Frias-Alvarez *et al.*, 2008), principalmente en tres familias; Ambystomatidae, Hylidae y Ranidae. De las especies infectadas tres están en la categoría de críticamente amenazadas, tres en la categoría de amenazadas y tres vulnerables. En el estudio realizado por Muñoz *et al.* (2006) se detectó presencia de *Bd* en 24 especies de anfibios, equivalente al 21 % de las especies de anfibios en el sureste de México. Las especies infectadas pertenecen principalmente a las familias Bufonidae, Hylidae, Microhylidae, Plethodontidae y Ranidae, el género con mayor incidencia de *Bd* fue *Plectrohyla*. También se detectó el grado de infección y resultó que la especie *Dendrotriton xolocaees* la más infectada, la segunda especie más infectada es *Hyla walkeri* y después las ranas *Smilisca baudinii* y *Plectrohyla matudai*.

Frias-Alvarez *et al.* (2008) confirmaron la presencia de *Bd* en un número elevado de los anfibios endémicos de México. Los resultados sugieren que *Bd* está ampliamente distribuido a lo largo de la Faja Volcánica Transmexicana en los bosques de pino o pino-encino. Este estudio encontró la quitridiomycosis en localidades relativamente perturbadas como Distrito Federal, Estado de México, Guerrero, Michoacán, Morelos, Oaxaca y Puebla, así como en bosques prístinos como la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca en el estado de Michoacán y el "Centro Ceremonial otomí", en el Estado de México. A su vez reportan que la especie *Ambystoma mexicanum* en las poblaciones en estado silvestre no salió positiva para *Bd*, sin embargo aclaran que su muestra fue muy pequeña como para dar por sentado que esta especie se encuentra totalmente libre del patógeno.

Las poblaciones de *Rana tarahumare* y *Lithobates yavapaiensis* dieron positivas para *Bd* en Sonora y Arizona, estas poblaciones respondieron de una variedad de formas a la quitridiomycosis según los estudios realizados por Hale *et al.* (2005), las cuales van desde ninguna respuesta detectable hasta la extinción aparente de la población. Sin embargo más al sur no se ha confirmado una asociación entre la quitridiomycosis y descensos poblacionales aunque la enfermedad se ha reportado presente. La asociación de episodios de mortalidad, con las estaciones más frías apuntan a que las bajas temperaturas son un factor estrés (Rollins-Smith *et al.*, 2002).

II. JUSTIFICACIÓN

Para el caso específico de *Pseudoeurycea leprosa* el panorama es desalentador; Mendoza-Almeralla. *com. pers.* (2011) estudia actualmente la mortalidad que tiene esta especie una vez que está infectada a distintas concentraciones de *Bd* y de acuerdo a distintos gradientes de temperatura, los resultados parecen mostrar que a mayores niveles de estrés ocasionados por temperaturas elevadas las salamandras tendrán su sistema inmune más bajo y serán más afectadas por el *Bd* (resultados sin publicar). Todo esto se encruce tomando en consideración que Parra-Olea *et al.* (2005) modelaron la distribución de esta y otra especie tomando en cuenta el panorama del cambio climático proyectado para el 2050 y estimaron que para esa fecha esta especie podría perder hasta el 75% de su distribución actual y aunque su distribución potencial esta en áreas protegidas, no se puede asegurar la sobrevivencia de esta especie pues la extinción de especies en lugares conservados debido al *Bd* ya ha ocurrido.

Este estudio servirá para conocer más afondo la dinámica del patógeno quitrido *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) que sinérgicamente ha actuado en la disminución de diversas poblaciones de anfibios, posiblemente en concierto con los cambios climáticos (Taylor *et al.*, 1999; Speare y Berger, 2000; Lipset *al.*, 2003b), lo cual es crucial para saber cuál es la acción que el *Bd* tiene sobre su hospedero, en especial en una escala estacional, puesto que en ésta y su relación intrínseca que tiene con la temperatura y humedad, modelan principalmente su comportamiento. Esto tiene más importancia puesto que la especie de *Pseudoeurycea leprosa* esta enlistada como amenazada por la Nom-059-SEMARNAT-2010 por lo que podrían llegar a encontrarse en peligro de desaparecer a corto o mediano plazo, si siguen operando los factores que inciden negativamente en su viabilidad.

III. PROBLEMÁTICA

Las salamandras de la familia Plethodontidae contribuyen significativamente a la diversidad biológica de América Central (Larson *et al* 2006.; Wake y Vredenburg 2008), pero están experimentando importantes disminuciones que podrían ser causadas por la quitridiomycosis (Parra-Olea *et al*, 1999; Lipset *al* 2006; Rovito *et al* 2009). Por ejemplo, *Bd* se detectó recientemente en poblaciones de salamandras plethodontidas que están disminuyendo en México y Guatemala (Cheng *et al.*, 2011).

Importantes declives en el sur de México de salamandras plethodontidas ocurrieron a finales de 1970 y 1980, durante o anterior de muchos reportes de disminuciones de poblaciones de anuros. Las especies en declive comprenden varios de los principales linajes evolutivos de las salamandras tropicales, subrayando que una parte significativa de la diversidad filogenética de las salamandras neotropicales está en riesgo (Parra-Olea *et al.*, 1999).

IV. HIPÓTESIS

La prevalencia y el grado de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Pseudoeurycea leprosa* será más elevado en la temporada de secas causado por el estrés hídrico.

V. OBJETIVOS

General

- A) Determinar si la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Pseudoeurycea leprosa* en una población del parque Nacional “La Malinche” está determinada por la estacionalidad anual.

Específico

- a) Estimar la prevalencia de salamandras infectadas por el patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Pseudoeurycea leprosa*.
- b) Determinar si hay una relación entre la infección por *Bd* en *Pseudoeurycea leprosa* y factores físicos tales como: Temperatura ambiental, temperatura corporal, temperatura del sustrato y humedad.
- c) Determinar si hay una relación entre la prevalencia de la infección por *Bd* en *Pseudoeurycea leprosa* y el grado de desarrollo de los individuos.

VI. METODOLOGÍA

6.1. Muestreo

Se realizó el muestreo en el parque nacional la Malinche, Tlaxcala, cuya precipitación media anual es de 800 mm y la temperatura media anual es de 15°C. El clima es templado y húmedo la mayor parte del año, con una temporada seca y fría de octubre a marzo. La vegetación dominante es bosque de pino-encino. Los árboles dominantes son de las especies de *Pinus montezumae*, *Pinus pseudostrobus*, *Abies religiosa* (Pinaceae), *Quercus laurina* y *Quercus crassipes* (Fagaceae) (Díaz-Ojeda 1992) (Fig.2).

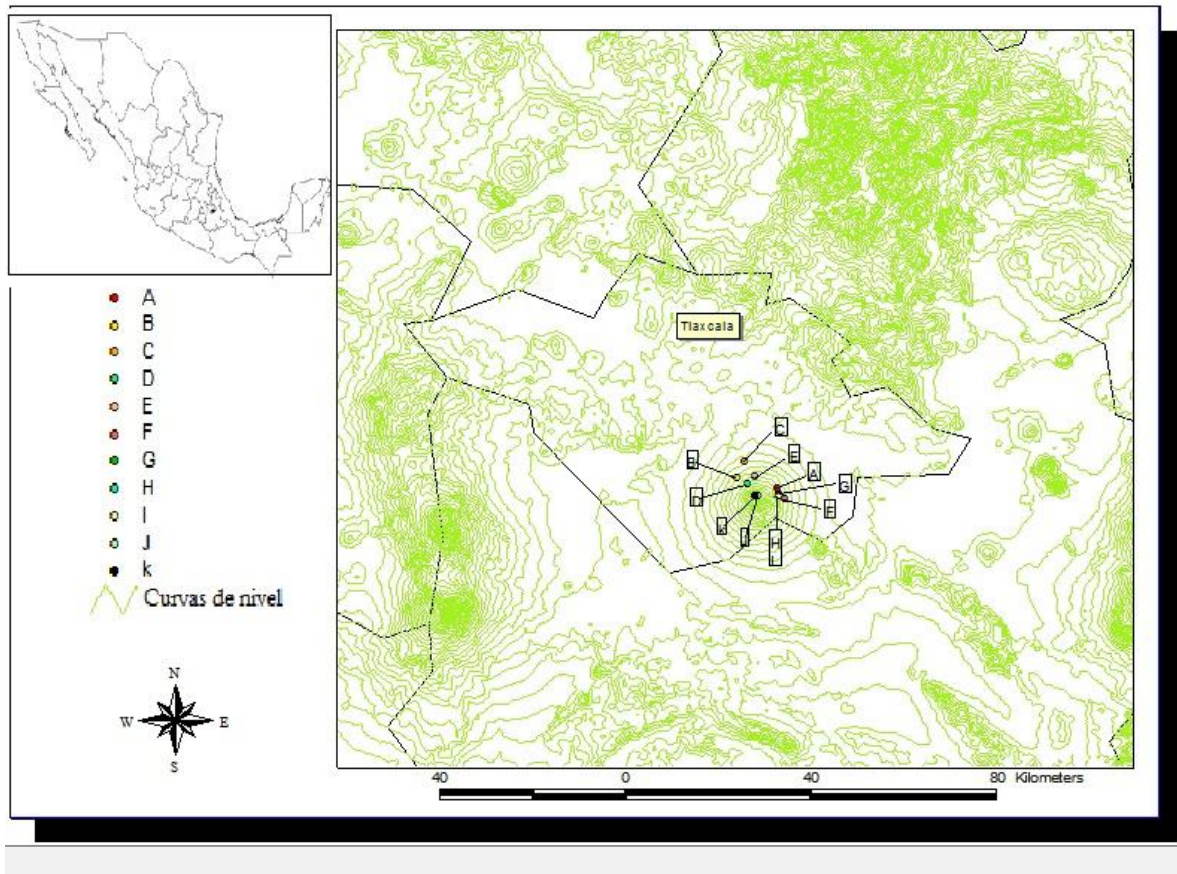


Fig.2. Área de estudio ubicada en el parque nacional “La Malinche” correspondiente al estado de Tlaxcala, con 11 puntos de colecta, cada punto es representado por una letra. Mapa elaborado en el sistema de información geográfica.

Se colectaron organismos de la especie *Pseudoeurycea leprosa* (Fig. 3) señalada como amenazada por la Nom-059-SEMARNAT-2010.



Fig.3. Organismo de la especie *Pseudoeurycea leprosa*, Parque Nacional “La Malinche”, Tlaxcala, Enero de 2012. Técnica digital. Archivo del autor.

El muestreo se llevó a cabo cada mes durante un año, en el periodo Octubre del 2011 y Septiembre del 2012. Cada visita consistió en una colecta de 5 horas (10:00 a las 15:00 hrs) durante 2 días. Se tomaron los siguientes datos ambientales asociados a cada organismo: temperatura corporal y del sustrato con un termómetro infrarrojo (FLUKE 62 mini, +- 1% sobre lectura), así como humedad y temperatura del micro-hábitat circundante con un medidor de viento (Kestrel 4000), longitud hocico-cloaca (LHC) mediante un Vernier. A las salamandras se les realizó un frotis (10 golpes en cada uno de los pies, los muslos, las manos y en la parte izquierda, centro, y derecha de la superficie ventral del cuerpo) (Van Rooij *et al.*, 2011) con un hisopo estéril (MW 100-100, Medical Wire and Equipment, Bath) (Hyatt *et al.*, 2007). Los hisopos se almacenaron en una hielera con bolsas de gel congeladas para su transportación hasta el laboratorio para que posteriormente se almacenaran a -10°C (Hyatt *et al.*, 2007). La manipulación de las salamandras se dio mediante un par de guantes de plástico (estériles para cada organismo) y fueron liberadas en el punto de captura.

