



Universidad Autónoma de Baja California



Facultad de Ciencias

Prevalencia del hongo patógeno
Batrachochytrium dendrobatidis
(Chytridiomycetes, Rhizophydiales) en tres
poblaciones de la rana *Hyla regilla* (Baird &
Girard, 1852) del noroeste de Baja California

Tesis Profesional

Que para obtener el Título de:

Biólogo

Presenta:

Norma Selene González Gutiérrez

Ensenada, B.C.

Abril 2018



Universidad Autónoma de Baja California



Facultad de Ciencias

Prevalencia del hongo patógeno
Batrachochytrium dendrobatidis (Chytridiomycetes,
Rhizophydiales) en tres poblaciones de la rana
Hyliola regilla (Baird & Girard, 1852) del noroeste
de Baja California

Tesis Profesional
Que para obtener el Título de:
Biólogo

Presenta:

Norma Selene González Gutiérrez

Aprobado por:

Dr. Carlos Alberto Flores López
DIRECTOR DE TESIS

Dra. Anny Peralta García
CO –DIRECTOR

Dr. Gorgonio Ruiz Campos
SINODAL

Ensenada, B. C.

Abril 2018

“En algún lugar, algo increíble está esperando ser
descubierto”

-Carl Sagan

Dedicatoria

A mis padres Macario Meléndez y Ana Gutiérrez

Por su amor, confianza y apoyo.

A mis hermanos Diana, Miriam, Mario

Y la nueva fuerza de motivación en nuestras vidas, bebe bu.

Por su cariño inigualable y fortaleza

Sin ustedes no hubiera sido posible concluir esta etapa de mi carrera.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Autónoma de Baja California, a la Facultad de Ciencias y a mis maestros por forzarme como estudiante y brindarme las herramientas y conocimientos necesarios para continuar mi carrera profesional.

Mi más profundo agradecimiento a mis directores Dra. Anny Peralta García y Dr. Carlos Alberto Flores López por la confianza y oportunidad que me brindaron para emprender este proyecto, por sus enseñanzas y doctrinas que me inspiraban a ser grandes científicos como ustedes. Al Dr. Gorgonio Ruiz Campos por aceptar ser parte del comité y brindar su apoyo como tal. Al M.C. Jorge Valdez Villavicencio por ser pieza clave en la formación del proyecto gracias a su experiencia y conocimiento.

Un agradecimiento a UC-MEXUS por el financiamiento en el proyecto del cual emergió mi tesis de licenciatura. A colaboradores de la Universidad de California Santa Barbara, la Dra. Cherie Briggs y Dra. Andrea Adams por su trabajo de laboratorio.


A los estudiantes que participaron en las salidas de campo del proyecto y apoyaron con la recolecta de anfibios. A los “chicos” del laboratorio, que siempre me inspiraban y apoyaban cuando fuese necesario.

Y a todas esas instituciones, empresas y amigos que muchas veces sin conocerme me brindaron ese apoyo y confianza, que fue como un impulso para poder llegar a culminar mis estudios; a todos ustedes, mil gracias.

Resumen

Resumen de la tesis de Norma Selene