6.2. Cultivo de *Bd*

Se realizaron dos tipos de medios de cultivo ambos sólidos. El primero con acción antibiótica "T+", (4g de tryptona, 1g de gelatina hidrolizada, 5g de agar bacteriológico, 100 mg de penicilina y 250 mg de estreptomycin, para 500 mL de cultivo solido), y el segundo sin acción antibiótica "T" (4g de tryptona, 1g de gelatina hidrolizada, 5g de agar bacteriológico para 500ml de cultivo solido); ambos se almacenaron en cajas de petri.

Se sacrificaron ranas de la especie *Hyla eximia* y se obtuvieron muestras de piel (apéndices posteriores, anteriores y parte interna de los muslos). Las muestras de tejido se cortaron al estereoscopio hasta obtener muestras de 1 mm. Se analizaron las muestras al microscopio y se marcaron mediante un plumón los portaobjetos en cuya muestra se habían detectado esporangios con zoosporas móviles.

Las muestras marcadas se limpiaron mediante el método de estrías en placas de cultivo "T+". Este método consiste en hacer pasar la muestra a través de todo el medio tanto lateral como perpendicularmente; una vez limpia la muestra se sembró el tejido en placas de cultivo "T+" a 23°C por 15 días en condiciones de obscuridad (Boyle *et al.*, 2004).

La interacción de *Bd* con el agente antibiótico del medio "T+" reduce el crecimiento de *Bd* pero protege al cultivo de que se contamine, por lo que las colonias de *Bd* obtenidas del sembrado de tejidos se traspasaron a placas de cultivo "T" a 23°C durante 15 días en condiciones de obscuridad, para acelerar su crecimiento (Boyle *et al.*, 2004).

6.3. Reacción Cuantitativa de la Cadena de Polimerasa (qPCR)

6.3.1. Preparación de los Estándares

Una vez obtenido el crecimiento de *Bd* en las cajas de Petri se cosecharon las zoosporas por inundación de agua potable esterilizada, se agregaron 4 mL de la misma en una placa con elevado crecimiento de *Bd*, hasta formar una solución homogénea (Solución madre). Posteriormente se realizó una solución 1:2 de solución madre y solución de betadina (10 mL de agua destilada y 10 mL de betadina) respectivamente, para provocar la muerte de las zoosporas. Se contaron las zoosporas con un hemocitómetro, se pipeteó suficiente solución de Zoosporas+betadina para rellenar ambas cámaras del hemocitómetro; se contaron las zoosporas en 5 de los cuadros grandes seleccionados al azar y se sacó la media de los conteos, esta media multiplicada por 25 es el número de zoosporas en 0,02 mm³, se multiplicó por 50 para obtener la cantidad de zoosporas en 1 mm³, por último se multiplicó por 1000 para determinar el número de zoosporas en 1 mL de nuestra solución madre (multiplicar por 2 debido al factor de dilución de la solución madre+betadina) (Burrowes *com. pers.* 2010).

Se diluyó la solución madre para obtener una concentración de 1×10^7 zoosporas por mL con agua bidestilada esterilizada “solución estándar”. La solución estándar se centrifugó a 13000 revoluciones por minuto (rpm) durante 2 minutos hasta formar un pellet, se retiró el agua del pellet y se agregaron 200 µL de Prepman Ultra para llevarlos a un proceso de agitado por 30 segundos mediante un Beadbeater, posteriormente se centrifugó a 7500 rpm durante 2 minutos, se llevó a agitado por 30 segundos en el Beadbeater, se llevó a baño María (100°C) durante 10 minutos, posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante 3 minutos y se aisló el sobrenadante obtenido (DNA de las zoosporas)(Burrowes *com. pers.* 2010).

Se realizaron los cálculos pertinentes para obtener soluciones de 1000, 100, 10, 1 y 0.1 DNA de zoosporas de *Bd* (Boyle *et al.*, 2004)

6.3.2 Extracción de ADN de las muestras desconocidas

A los hisopos obtenidos de los frotis se les agregó 200 µL de Prepman Ultra para llevarlos a un proceso de agitado por 30 segundos mediante un Beadbeater, posteriormente se centrifugó a 7500 rpm durante 2 minutos, se llevó a agitado por 30 segundos en el Beadbeater, se llevó a baño María (100°C) durante 10 minutos, posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante 3 minutos y se aisló el sobrenadante obtenido (DNA de las zoosporas) (Burrowes *com. pers.* 2010).

6.3.3 Cuantificación de *Bd*

Se analizaron las muestras en el laboratorio para detectar la presencia del *Bd* con el protocolo TaqMan PCR en tiempo real usando un equipo Step One Applied Biosystems, con un total de reacción de 25 µL, que contiene 20 µL de Master Mix (Applied Biosystems) (2,75 µL de agua bidestilada, 1 µL de BSA, 12.5 µL de taqman, 1.25 µL de primer ITS, 1.25 µL de primer 5.8s y 1.25 µL de sonda) y 5 µL de DNA (diluido 10^{-1} en agua bidestilada esterilizada). Se incluyó en cada una de las placas (48 pozos) una muestra por duplicado de estándares de 1000, 100, 10, 1 y 0.1

equivalentes al genoma de *Bd*, control positivo y un control negativo y 34 muestras únicas de frotis (Boyle *et al.*, 2004). Hyatt *et al.* (2007) detallan las propiedades de la prueba, incluyendo sensibilidad, especificidad, limitaciones, y las comparaciones con otros métodos.

Se utilizaron como condiciones de amplificación 2 minutos a 50 °C, 10 min a 95°C, posteriormente se llevó por 15 segundos a 95°C (Desnaturalización) y 1 minuto a 60°C (alineamiento y extensión) durante 50 ciclos (No se llega a la temperatura de extensión por que el amplicon es tan pequeño que se puede estar generando durante el alineamiento).

El software del Step One grafica el cambio en la señal de la fluorescencia (ΔRn) a través de la sonda que se pega en la secuencia complementaria durante las reacciones que se llevan a cabo en los ciclos durante el PCR contra el número de ciclos (Fig. 4). Cuando la señal de la fluorescencia de determinada muestra sobrepasa la línea de base (Threshold, de 6 a 15 ciclos) se le asigna el valor correspondiente de Ct. El número Ct se define como el número de ciclo en la que el ΔRn cruza este umbral.

El valor de CT es directamente proporcional a la cantidad inicial del templado y es el fundamento para calcular la cantidad de ADN. Mientras mayor sea la cantidad de ADN en una muestra, menor número de ciclos requerirá para alcanzar el umbral de detección.

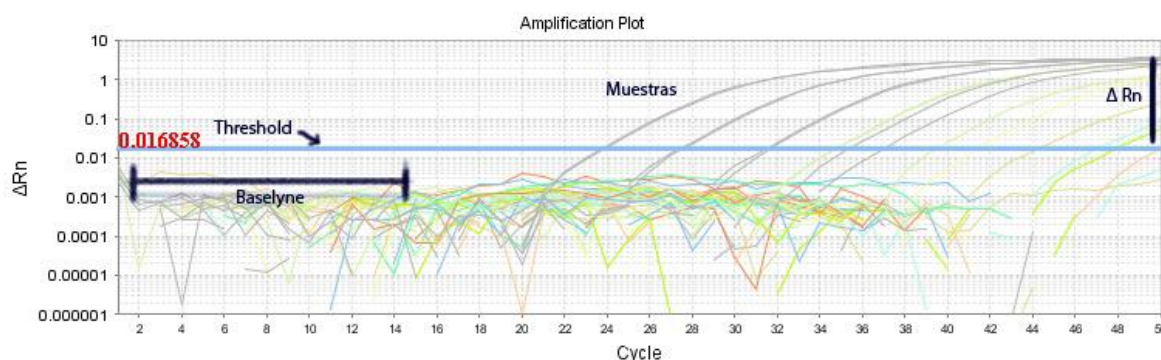


Fig.4. Características de una gráfica de amplificación en tiempo real. Técnica digital. Archivo del autor.

Posterior a esto el software construye una curva estándar a partir del Ct de las muestras estándar que contienen 1000, 100, 10, 1 y 0.1 zoosporas equivalentes; para poder determinar la concentración de ADN equivalentes de las zoosporas de las muestras desconocidas (Fig. 5) (Boyle *et al.* 2004).

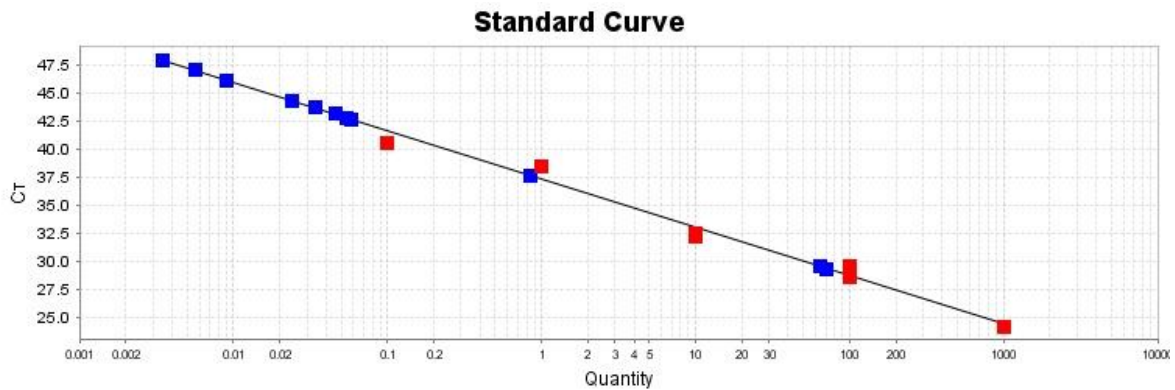


Fig.5. Características de una curva estándar, se grafica el valor de CT contra la concentración de ADN; en rojo se muestran los estándares y en azul las muestras desconocidas. Técnica digital. Archivo del autor.

6.4 Análisis estadísticos

Se realizó una base de datos donde se incluye el número de muestra, la temperatura corporal, la temperatura del sustrato, la humedad relativa, la temperatura ambiental y el grado de infección (equivalente zoosporas). Este grado se obtiene de acuerdo con la concentración parcial multiplicada por el factor de dilución (1:80), todos estos agrupados de acuerdo con la estación correspondiente, Primavera: 21 de marzo al 20 de Junio (Anexo 1), Verano: 21 de Junio al 20 de Septiembre (Anexo 2), Otoño: 21 de Septiembre al 20 de Diciembre (Anexo 3) y el Invierno: 21 de Diciembre al 20 de Marzo (Anexo 4).

Los datos de concentración total fueron sometidos a una prueba de Anderson-Darling para determinar la distribución de los datos (normalidad); para mostrar el acomodo de los datos gráficamente se realizó un histograma en el paquete estadístico SPSS.

A) Estacionalidad de la infección por *Bd* en *Pseudoeurycea leprosa*

Se procedió a realizar una prueba de Kruskal-Wallis para poder determinar si existe una diferencia significativa entre las medianas de la concentración del patógeno a lo largo de las estaciones (Cuadro 1).

a) Prevalencia de salamandras infectadas por el patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Se realizó una base de datos donde se muestran el número de organismos infectados, el total de organismos colectados por estación y la prevalencia (%) asociada a cada estación (Cuadro 2). Se realizó una gráfica de la prevalencia de la quitridiomycosis en los organismos (Fig. 8). La prevalencia (P) es definida como la proporción de individuos que padecen una enfermedad en un período determinado de tiempo. Se estimó mediante la expresión: $P = \text{Nº de individuos que presentan Bd} / \text{Nº total de especímenes muestreados por estación}$. El valor de la prevalencia se expresó como porcentaje y se realizó para cada estación climática (primavera, verano, otoño e invierno). Se obtuvieron los intervalos de confianza de la prevalencia del 95% (Cuadro 3).

b) Relación entre el grado de infección por *Bd* en *Pseudoeurycea leprosa* y factores físicos tales como: Temperatura ambiental, temperatura corporal, temperatura del sustrato y humedad.

Se hizo el análisis de Rho de Spearman en el paquete estadístico SPSS para determinar el nivel de asociación entre la concentración y los factores físicos: temperatura ambiental, temperatura corporal, temperatura del sustrato y humedad, exceptuando las muestras AI137 y AI138 puesto que no se tienen los datos completos. Aunque no existe diferencia significativa a lo largo de las estaciones climáticas, el someter a prueba el grado la relación existente entre la concentración y los factores físicos revelará si en específico alguna de las variables condiciona la concentración.

c) Relación entre la prevalencia de la infección por *Bd* en *Pseudoeurycea leprosa* y categorías de edades.

Se realizó una base de datos en donde se agruparon los individuos de acuerdo con la estructura de edades siguiendo el criterio de Lynch (1977; citado en Eliosa, 1990), en el que se considera a los individuos con una LHC menor a 30 mm como crías, de 30-40 mm como juveniles, mayores a 40 como adultos e individuos totales junto con el número de individuos *Bd*/Positivos y *Bd*/Negativos (Cuadro 5) exceptuando las muestras AI159 y AI266 puesto que no se tienen los datos de LHC. A estos datos se les realizó una prueba de Ji-cuadrada con el fin de determinar la relación existente (en caso que la hubiera) en el programa SPSS 21.

VII. RESULTADOS

7.1. Muestreo

Con un esfuerzo de colecta de 180 hrs/hombre se colectaron 312 individuos de la especie *Pseudoeurycea leprosa* (Cope, 1869) durante el periodo de octubre del 2011 y septiembre del 2012, de los cuales se colectaron 79 en primavera, 66 en verano, 39 en otoño y 128 en invierno.

En total se colectó en 11 puntos a los que se les asignó una letra del abecedario (A-K), a un mínimo de altitud de 3055m y un máximo de 3298m (Fig. 2).

7.2. Cuantificación

Se realizaron 10 primeras corridas de qPCR en el termociclador Step One para poder tener la cuantificación parcial de la concentración de *Bd*. 18 *Bd*/positivos cuya concentración fue menor a una zoospora fueron sometidos a una repetición por triplicado para evitar que fueran falsos positivos, las muestras que siguieron saliendo *Bd*/positivas se tomaron como positivas y fueron añadidas a la base de datos. En total se obtuvieron un total de 54 salamandras positivas y 258 negativas. La concentración varió de los 0 a los 7894 equivalentes genómicos (e.g.) de zoosporas, el nivel de infección es de 38.29. Por último la infección no detectable (0 e.g.) fue el valor más repetido en la muestra.

7.3. Análisis Estadísticos

El test de Anderson-Darling ($P < 0.05$) realizado en el paquete estadístico Minitab 15 arrojó que los datos no están alineados conforme a la recta a su vez el P-valor fue < 0.005 está por debajo de 0.05, lo que indica que los datos no se distribuyen de forma normal (Fig. 6).

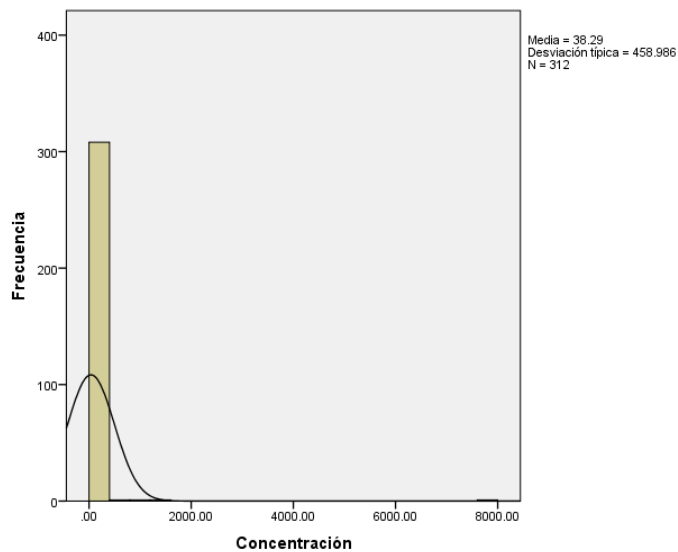


Figura 6. Histograma que muestra que los datos se distribuyen de una forma no paramétrica, con el mayor número de datos en quitridio/negativos, se muestra la curva de normalidad, la media, la desviación y el número de datos

A) Estacionalidad de la infección por *Bd* en *Pseudoeurycea leprosa*

El análisis de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$) realizado en el paquete estadístico SPSS, que compara la mediana de los grupos estacionales, mostró una significancia de 0.166. Puesto que el nivel crítico (0.166) es mayor que 0.05, no se rechaza la hipótesis nula y se puede afirmar que existe suficiente evidencia para aceptar la aseveración de que la concentración de *Bd* en las cuatro estaciones tienen medianas iguales (Fig 7; cuadro 1).

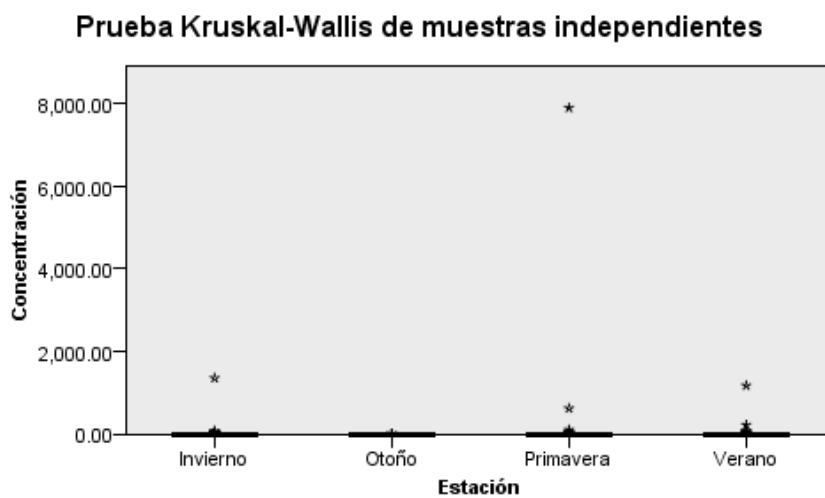


Figura 7. Estaciones climáticas y los rangos de concentración asociados a cada uno, se muestra que la mayoría de los datos son quitridio/negativos salvo casos extremos marcados en forma de asteriscos.

Cuadro 1. Análisis de Kruskal-Wallis, se muestran la N de la población, el estadístico de probabilidad (H calculada), los grados de libertad y la significancia.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	
N total	312
Estadístico de probabilidad	5.085
Grados de libertad	3
Sig. Asintótica (prueba de dos caras)	0.166

a) Prevalencia de salamandras infectadas por el patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis*.

La prevalencia fue obtenida en porcentaje de acuerdo con cada estación climática (Cuadro 2).

Cuadro 2. Representación de la frecuencia de la infección expresada a través de la prevalencia de la quitridiomycosis para cada estación climática.

	Bd/positivos	Total de muestra	Prevalencia (%)
Primavera	12	79	15.18
Verano	12	66	18.18
Otoño	3	39	7.69
Invierno	27	128	21.09

Se obtuvieron los intervalos de confianza del 0.05 de acuerdo con la fórmula de las proporciones para cada estación:

$$p_n - 1.96 * \sqrt{(p_n * (1 - \mu) / n)} \leq p_n \leq p_n + 1.96 * \sqrt{(p_n * (1 - \mu) / n)}$$

Se obtuvieron los datos para estimar el porcentaje de quitrido positivos en una estación dada (Cuadro 3. Fig. 8) con lo que se obtuvo los valores en porcentaje.

Cuadro 3. Prevalencia (promedio muestral) e intervalos de confianza con una significancia del 0,05 expresados en porcentaje para cada estación climática.

	Intervalo superior	Intervalo inferior	Promedio muestral
Primavera	27.52	10.27	18.98
Verano	31.05	11.35	21.21
Otoño	29.91	5.89	17.94
Invierno	34.14	18.85	26.56

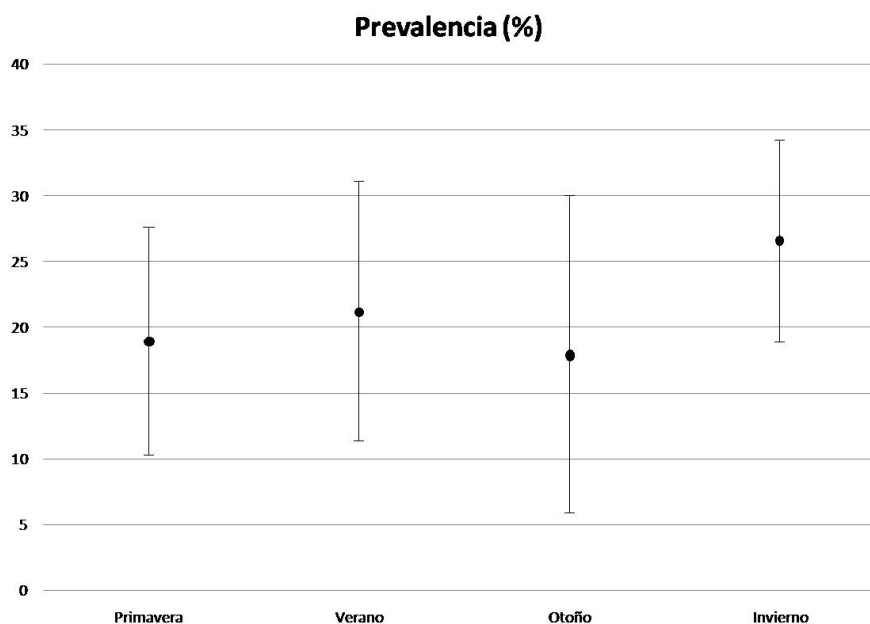


Figura 8. Prevalencia de la infección por *Bd*, e intervalos de confianza ($p: 0.05$) mostrados en porcentaje para cada estación climática.

- b) Relación entre el grado de infección por *Bd* en *Pseudoeurycea leprosa* y factores físicos tales como: Temperatura ambiental, temperatura corporal, temperatura del sustrato y humedad.

El análisis Rho de Spearman mostró una relación positiva baja entre la concentración y la T corporal (0.098), T sustrato (0.139), humedad (0.099) y una relación negativa baja con respecto a la T ambiental (-0.008) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de Rho de Spearman, se muestran tres valores para cada cruce de variables: 1) el valor de coeficiente de correlación (negritas); 2) el nivel crítico asociado a cada coeficiente (sig.); y 3) el número de casos sobre el que se ha calculado cada coeficiente.

Rho de Spearman					
Variable		Cuantificación	Variable		Cuantificación
Tcorp	Coeficiente de correlación	.098	Tamb	Coeficiente de correlación	-.008
	Sig. (bilateral)	.481		Sig. (bilateral)	.953
	N	310		N	310
Tsustr	Coeficiente de correlación	.139	Cuantificación	Coeficiente de correlación	1.000
	Sig. (bilateral)	.317		Sig. (bilateral)	
	N	310		N	310
Humedad	Coeficiente de correlación	.099			
	Sig. (bilateral)	.478			
	N	310			

- c) Relación entre la prevalencia de la infección por *Bd* en *Pseudoeurycea leprosa* y categorías de edades.

Para saber si hay una edad que sea más afectada por el *Bd* se llevó a cabo una prueba de Ji-Cuadrada modelado en un el programa SPSS 21 usando como base la tabla de estructura de edades y *Bd* positivos/negativos (tabla de contingencia) (Cuadro 5).

Cuadro 5. *Bd* positivos y *Bd* negativos para cada estructura de edad, LHC (mm) < 30 crías, de 30-40 juveniles y > 40 adultos; así como los totales de cada grupo.

Tabla de contingencia del Estado de desarrollo* Infección					
			Infección		Total
			<i>Bd</i> /Positivos	<i>Bd</i> /negativos	
Estado de Desarrollo	Cría	Recuento	15	90	105
		Frecuencia esperada	18.0	87.0	105.0
	Juvenil	Recuento	22	80	102
		Frecuencia esperada	17.4	84.6	102.0
	Adulto	Recuento	16	87	103
		Frecuencia esperada	17.6	85.4	103.0
Total	Recuento		53	257	310
	Frecuencia esperada		53.0	257.0	310.0

Cuadro 6. Análisis de Ji-cuadrada, muestra la significancia, los grados de libertad y el número de casos que se tomaron para el estudio.

Prueba de chi-cuadrado			
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2.202 ^a	2	.333
N de casos válidos	310		

La significancia de Ji-cuadrada fue de 0.333 con 2gl y un 95% de confianza, como este valor de Ji-cuadrada es mayor que la significancia de 0.05 se puede afirmar que no existe dependencia entre las estructuras de edades y la concentración del *Bd* (Cuadro 6).

VIII. DISCUSIÓN

México, con alrededor de 375 especies de anfibios se encuentra entre los cinco países con mayor diversidad (Young *et al.*, 2004; Flores-Villela y Canseco-Márquez, 2004). Alrededor del 65% de las especies mexicanas de anfibios son endémicas (IUCN 2007) y al igual que otros países, debido a la pérdida de hábitat diversas poblaciones de anfibios han disminuido o desaparecido (Parra-Olea *et al.*, 1999). Sin embargo, también en lugares bien conservados se ha dado un declive en las poblaciones como por ejemplo en el Cerro San Felipe, Oaxaca (Parra-Olea *et al.*, 1999). Aunque estas disminuciones muchas veces se reportan considerando especies de anuros, también las poblaciones de salamandras se han reducido considerablemente en los últimos 20 o 25 años (Parra-Olea *et al.*, 1999; Rovito *et al.*, 2009).

Los resultados encontrados demuestran que la infección por *Bd* está presente de manera permanente en la especie *Pseudoeurycea leprosa* en la población del Parque Nacional “La Malinche”. Estos datos contribuyen al conocimiento de la infección en México como ha sido presentado previamente por Frias-Alvarez *et al.* (2008) a lo largo de 12 estados, del norte de Baja California al sur de Oaxaca y Tabasco, por Cheng *et al.* (2011) a través del estudio de organismos colectados pertenecientes al Sureste mexicano y por el estudio de Rovito *et al.* (2009) en Chiapas, Oaxaca y Veracruz.

A) Estacionalidad de la infección por *Bd* en *Pseudoeurycea leprosa*

En este trabajo se cuantificó la concentración de *Bd*, los datos obtenidos muestran que *Bd* sí se encuentra en la población estudiada, datos previos muestran que *Bd* ha estado presente en las salamandras Plethodontidas de México desde los años 70 y 80 (Cheng *et al.*, 2011) y corresponde con el declive poblacional tan marcado que han sufrido los anfibios (Rovito *et al.*, 2009).

La concentración de *Bd* no se distribuye de manera normal según el test de Anderson-Darling, en cambio la mayoría de los datos están cargados en cierto punto de la distribución en este caso hacía el extremo de concentración negativa del quitridio (Fig. 6) y que la media y la mediana no son iguales, esto es debido a la gran variedad de valores que la concentración toma, que van desde 0-7894 zoosporas. Otros autores que reportan una gran variedad de valores son Bell *et al.* (2011) (0-635.3 zoosporas), Hunter *et al.* (2009) (0-104797 zoosporas) y Kriger y Hero (2007) (0-235287). El intervalo de concentración es mayor en estos reportes que en el presente. Esto muy probablemente se debe a que estos estudios fueron realizados en poblaciones de anuros, los cuales son mas susceptibles que las salamandras, debido a que estas últimas tienen defensas en su piel que les permiten mantener en niveles bajos a la infección por *Bd* (Fredricks y Dankert, 2000; Davidson *et al.*, 2003).

Las condiciones prevalentes en el sitio de muestreo coinciden con las condiciones que *Bd* prefiere, las cuales son temperaturas bajas, altas elevaciones y condiciones húmedas (Berger *et al.*, 2004). Aún así la concentración permaneció sin cambio significativo a lo largo de las estaciones de acuerdo con el análisis de Kruskal-Wallis (Fig. 7). Esto sugiere que las salamandras tienen

mecanismos para mantener a la infección en un nivel que tiende a 0 e.g., ya que el grado de infección bajo (en este caso) proporciona información a la respuesta que se tiene sobre la enfermedad (Longo *et al.*, 2009). El que los datos hayan salido la mayoría de ellos negativos no es extraño, un estudio realizado a salamandras plethodontidas arrojó que ninguna de las 921 muestras salieron positivas (Pasmans *et al.*, 2013) lo que parece indicar una respuesta fisiológica a la infección.

Aunque no hay estudios específicos para *Pseudoeurycea leprosa* hay otros estudios en salamandras que enuncian principalmente a tres factores que se han asociado con la liberación y la recuperación a la infección, estos son, el desprendimiento de piel (Davidson *et al.*, 2003), bacterias cutáneas (Harris *et al.*, 2006; Rollin-Smith *et al.*, 2011) y la liberación de péptidos antimicrobianos (Rollin-Smith *et al.*, 2002; Woodhams *et al.*, 2007). Es factible asumir que la baja concentración de la infección presente en el muestreo puede deberse a que algunas otras especies de salamandras, tienen la capacidad de desprender frecuentemente piel, con lo que la infección puede ser negativa en el organismo pero no así en la piel desprendida (Davidson *et al.*, 2003). Aunado a esto se ha demostrado que algunas especies de esta familia producen péptidos antimicrobiales (Longcore *et al.*, 1999; Berger *et al.*, 2005b) que son eficaces para matar zoosporas de *Bd* (Pasmans *et al.*, 2013). Por último las bacterias pueden producir metabolitos anti fúngicos (Rollin-Smith *et al.*, 2011) que previenen la invasión de microorganismos (Fredricks y Dankert, 2000; Pasmans *et al.*, 2013). Los niveles de infección consistentemente bajos observados sugieren que la población estudiada tiene alguno o varios de los factores mencionados, por lo que mantienen en niveles negativos a la quitridiomycosis. Sin embargo no se pueden descartar otros factores que reduzcan los niveles detectables de infección por lo que estos resultados requieren una mayor investigación para identificar posibles mecanismos causales.

a) Prevalencia de salamandras infectadas por el patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Aunque las condiciones ambientales pueden favorecer que en la estación seca los organismos se refugien entre la madera y la corteza de tocones (García-Vázquez *et al.*, 2006), lo que genera una mayor predisposición a los contagios, la prevalencia se mantiene de una forma uniforme a lo largo del año con un valor de 7.69 % (Otoño) y hasta 21.09 % (Invierno). Generalmente se reporta una prevalencia alta cuando se asocia una relación con la estacionalidad climática, tal es el caso con lo reportado en *Litoria wilcoxi* que alcanzó hasta 58.3% en inicios de primavera (Kriger y Hero, 2007), 53% durante el invierno (Department of the Environment and Heritage, 2006) y 32.1 % en primavera en ranas de la especie *Lithobates pipiens* (Voordouw *et al.*, 2010). A su vez los periodos de prevalencia alta coinciden con la reducción de la supervivencia de fondo (Murray *et al.*, 2009).

Los datos registrados también contrastan con reportes de prevalencias bajas como de 0.93% en 452 ranas y 304 salamandras de Estados Unidos (Hossack *et al.*, 2010), 0% en salamandras

del genero *Speleomates* (Pasmans *et al.*, 2013) y de diversos estudios en Australia (Department of the Environment and Heritage, 2006). Los porcentajes bajos de prevalencia están asociados a la alta susceptibilidad a la infección de una especie, debido a que los organismos morirán rápidamente (Department of the Environment and Heritage, 2006), por lo que la baja prevalencia no es indicativa de menor riesgo para las poblaciones (Longo *et al.*, 2009).

La prevalencia de la población examinada en este estudio es alta de acuerdo con lo obtenido por Bell *et al.* (2011), quienes encontraron un intervalo de prevalencia de 19.6-36.0% y es similar a otros datos que muestran prevalencias de 22.0% (Goldberg *et al.*, 2007), 24.1% (Kriger y Hero, 2007) y 13.1% (Voordouw *et al.*, 2010). Esto sugiere que esta población de salamandras desarrolló resistencia ante *Bd* y actualmente coexiste con la enfermedad. Datos similares son reportados por Retallick *et al.* (2004) así como Voordouw *et al.* (2010), quienes también mencionan que las poblaciones de sus estudios tuvieron un decremento hasta que posteriormente se estabilizaran. Esto es consistente con la reducción de las poblaciones de salamandras que ya han sido documentadas (Parra-Olea *et al.*, 1999; Rovito *et al.*, 2009) y que sin embargo las especies no fueron extirpadas por completo.

Aunque con sus reservas, se puede afirmar que la población estudiada no está fuera de peligro, ya que se puede esperar que el calentamiento global reduzca los niveles de *Bd* en especies de bajas altitudes pero que genere un óptimo de temperatura a elevadas altitudes, como es el caso de la especie involucrada en este estudio *Pseudoeurycea leprosa* (Piotrowski *et al.*, 2004). Aunado a esto un periodo largo de coexistencia entre *Bd*-hospedero no garantiza un número estable de individuos en la población, ya que se ha demostrado reducciones tras un periodo de convivencia de hasta 30 años (Murray *et al.*, 2009). Un punto a favor de la supervivencia de *Bd* es que en un estudio realizado por Lips *et al.* (2008) no se encontraron pruebas que apoyen que el calentamiento global este generando brotes de quitridiomycosis. En suma se cuenta que *Pseudoeurycea leprosa* se distribuye en 31 áreas dentro de zonas naturales protegidas.

b) Relación entre el grado de infección por *Bd* en *Pseudoeurycea leprosa* y factores físicos tales como: temperatura ambiental, temperatura corporal, temperatura del sustrato y humedad.

Aunque la infección permaneció sin cambio a lo largo de todo el año, se sabe que en el sitio de muestreo las condiciones de temperatura ambiental y del sustrato así como la humedad no permanecen estables a lo largo del año (García-Vázquez *et al.*, 2006), por lo tanto es de suma importancia establecer si algún factor físico condiciona de alguna forma la infección en los organismos. En este aspecto este estudio es novedoso ya que no se tiene conocimiento de que algún trabajo divida al clima en factores ambientales, e intente relacionar a alguno de ellos con la infección por *Bd*, ya que la mayoría solo la relacionan con el clima en su totalidad (Retallick *et al.*, 2004; Woodhams *et al.*, 2005; Fisher *et al.*, 2009; Rovito *et al.*, 2009).

De acuerdo con el análisis de Rho de Spearman ninguna de las variables físicas se ve fuertemente relacionada con la concentración, por lo que se puede afirmar que no existe relación,

en cuanto la temperatura ambiental (Cuadro 2), la nula relación contrasta con un estudio realizado a una especie de rana *Mixophyes fasciolatus*, en el cual se encontró que las temperaturas menores a 24°C están relacionados en la muerte de los organismos y el grado de infección (en condiciones de cautiverio) (Berger *et al.*, 2004), en conjunto a esto, un estudio realizado en *Atelopus zeteki* demostró que las ranas sobreviven mas a 23°C que a 17°C (Bustamante *et al.*, 2010).

La relación que tiene la infección con la humedad (cuadro 2), contrasta con los resultados obtenidos por Bustamante *et al.* (2010) que encontraron que en condiciones de humedad las ranas de la especie *Atelopus zeteki* sobrevivieron menos que las expuestas a condiciones de sequedad. Se sabe en general que el periodo de temperaturas bajas y secas genera una mayor intensidad de la infección (Retallick *et al.*, 2004; Woodhams *et al.*, 2005; Fisher *et al.*, 2009; Rovito *et al.*, 2009), a su vez rompe con la hipótesis que la estación seca producirá un estrés fisiológico ya que estas dependerían del agua para sus actividades (Rovito *et al.*, 2009).

La temperatura corporal se ve moldeada por la del sustrato (Fig. 8), esto debido a que *P. leprosa* se comporta de una forma criptica en sus ambientes, es decir permanece enterrada en cavidades, debajo de hojarasca y en tocones podridos (observaciones del autor) (Fig. 8). Ambas temperaturas no tienen relación con respecto a la concentración (0.098 y 0.139 respectivamente), debido a que en estos factores no se tiene conocimiento de algún trabajo que los relacione, no se puede profundizar más, sin embargo, muy probablemente el comportamiento y el contraste tendría que ser muy similar al de la temperatura ambiental.

c) Relación entre la prevalencia de la infección por *Bd* en *Pseudoeurycea leprosa* y categorías de edades.

De acuerdo con el análisis de Ji-Cuadrada ninguna de las categorías de edades se ve mayormente comprometida por la quitridiomycosis, aunque las categorías de edades en sí presentan una temporalidad establecida, con un mayor número de crías de noviembre a marzo, juveniles de abril a julio y los adultos en agosto (García-Vázquez *et al.*, 2006) debido a que la infección está distribuida de forma indistinta a lo largo del año no compromete a ningún grupo en particular, que coincide con lo encontrado por Kriger y Hero (2007) que reportan que no existe diferencia entre la LHC y la quitridiomycosis en la especie *Litoria wilcoxi* (únicamente adultos).

Otro factor puede ser que *Pseudoeurycea leprosa* es terrestre y presenta un desarrollo directo por lo que en ninguna de sus etapas está expuesta a cuerpos de agua, tales como ríos o lagos, en los que se sabe *Bd* puede ser transmisible (Longcore *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2003; Ron, 2005). Estudios en anuros han demostrado que las larvas de estos son más afectados por la infección (Voordouw *et al.*, 2010) muy probablemente debido a la exposición a las zoosporas existentes en el agua. También, en un estudio llevado por Longo y Burrowes (2010) se demostró que la infección afecta más a juveniles que adultos de dos especies de anuros, si a esto se aúna que las especies como *Pseudoeurycea leprosa* que cuidan a sus huevos hasta que eclosionan pueden transmitir de forma vertical algunas bacterias benéficas (Harris *et al.*, 2006) se tiene que en general este organismo no se ve tan afectado en ninguna estructura de edad.

IX- FUTURAS INVESTIGACIONES

Los resultados de este estudio ayudarán a biólogos conservacionistas involucrados en los programas de cría en cautiverio y la investigación sobre la dinámica de la enfermedad en los sistemas naturales.

Aunque nuestros resultados son la evidencia preliminar que la población muestreada de *Pseudoeurycea leprosa* es una población de bajo riesgo de deterioro debido a la quitridiomycosis, se recomienda más estudios adicionales con el fin de investigar el riesgo que *Bd* puede plantear en toda la distribución de la especie.

Las siguientes líneas de investigación que surgen a partir de este estudio se recomiendan como un medio para aumentar nuestra comprensión del impacto que tiene el *Bd* con esta especie y otras salamandras de la misma familia con el fin de poder generalizar la situación actual de la misma, con el propósito de generar líneas de conservación a largo plazo:

- Realizar un estudio similar con otras especies de salamandras en regiones montañosas de todo el país, con el fin de relacionar entre los resultados, para poder determinar si la situación es generalizada o específica para las especies.
- Llevar a cabo un muestreo y estudio adicional en el mismo parque pero ubicando los puntos de colecta en el estado de Puebla para realizar un informe general del estado de la infección en el parque nacional “La Malinche”
- Evaluar en condiciones de laboratorios la infección por distintas concentraciones de *Bd* y a distintas temperaturas con el objetivo de trazar medidas de conservación en torno a la problemática de calentamiento global
- Determinar los péptidos antimicrobiales y las bacterias benéficas que actúan en contra de la quitridiomycosis presentes en la piel de *Pseudoeurycea leprosa*.

X. CONCLUSIONES

A) La infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* se distribuyó de manera indistinta a lo largo del año.

a) La prevalencia de la infección oscilo entre 7.69% y 21.09%.

b) La infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Pseudoeurycea leprosa* no estuvo relacionada con ningún factor físico.

c) Ninguna de las etapas de vida de *Pseudoeurycea leprosa* se vio mayormente afectada por la quitridiomycosis.

- Bai, C., T. W. Garner y Y. Li. (2010). First Evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in China: Discovery of Chytridiomycosis in Introduced American Bullfrogs and Native Amphibians in the Yunnan Province, China. *EcoHealth*. 7: 127–134.
- Bartnicki-Garcia, S., V. O. Sing. (1987). Adhesion of zoospores of *Phytophthora* to solid surfaces. Zoospore fungi in teaching and research. 6: 279-283.
- Bell, R. C., A. V. G. Garcia, B. L. Stuart y K. R. Zamudio. (2011). High Prevalence of the Amphibian Chytrid Pathogen in Gabon *EcoHealth* 8: 116–120.
- Berger, L., R. Speare, P. Daszak, D. E. Green, A. A. Cunningham, C. L. Goggin, R. Slocombe, M. A. Ragan, A.D. Hyatt, K. R. McDonald, H.B. Hines, K. R. Lips, G. Marantelli y H. Parkes.(1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America.*Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 9031-9036.
- Berger, L., R. Speare, y A. D. Hyatt. (1999). A Chytrid fungi and amphibian declines: Overview, implications and future directions. In: Campbell A, editor. *Declines and disappearances of Australian frogs*. Canberra, Australia: Biodiversity Group Environment Australia. 1999: 23–33.
- Berger, L., R. Speare, H. B. Hines, G. Marantelli, A. D. Hyatt, K. R. McDonald, L. F. Skerratt, V. Olsen, J. M. Clarke, G. Gillespie, M. Mahony, N. Sheppard, C. Williams y M. J. Tyler. (2004). Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Australian Veterinary Journal*. (82) 7: 434-439.
- Berger, L., A. D. Hyatt, R. Speare y J. E. Longcore. (2005a). Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of aquatic organisms*. 68: 51-63.
- Berger, L., R. Speare, L. F. Skerratt. (2005b). Distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and pathology in the skin of green tree frogs *Litoria caerulea* with severe chytridiomycosis. *Diseases of aquatic organisms*. 68:65-70p.
- Bishop, P. (2000). Chytrid fungi identified from dying frogs in New Zealand. *Froglog*. 39:1-2.
- Blaustein, A. R., D. B. Wake y W. P. Sousa. (1994). Amphibian declines: Judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conserv. Biol.* 8: 60-71.
- Bosch, J., I. Martínez-Solano y M. G. París. (2000). Evidence of a Chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad in protected areas of central Spain. *Froglog* 40:1.
- Bosch, J. (2003). Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. *Munibe, Suplemento*. 16: 56-73.

- Boyle, D. G., D. B. Boyle, V. Olsen, J. A. T. Morgan, y A. D. Hyatt. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms* 60: 141–148.
- Brigs, C. J., V. T. Vredenburg, R. A. Knapp y L. J. Rachowicz. (2005). Investigating the population-level effects of chytridiomycosis: an emerging infectious disease of amphibians. *Ecology*, 86 (12): 3149–3159.
- Burrowes, P. A., R. L. Joglar y D. E. Green. (2004). Potential causes for amphibian declines in Puerto Rico. *Herpetologica* 60:141-154.
- Bustamante, H. M., L. J. Livo y C. Carey. (2010). Effects of temperature and hydric environment on survival of the Panamanian Golden Frog infected with a pathogenic chytrid fungus. *Integrative Zoology*. 5: 143-153.
- Carey, C., N. Cohen y L. A. Rollins-Smith. (1999). Amphibian declines: an immunological perspective. *Developmental and Comparative Immunology*. 23: 459-472.
- Cheng, T. L., S. M. Rovito, D. B. Wake y V. T. Vredenburg. (2011). Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (108) 23: 9502-9507.
- Cope, E. D. (1869). A review of the species of Plethodontidae and Desmognathidae. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 21: 93-118.
- Crump, M. L., F. R. Hensley y K. L. Clark. (1992). Apparent declines of the Golden toad: underground or extinct?. *Copeia*. 1992: 413-420.
- Daszak, P., L. Berger, A. A. Cunningham, A. D. Hyatt, D. E. Green y R. Speare. (1999). Emerging infectious diseases y amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases*. 5: 735-748.
- Davidson, C., H. B. Shaffer y M. R. Jennings. (2001). Declines of the California red-legged frog: climate, UV-B, habitat and pesticides hypotheses. *Ecol. Appl.* 11: 464–479.
- Davidson, E. W., M. Parris, J. P. Collins, J. E. Longcore, A. P. Pessier, y J. Brunner. (2003). Pathogenicity and Transmission of Chytridiomycosis in Tiger Salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Copeia*, 3: 601–607
- Department of the environment and Heritage. (2006). Threat abatement plan for Infection of amphibians with chytrid fungus resulting in chytridiomycosis. Australian Government.
- Díaz-Ojeda, E.V. (1992). Informe del Parque Nacional La Malinche. Jefatura del Programa Forestal de Tlaxcala. Gobierno del Estado. Tlaxcala, Tlaxcala.

- Eliosa, L. H. (1990). Distribución de tres salamandras terrestres (Amphibia:Plethodontidae), en el Parque Nacional Zoquiapan. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Fisher, M. C., T. W. Garner y S. F. Walker. (2009). Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time, and Host. *Annu. Rev. Microbiol.* 63:291–310
- Flores-Villela, O. y L. Canseco-Marquez. (2004). Nuevas especies y cambios taxonómicos para la herpetofauna de México. *Acta Zoologica Mexicana.* 20(2):115-144.
- Fredricks, L. P., y J. R. Dankert. (2000). Antibacterial and hemolytic activity of the skin of the terrestrial salamander, *Plethodon cinereus*. *J. Exp. Zool.* 287: 340–345.
- Frías-Alvarez, P., V. T. Vredenburg, F. Familiar-López, J. Longcore, E. González-Bernal, G. Santos-Barrera, L. Zambrano y G. Parra-Olea. (2008). Chytridiomycosis Survey in Wild and Captive Mexican Amphibians. *EcoHealth.* 5: 18–26.
- García-Vázquez, U. O., M. G. Gutiérrez-Mayén, C. A. Hernández-Jiménez y V. Auriol-López. (2006). Estudio de la densidad poblacional y algunos aspectos ecológicos de pseudoeurycea leprosa en el parque nacional la Malinche, Tlaxcala, México. *Bol. Soc. Herpetol. Mex.* 14 (1): 10-17.
- Gleason, F.H., P. M. Letcher y P. A. McGee. (2008). Freeze tolerance of soil chytrids from temperate climates in Australia. *Mycol. Res.* 112: 976–982.
- Goka, K., J. Yokoyama, Y. Une, T. Kuroki, K. Suzuki, M. Nakahara, A. Kobayashi, S. Inaba, T. Mizutani y A. D. Hyatt. (2009). Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology* 18: 4757–4774.
- Goldberg, T. L., A. M. Readle y M. H. Lee. (2007). Chytrid Fungus in Frogs from an Equatorial African Montane Forest in Western Uganda. *Journal of Wildlife Diseases*, 43(3): 521–524.
- Hale, S. F., P. C. Rosen, J. L. Jarchow y G. A. Bradley. (2005). Effects of the Chytrid Fungus on the Tarahumara Frog (*Rana tarahumarae*) in Arizona and Sonora Connecting Mountain Islands and Desert Seas: Biodiversity and Management of the Madrean Archipelago II. *USDA Forest Service Proceedings.* 407-411.
- Harris, R. N., T. Y. James, A. Lauer, M. A. Simon y A. Patel. (2006). Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* Is Inhibited by the Cutaneous Bacteria of Amphibian Species. *EcoHealth.* 3: 53–56.
- Hopkins, S. y A. Channing. (2002). Chytridiomycosis in Northern and Western Cape frog populations, South Afr. *Froglog.* 54:1–2.

- Hoosack, B. R., M. J. Adams, E. H. Grant, C. A. Pearl, J. B. Bettaso, W. J. Barichivich, W. H. Lowe, K. true, J. L. Ware y P. S. Corn. (2010). Low Prevalence of Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in Amphibians of U.S. Headwater Streams. *Journal of Herpetology*. (44)2: 253–260.
- Hunter, D., R. Pietsch, N. Clemann, M. Scroggie, G. Hollis y G Marantelli. (2009). Prevalence of the Amphibian Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in the Australian Alps. Report to the Australian Alps Liaison Committee: January 2009
- Huys, G., M. Pearson, P. Kämpfer, R. Denys, M. Cnockaert, V. Inglis, y J Swings. (2003). *Aeromonas hydrophila* sp. *ranae* sp. nov., isolated from septicaemic farmed frogs in Thailand. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology*. (53)3: 885-891.
- Hyatt, A. D., D. G. Boyle, V. Olsen, D. B. Boyle, L. Berger, D. Obendorf, A. Dalton, K. Kriger, M. Hero, H. Hines, R. Phillott, R. Campbell, G. Marantelli, F. Gleason y A. Colling. (2007). Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis Aquat Org*. 73:175–192
- IUCN. (2007). The IUCN Red List of Threatened Species, en<www.iucnredlist.org>
- Joglar, R. L., A. O. Álvarez, T. M. Aide, D. Barber, P. A. Burrowes, M. A. García, A. León-Cardona, A. V. Longo, N. Pérez-Buitrago, A. Puente, N. Ríos-López y P. J. Tolson. (2007). Conserving the Puerto Rican herpetofauna. *Appl Herpetol*. 4: 327–345.
- Johnson, M. L., L. Berger, L. Philips y R. Speare. (2003). Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis Aquat Org*. 57:255–260.
- Johnson, M. L., y R. Speare. (2005) Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Dis. Aquat. Org*. 65: 181–186.
- Kiesecker, J. M., A. R. Blaustein, y C. L. Miller. (2001). Transfer of a pathogen from fish to amphibians. *Conservation biology*. (15)4: 1064-1070.
- Killpatrick, A. M., J. C. Briggs P. Daszak. (2010). The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology and Evolution* (25)2: 109-118.
- Kruger K. M. y J. Hero (2006) Survivorship in wild frogs infected with chytridiomycosis. *EcoHealth* 3:171–177.
- Kruger K. M. y J. Hero. (2007) Large-scale seasonal variation in the prevalence and severity of chytridiomycosis. *Journal of Zoology*. 271: 352–359.
- Kusrini M. D., L. F. Skerratt, S. Garland, L. Berger y W. Endarwin. (2008). Chytridiomycosis in frogs of Mount Gede Pangrango, Indonesia. *Dis. Aquat. Org*. 82: 187–194.

- La Marca, E., K. R. Lips, S. Lötters, R. Puschendorf, R. Ibáñez, J. V. Rueda-Almonacid, R. Schulte, C. Marty, F. Castro, J. Manzanilla-Puppo, J. E. García-Pérez, F. Bolaños, G. Chaves, J. A. Pounds, E. Toral y B. E. Young. (2005). Catastrophic population declines and extinctions in neotropical harlequin frogs (Bufonidae: Atelopus). *Biotropica*. 37: 190–201.
- Larson, L., D. Wake y T. Devitt. (2006). Plethodontidae. Lungless Salamanders. Version 26 September 2006 (under construction). <http://tolweb.org/Plethodontidae/15441/2006.09.26> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- Laurance, W. F., K. R. McDonald y R. Speare. (1997). In defense of the epidemic disease hypothesis. *Conserv Biol*. 11:1030–1034.
- Lips, K.R. (1999). Mass mortality of the anuran fauna at an upland site in Panama. *Conserv Biol*. 13: 117–125.
- Lips, K. R., y M. A. Donnelly. (2002). What the tropics can tell us about declining amphibian populations: Current patterns and future prospects. *North American Amphibians: status and Conservation*. University of California Press, Chicago. P. p. 388–406.
- Lips, K.R., D.E. Green y R. Papendick. (2003a). Chytridiomycosis in wild frogs from Southern Costa Rica. *J. Herpetol.* 37:215–218.
- Lips, K. R., J. D. Reeve y L. R. Witters. (2003b). Ecological traits predicting amphibian population declines in Central America. *Conserv Biol*. 17:1078–1088.
- Lips, K. R., J. R. Mendelson III, A. Muñoz Alonso, L. Canseco-Marquez, and D. G. Mulcahy. (2004). Direct evidence of declines in amphibian populations in montane southern Mexico. *Biological Conservation*. 119: 555–564.
- Lips, K.R., F. Brem, R. Brenes, J. D. Reeve, R. A. Alford, J. Voyles, C. Carey, L. Livo, A. P. Pessier y J. P. Collins. (2006) Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proc Natl Acad Sci*. 103:3165–3170.
- Lips K. R., J. Diffendorfer, J. R. Mendelson III y M. W. Sears. (2008). Riding the wave: Reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLoS Biol* 6(3).
- Longcore, E.J., A.P. Pessier y D.K. Ni-chols. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*. 91: 219–227.
- Longo, A. V., P. A. Burrowes y R. L. Joglar. (2009). Seasonality of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in direct-developing frogs suggests a mechanism for persistence. *Dis. Aquat. Org.* 92(2-3): 253–60.

- Longo, A. V. y P. A. Burrowes. (2010). Persistence with Chytridiomycosis Does Not Assure Survival of Direct-developing Frogs. *EcoHealth*. 7(2): 185-195.
- Matutte, B., K. B. Storey, F. C. Knoop, y J. M. Conlon. (2000). Induction of synthesis of an antimicrobial peptide in the skin of the freeze-tolerant frog, *Rana sylvatica*, in response to environmental stimuli. *FEBS Lett*. 483: 135–138.
- Mendoza-Almeralla C. (2011). Dinámica de la infección de acuerdo al gradiente de temperatura . Comunicación Personal.
- Morehouse, E. A., T. Y. James, A. R. D. Ganley, R. Vilgalys, L. Berger, P. J. Murphy y J. E. Longcore. (2003). Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone. *Molecular Ecology*. 12:395-403.
- Muñoz, L. A. (2006). Actualización y enriquecimiento de las bases de datos del proyecto de evaluación y análisis geográfico de la diversidad faunística de Chiapas. El Colegio de la Frontera Sur. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. U014. México.
- Murray, K. A., L. F. Skerratt, R. speare y H. McCallum. (2009). Impact and Dynamics of Disease in Species Threatened by the Amphibian Chytrid Fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology*. (23)5: 1242–1252.
- NOM-059-ECOL-2010. (2012). Norma Oficial Mexicana, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario oficial de la nación.
- Parra-Olea G, M. Garcia-Paris, D. B. Wake. (1999). Status of some populations of Mexican salamanders (Amphibia: Plethodontidae). *BioTropica*. 47:217–223.
- Parra-Olea, G., M. E. Martinez y P. de L. G. Perez. (2005). Forecasting Climate Change Effects on Salamander Distribution in the Highlands of Central México. *Biotropica*. (37)2: 202-206.
- Parris, M. J., A. Davis y J. P. Collins. (2004a). Single-host pathogen effects on mortality and behavioral responses to predators in salamanders (Urodela: Ambystomatidae). *Can. J. Zool*. 82: 1477–1483.
- Parris, M. J. y D. R. Baud. (2004b). Interactive effects of a heavy metal and chytridiomycosis on Gray Tree frog larvae (*Hyla chrysoscelis*). *Copeia*. (2004)2: 344–350.
- Parris, M. J. y T. O. Cornelius. (2004c). Fungal pathogen causes competitive and developmental stress in larval amphibian communities. *Ecology*. (85)12: 3385–3395.
- Pasmans, F., P. V. Rooij, M. Blooi, G. Tessa, S. Bogaerts, S. Giuseppe, W. J. Garner, M. C. Fisher, B. R. Schmidt, T. Woeltjes, W. Beukema, S. Bovero, C. Adriaensen, F. Oneto, D. Ottonello, A. Martel y S. Salvadio. (2013). Resistance to Chytridiomycosis in European Plethodontid Salamanders of the Genus *Speleomantes*. *PLoS ONE*. 8(5): e63639.

- Pechmann, J.K. H. y H.M. Wilbur. (1994). Putting declining amphibian populations in perspective: Natural fluctuations and human impacts. *Herpetologica*. 50:65-84.
- Piotrowski, J.S., S. L. Annis y J. E. Longcore. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*. 96: 9–15.
- Pounds, J. A., M. P. Fogden, J. M. Savage y G. C. Gorman. (1997). Test of null models for amphibian declines on a tropical mountain. *Conservation Biology*. 11: 1307-1322.
- Pounds, J. A., M. P. Fogden y J. H. Campbell. (1999). Biological response to climate change on a tropical mountain. *Nature*. 398: 611–615.
- Powell, M. J. (1993). Looking at mycology with a Janus face: a glimpse of chytridiomycetes active in the environment. *Mycologia*. 85:1-20.
- Retallick, R. W. R., H. McCallum, R. Speare. (2004). Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community post-decline. *PLoS Biol* 2:e351.
- Rollins-Smith, L. A. (2001). Neuroendocrine-immune system interactions in amphibians. Implications for understanding global amphibian declines. *Immunol. Res.* 23:273–280.
- Rollins-Smith, L. A., C. Carey, J. E. Longcore, J. K. Doersam, A. Boutte, J. E. Bruzgal, y J. M. Conlon. (2002). Activity of antimicrobial skin peptides from ranid frogs against *Batrachochytrium dendrobatidis*, the chytrid fungus associated with global amphibian declines. *Devel. Comp. Immunol.* 26:471–479.
- Rollins-Smith L. A., J. P. Ramsey, J. D. Pask, L. K. Reinert, D. C. Woodhams. (2011). Amphibian immune defenses against chytridiomycosis: impacts of changing environments. *Integr Comp Biol.* 51: 552–562.
- Ron, S. R. y A. Merino. 2000. Declinación de anfibios del Ecuador: información general y primer reporte de quitridiomycosis para Sudamérica. *Frog-log*. 42: 2-3.
- Ron, S. R. (2005) Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the new world. *Biotropica*. 37: 209-221.
- Roseblum, E. B., Y. T. James, K. R. Zamudio, T. J. Poorten, D. Ilut, D. Rodriguez, J. M. Eastman, K. Richards-Hrdlicka, S. Joneson, T. S. Jenkinson, J. E. Longcore, G. Parra-Olea, L. F. Toledo, M. L. Arellano, E. M. Medina, S. Restrepo, S. V. Flechas, L. Berger, C. J. Briggs y J. E. Stajich. (2013). Complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed with genome resequencing data. *PNAS*. (110)23: 9385-9390.
- Rovito S. M., G. Parra-Olea, C. R. Vasquez-Almazan, T. J. Papenfuss, D. B. Wake. (2009). Dramatic declines in Neotropical salamander populations are an important part of the global amphibian crisis. *Proc. Nat. Aca. Sci.* 106:3231–3236

- Santos Barrera, G. (2004). Enfermedades infecciosas y su papel en la declinación mundial de las poblaciones de anfibios. CONABIO. Biodiversitas. 56: 1-6.
- Sarmiento, I., M. Tantaleán y A. Huiza. (1999). Nematodos parásitos del hombre y de los animales en el Perú. Rev. Peru. Parasitol. 14: 9-65.
- Speare, R. y L. Berger. (2000). Chytridiomycosis in amphibians in Australia. <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/chyspec.htm>.
- Speare, R., R. Alford, K. Aplin, L. Berger. (2001). Nomination for listing of amphibian chytridiomycosis as a key threatening process under the Environment Protection and Biodiversity Conservation Act 1999. In: Speare, R. Developing management strategies to control amphibian diseases: decreasing the risks due to communicable diseases. School of Public Health and Tropical Medicine, James Cook University, Townsville. p 185–196.
- Tantaleán, M.V., L. Sarmiento y A. Huiza. (1992). Digeneos (Trematoda) del Perú. Boletín de Lima 80: 47-84.
- Taylor, S. K., E. S. Williams y K.W. Mills. (1999). Effects of malathion on disease susceptibility in Woodhouse's Toads. Journal of Wildlife Diseases. 35: 536-541.
- Une Y., S. Kadekaru, K. Tamukai, K. Goka, T. Kuroki. (2008). First report of spontaneous chytridiomycosis in frogs in Asia. Dis. Aquat. Org. 82: 157–160.
- Van Rooij, P., A. Martel, J. Nerz, S. Voitel, F. V. Immerseel, F. Haesebrouck y F. Pasmans. (2011). Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Mexican Bolitoglossine Salamanders Using an Optimal Sampling Protocol. Ecohealth. 8(2):237-43.
- Voordouw, M. J., D. Adams, B. Houston, P. Govindarajulu y J. Robinson. (2010). Prevalence of the pathogenic chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, in an endangered population of northern leopard frogs. BMC Ecology. 10:6.
- Voyles, J., L. Berger, S. Young, R. Speare, R. Webb, J. Warner, D. Rudd, R. Campbell y L. F. Skerratt. (2007). Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. Dis. Aquat. Org. 77: 113–118.
- Wake, D. B., V. T. Vredenburg. (2008). Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. Proc. Nat. Aca. Sci. 105: 11466–11473.
- Woodhams, D. C., K. Ardipradja, R. A. Aldrood, G. Marantelli, L. K. Reinertz y L. A. Rollins-Smith. (2007). Resistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and is correlated with skin peptide defenses. Animal Conservation. (10)4: 409–417.
- Woodhams, D. C. y R. A. Alford. (2005). Ecology of Chytridiomycosis in Rainforest Stream Frog Assemblages of Tropical Queensland. Conservation Biology. (19)5: 1449–1459.

- Woodhams, D.C., R. A. Alford, C. J. Briggs, M. Johnson y L. A. Rollins-Smith. (2008) Life-history trade-offs influence disease in changing climates: strategies of an amphibian pathogen. *Ecology*. 89:1627–1639.
- Yang, H., H. Baek, R. Speare, R. Webb, S. Park, T. Kim, K. C. Lasater, S. Shin, S. Son, J. Park, M. Min, Y. Kim, K. Na, H. Lee y S. Park. (2009). First detection of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in free-ranging populations of amphibians on mainland Asia: survey in South Korea. *Dis. Aquat. Org.* 86: 9–13.
- Young, B. E., S. N. Stuart, J. S. Chanson, N. A. Cox y T. M. Boucher. (2004). Joyas que Están Desapareciendo: El Estado de los Anfibios en el Nuevo Mundo. NatureServe, Arlington, Virginia.

ANEXO 1: Información sobre factores físicos, estado de desarrollo y grado de infección para las muestras de la primavera.

Muestra	Temp. Corp °C	Temp. Sust. °C	Humedad relativa (%)	Longitud H-C (mm)	Temp. Amb °C	Grado de infección (equivalente zoosporas)
AL168	12.2	10	33.8	45.47	27	0
AL169	15.8	12.6	33.8	32.42	27	0
AL170	13.6	10.8	33.8	47.37	27	0
AL171	13.6	10.8	33.8	47.37	27	0
AL172	10.4	8.8	33.8	43.96	27	0
AL173	19.6	13.2	33.8	19.85	27	7.36
AL174	12.8	12.6	33.8	21.74	26	0
AL175	10.8	10.4	33.3	22.07	23.8	0
AL176	12.4	11.6	33.3	26.14	23.8	0
AL177	12.2	12	33.3	42.25	23.8	0
AL178	19.4	18.8	30.5	35.74	27.7	0
AL179	15.4	15	30.5	30.76	27.7	0
AL180	12.2	11.6	33.1	44.51	21.3	0
AL181	12.2	11.8	33.1	45.9	21.3	0
AL182	18.3	14	33.1	46.75	21.3	0
AL183	19.8	19.2	30.7	22	25.2	0
AL184	25.6	19.2	30.7	19.51	25.2	0
AL185	16.2	15.2	30.7	23.86	25.2	0
AL186	18.6	17.6	30.7	44.32	25.2	0
AL187	15.4	14.2	30.7	31.57	25.2	0
AL188	13.6	13.2	30.7	46.11	25.2	0
AL189	13.6	10.6	30.7	42.81	25.2	0
AL190	11.4	13.2	30.7	36.03	25.2	0
AL191	19	14.2	31.2	33.95	26.1	0
AL192	15.4	14.6	31.2	46.43	26.1	0
AL193	19.8	19	33.8	41.26	27	0
AL194	15.2	14.8	33.8	26.09	27	0
AL195	14.4	14	33.3	24.74	23.8	0
AL196	15.6	15.2	33.3	31.69	23.8	0
AL197	14	11.6	33.3	47.3	23.8	0
AL198	12.4	11	26.14	36.44	27.7	0
AL199	21.4	15	31.4	27.6	24.2	0
AL200	19.8	15	31.9	31.59	24.2	0

Muestra	Temp. Corp °C	Temp. Sust. °C	Humedad relativa (%)	Longitud H-C (mm)	Temp. Amb °C	Grado de infección (equivalente zoosporas)
AL201	17.4	15	31.9	48.64	24.9	617.6
AL202	17.6	14.4	29	43.22	24.9	0
AL203	16.4	14.4	29	33.29	24.9	0
AL204	16.2	14.4	29	44.85	24.9	0
AL205	23.4	14.6	22.4	45.9	24	0
AL206	20.2	18.6	26.9	33.82	24	0
AL207	31.6	18.6	26.9	45.02	24	0
AL208	17.2	16.8	26.3	24.52	27	0
AL209	13.2	14.4	26.3	28.27	27	0
AL210	21.4	16.8	26.5	34.07	23.4	1.84
AL211	13.4	11.6	26.5	46.48	23.4	96.16
AL212	19.2	14.4	26.5	38.21	23.4	0
AL213	13.8	12	32.9	28.2	23.4	0
AL214	27.8	19.4	30.7	33.15	22.7	0
AL215	17.2	15.8	30.7	42.53	22.7	6.32
AL216	13.2	11.8	30.7	33.49	22.7	0
AL217	17.8	14	30.6	40.47	23.1	0
AL218	15.6	14.2	20.2	25.26	34	13.76
AL219	13.8	12.2	20.2	30.47	34	0
AL220	17.6	14.4	20.2	26.53	34	0
AL221	14.4	14	38.2	27.26	20.2	0
AL222	15.4	14.9	38.2	28.05	20.2	0
AL223	15.8	15.6	38.2	23.76	20.2	0
AL224	14.6	16.4	67.7	38.87	19.6	0
AL225	15.4	16	67.7	41.31	19.6	0
AL226	14	16	67.7	28.37	19.6	0
AL227	15.8	15	67.7	24.88	19.6	0
AL228	16.8	16	67.7	43.03	19.6	0
AL229	15.2	15.4	67.7	29.34	19.6	0
AL230	17.2	17.8	64.4	46.39	19.5	10.88
AL231	17.2	16	64.4	33.65	19.5	6.4
AL232	16.4	15.6	64.4	29.42	19.5	0
AL233	15.6	14.6	57.8	40.09	21.2	0
AL234	14.6	14	57.8	20.98	21.2	0

Muestra	Temp. Corp °C	Temp. Sust. °C	Humedad relativa (%)	Longitud H-C (mm)	Temp. Amb °C	Grado de infección (equivalente zoosporas)
AL235	15.2	15.4	57.8	29.69	21.2	0
AL236	20.8	20.6	57.8	41.23	21.2	0
AL237	18.2	17.4	57.8	35.5	21.2	0
AL238	16	16.2	57.8	42.82	21.2	57.76
AL239	19.2	17.8	57.8	20.7	21.2	0
AL240	18.6	17.6	57.8	30.29	21.2	17.6
AL241	16.4	15	57.8	21.64	21.2	0
AL242	15.6	14.4	57.8	31.06	21.2	0
AL243	16.2	15.1	57.8	26.33	21.2	0
AL244	16.4	14.6	57.8	29.57	21.2	7894
AL245	16.6	13.6	57.8	34.59	21.2	5.52
AL246	14.8	14.4	57.8	27.48	21.2	0

ANEXO 2: Información sobre factores físicos, estado de desarrollo y grado de infección para las muestras del verano.

Muestra	Temp. Corp °C	Temp. Sust. °C	Humedad relativa (%)	Longitud H-C (mm)	Temp. Amb °C	Grado de infección (equivalente zoosporas)
AL247	16.4	15	57.8	26.78	21.2	1.6
AL248	15.8	15.8	65	31.94	20	45.6
AL249	14.8	15	65	48.31	20	0
AL250	14	14.2	65	17.33	20	0
AL251	17.8	13.8	65	24.24	20	0
AL252	14	13.8	65	32.09	20	0
AL253	16.2	16	65	28.05	20	0
AL254	15.4	15	65	15.76	20	0
AL255	16.2	15.4	65	18.66	20	3.52
AL256	16.2	15.6	65	31.34	20	0
AL257	16.2	16.2	65	30.36	20	0
AL258	14.2	14	65	32.9	20	1169.6
AL259	13.2	13.6	65	28.63	20	23.44
AL260	17.6	15.6	58	28.79	24	0
AL261	12.8	12.2	82.8	10.06	16.2	0
AL262	15.8	12.2	82.8	51.25	16.2	0
AL263	13.2	12.2	82.8	50.55	16.2	0
AL264	11.4	11.2	90	30.35	15.5	0
AL265	11.8	11.8	90	57.13	15.5	0
AL266	11.4	11.4	90	???	15.5	0
AL267	11	10.8	90	34.69	15.5	59.44
AL268	11.6	6.8	90	46.84	15.5	0
AL269	10.4	10.2	74.7	44.06	16.2	0
AL270	10.8	10.6	74.7	53.06	16.2	58.08
AL271	10.2	10	74.7	46.89	16.2	0
AL272	11.2	10.8	74.7	39.25	16.2	0
AL273	14.6	10.6	74.7	34.12	16.2	0
AL274	10.4	10	74.7	46.71	16.2	213.6
AL275	10.4	10.4	74.7	56.23	16.2	0
AL276	9.6	9.6	74.7	78.34	16.2	0
AL277	10.6	9.2	74.7	54.94	16.2	0
AL278	10.2	10.2	74.7	49.24	16.2	0
AL279	11.6	10.8	74.7	37.22	16.2	0
AL280	12	11.8	90	34.6	15.2	3.28

Muestra	Temp. Corp °C	Temp. Sust. °C	Humedad relativa (%)	Longitud H-C (mm)	Temp. Amb °C	Grado de infección (equivalente zoosporas)
AL281	11.4	10.6	90	33.11	15.2	0
AL282	12.8	12.6	90	29.4	15.2	0
AL283	13.4	12.8	90	36.49	15.2	0
AL284	12.6	11.2	90	23.68	15.2	0
AL285	12.4	12.6	90	33.46	15.2	0
AL286	12.12	11.6	90	47.25	15.2	0
AL287	11.4	11.2	90	42.21	15.2	0
AL288	12.4	11.6	69.3	48.46	19.9	0
AL289	11.8	11.6	69.3	41.94	19.9	0
AL290	11.8	11.8	69.3	46.29	19.9	0
AL291	12.6	12	71.4	36.55	18.2	0
AL292	12.2	12.4	53.8	40.68	17.8	0
AL293	10.2	10	53.3	33.66	16.9	0
AL294	10.4	9.4	53.4	35.68	16.9	0
AL295	9.4	9.4	53.3	42.3	17.5	0
AL296	10.2	9.4	53.3	43.61	17.5	0
AL297	9.8	10.2	52.8	47.8	17	0
AL298	9.6	10.4	52.8	30.8	17	0
AL299	9.2	9	58.5	32.9	15.4	0
AL300	8.8	9.4	58.5	32.9	15.4	0
AL301	7.6	7.2	59.2	50.4	13.9	0
AL302	9.2	9.4	59.2	26.3	13.9	0
AL303	9.2	8.8	62.4	33.35	13.4	0
AL304	8.8	8.6	62.4	22.54	13.4	0
AL305	8.4	8.2	62.4	36.8	13.4	9.92
AL306	8.6	8.6	62.4	49.83	13.4	0
AL307	8.6	8.8	62.4	28.98	13.4	0
AL308	8.6	8.4	62.4	49.35	13.4	10.72
AL309	7.4	7.2	68.2	26.93	13	0
AL310	6.8	7.2	68.2	51.35	13	0
AL311	7.7	6.6	68.2	43.98	13	68.4
AL312	7.2	7	68.2	54.57	13	0

ANEXO 3: Información sobre factores físicos, estado de desarrollo y grado de infección para las muestras del otoño.

Muestra	Temp. Corp °C	Temp. Sust. °C	Humedad relativa (%)	Longitud H-C (mm)	Temp. Amb °C	Grado de infección (equivalente zoosporas)
AL01	10.06	9	63	40.38	16.6	0
AL02	9.6	9.6	66	36.49	16.6	0
AL03	9.8	10	66	22.81	15.8	0
AL04	9.2	9	62	20.67	15.8	0
AL05	8.4	8.6	41.4	45.23	15.8	0
AL06	10.2	11	42.3	30.1	15.3	0
AL07	10	10.4	41.5	44.62	15.3	0
AL08	10.6	10.8	41.5	39.14	15.3	0
AL09	10.4	10.2	40.6	29.49	18.2	0
AL10	13.8	11	53.2	32.7	19.6	0
AL11	11	11.2	39.6	45.66	19.6	0
AL12	10.6	10.6	38.75	23.47	14.5	0
AL13	12.8	12.2	45.7	38.22	14.5	0
AL14	11.2	13.4	45.8	43.68	13.9	0
AL15	6.2	7.5	48	21.69	12.7	11.2
AL16	4.02	11.9	53	20.61	11.9	0
AL17	11.8	11.4	37.1	16.06	13.9	0
AL18	8.2	5.8	38.1	34.4	16.8	0
AL19	16.8	17.5	35.4	50.39	16.8	0
AL20	6.6	8.2	32.5	57.13	18.4	0
AL21	11.2	10.6	34.8	25.09	17.2	0
AL22	7.2	7.4	40.5	33.52	9.4	0
AL23	2	2.2	40.5	17.43	9.4	0
AL24	2.4	2.4	40.5	22.08	16.9	0
AL25	4.4	5.8	37.9	21.29	17.3	0
AL26	11.2	8.8	39.9	28.15	18.5	0
AL27	10.6	14.9	39.2	29.33	18.5	0
AL28	10.5	15.6	39.2	20.37	18.5	0
AL29	10.4	16.7	39.2	25.59	17.2	0
AL30	7.4	6.6	39.2	26.98	17.2	0
AL31	7.8	5.6	38.7	26.66	18.1	0.08
AL32	7.2	6.4	37.5	27.78	18.1	0
AL33	7.3	6.3	37.5	22.04	18.1	1.76
AL34	7.2	6.3	37.5	22.74	18.1	0

Muestra	Temp. Corp °C	Temp. Sust. °C	Humedad relativa (%)	Longitud H-C (mm)	Temp. Amb °C	Grado de infección (equivalente zoosporas)
AL35	7.4	6.5	37.5	24.18	17.5	0
AL36	7.1	6.4	37.5	17.74	18.6	0
AL37	5.8	6.2	37.1	19.78	18.6	0
AL38	5.8	6.9	37.1	18.53	18.2	0
AL39	6.8	5.4	36.6	21.34	18.2	0

ANEXO 4: Información sobre factores físicos, estado de desarrollo y grado de infección para las muestras del invierno.

Muestra	Temp. Corp °C	Temp. Sust. °C	Humedad relativa (%)	Longitud H-C (mm)	Temp. Amb °C	Grado de infección (equivalente zoosporas)
AL40	8.8	7.2	45.1	37.51	17.7	0
AL41	7.2	6	45.1	29.2	17.7	0
AL42	7.2	6.28	45.1	40.52	17.7	0
AL43	12	10	44.3	24.42	22.5	5.6
AL44	5.4	4.5	44.3	35.18	22.5	0
AL45	11.4	9.8	34.2	20.4	18.4	0
AL46	6.8	6.6	34.2	34.5	18.4	0
AL47	9	7.6	34.2	30.25	18.4	4.32
AL48	8.2	7.8	39.1	27.28	19.7	0
AL49	8	7.2	39.1	31.01	19.7	0
AL50	7.4	7.6	39.1	49.58	19.7	0
AL51	9.6	6.6	39.1	30.45	19.7	3.68
AL52	8.8	7.8	39.1	24.57	19.7	0
AL53	4.6	4.4	39.1	21.2	19.7	2.72
AL54	8.4	7.6	28.4	37.12	22.8	4.64
AL55	8.4	7.8	28.4	37.26	22.8	0
AL56	7.6	7.2	28.4	34.92	22.8	0
AL57	13.8	13.4	28.4	35.51	22.8	1.92
AL58	6.8	5.6	30.4	32.19	19.8	0
AL59	3.8	2.4	30.4	28.17	19.8	67.44
AL60	3.6	2.8	30.4	31.85	19.8	0
AL61	8.8	8.2	30.4	19.26	23.1	0
AL62	15	6	23.9	17.32	23.1	0
AL63	6.6	6.2	23.9	42.19	23.1	0
AL64	9	7.2	23.9	33.81	23.1	0
AL65	8.6	6.2	32.5	32.5	19.6	2.24
AL66	7.2	6.2	32.5	28.81	19.6	0
AL67	7	7.6	32.5	32.34	19.6	0
AL68	7.6	8	32.5	18.82	19.6	0
AL69	8.2	8.4	27.6	29.55	22	0
AL70	6.8	6.2	24	41.52	20	1351.2
AL71	6.2	5.8	24	28.16	20	0
AL72	8.5	7.6	32.8	30.2	20.9	1.52
AL73	10.6	10.4	26.1	54	22.1	0

Muestra	Temp. Corp °C	Temp. Sust. °C	Humedad relativa (%)	Longitud H-C (mm)	Temp. Amb °C	Grado de infección (equivalente zoosporas)
AL74	10.4	8.8	65.7	31.49	15.3	0
AL75	23.8	9.4	65.7	43.53	15.3	0
AL76	17.2	9.2	65.7	36.29	15.3	0
AL77	8.8	9.2	55.8	19.58	18.2	0
AL78	15.2	12.2	58.9	17.69	17.3	0
AL79	14.4	9.6	58	30.09	12.2	0
AL80	15.2	9.6	47.8	44.34	20.3	0
AL81	8.2	9.4	47.8	39.26	20.3	6
AL82	13.3	8.2	47.8	41.33	20.3	0
AL83	14.4	8.2	52.5	43.76	19.2	0
AL84	7.6	7.4	52.5	31.83	19.2	0
AL85	12.8	9.4	49.7	32.1	20.8	0
AL86	14.2	7.8	49.7	36	20.8	0
AL87	14.6	12.8	49.7	33.08	20.8	0
AL88	13.6	14.8	49.7	35.89	20.8	0
AL89	10.2	9.8	49.7	30.14	20.8	0
AL90	12.2	9.4	49.7	41.35	20.8	0
AL91	10.8	10.4	49.7	21.01	20.8	1.28
AL92	11.4	9.6	49.7	47.95	20.8	0
AL93	12.8	9.2	49.7	43.48	20.8	12.88
AL94	12.12	8.8	49.7	19.57	20.8	0
AL95	10.4	9.4	49.7	28.16	20.8	0
AL96	11.4	10.6	49.7	37.76	20.8	2.08
AL97	9.8	9.4	49.7	20.32	20.8	0
AL98	9.8	9.2	49.7	28.32	20.8	0
AL99	10.8	9.6	49.7	47.29	20.8	0
AL100	11.2	11.4	61.6	30.44	16.2	0
AL101	13	12.8	61.1	29.23	16	0
AL102	8.6	8.6	61.1	29.47	16	14.48
AL103	8.8	8.8	61.1	31.47	16	0
AL104	9.8	9.1	51.5	38.96	18.8	0
AL105	9.6	9	51.5	41.6	18.8	0
AL106	9	9	51.5	44.52	18.8	2.16
AL107	9.4	9	51.5	20.39	18.8	3.68
AL108	8.4	8.6	51.6	51.56	21.5	0

Muestra	Temp. Corp °C	Temp. Sust. °C	Humedad relativa (%)	Longitud H-C (mm)	Temp. Amb °C	Grado de infección (equivalente zoosporas)
AL109	10.6	11.2	51.6	29.29	21.5	0
AL110	11.8	11.8	51.6	46.78	21.5	0
AL111	11	11	51.6	50.77	21.5	11.12
AL112	11	11	51.6	42.82	21.5	0
AL113	9.8	9.8	51.6	39.38	21.5	0
AL114	10	10	51.6	33.83	21.5	0
AL115	10.8	10	51.6	45.13	21.5	0
AL116	10.8	10.8	51.6	46.2	21.5	0
AL117	10.6	10.6	51.6	52.55	21.5	0
AL118	10.6	10.6	51.6	37.26	21.5	0
AL119	10.6	10.6	51.6	31.61	21.5	0
AL120	10.6	10.6	51.6	26.54	21.5	0
AL121	9.8	9.8	51.6	45.41	21.5	0
AL122	10.6	10.6	51.6	40.18	21.5	0
AL123	16.2	10	26.7	28.46	20.5	0
AL124	9.8	9.4	26.7	45.76	20.5	0
AL125	9.6	9.4	26.7	52.28	20.5	0
AL126	9.6	9.4	26.7	52.28	20.5	0
AL127	9.6	9	22	27	23	0
AL128	9.2	9	22	40.13	23	0
AL129	9.2	9	22	40.02	23	0
AL130	9	9	22	31.45	23	0
AL131	8.2	8.4	30.8	37.04	22	0
AL132	8.2	8.2	30.8	52.07	22	0
AL133	9.2	9.2	30.8	22.09	22	0
AL134	7.6	7.4	23.4	47.94	21.1	0
AL135	8.2	8	23.4	32.27	21.1	0
AL136	7.2	6.8	23.4	49.19	21.1	0
AL137	¿	?	22.8	28.1	22.1	0
AL138	¿	?	22.8	33.02	22.1	0
AL139	10.8	9.4	26.8	31.4	20.5	13.2
AL140	11.4	10.2	26.8	18.53	20.5	0
AL141	12.6	11.4	26.8	33.61	20.5	0
AL142	16.2	9.8	26.8	46.08	20.5	44.32
AL143	10.2	9.8	26.8	18.23	20.5	22.48

Muestra	Temp. Corp °C	Temp. Sust. °C	Humedad relativa (%)	Longitud H-C (mm)	Temp. Amb °C	Grado de infección (equivalente zoosporas)
AL144	13.4	9.6	26.8	20.71	20.5	0
AL145	14.2	11.4	22	37.56	23.2	13.52
AL146	14	11.4	22	38.54	23.2	0
AL147	10.6	8.6	22	37.07	23.2	0
AL148	11.2	8.6	22	37.9	23.2	0
AL149	12.2	8.6	22	43.79	23.2	0
AL150	10.8	8.4	30.6	43.88	22.1	0
AL151	11.8	8.4	30.6	37.06	22.1	0
AL152	9	9.4	23.7	39.51	20.7	71.04
AL153	14.4	12.2	23.7	33.8	20.7	4.08
AL154	12.2	10.8	23.7	31.14	20.7	0
AL155	13.4	10.8	23.7	18.67	20.7	0
AL156	12.4	10.8	23.7	17.48	20.7	0
AL157	10.2	9.2	23.7	37.33	20.7	0
AL158	12.4	10.4	28.6	44.48	20.3	0
AL159	12.8	11.4	28.6 ?		20.3	3.44
AL160	11.2	11	28.6	18.9	20.3	0
AL161	12.6	10	28.6	23.24	20.3	0
AL162	9.6	7.8	32.5	43.41	19.8	0
AL163	10.8	8	32.5	42.94	19.8	14.32
AL164	8.8	8	32.5	39.66	19.8	0
AL165	11.2	9.4	35.2	38.97	18.2	0
AL166	11.4	10	35.2	48.28	18.2	10.08
AL167	10.8	9.4	35.2	46.26	18.2	0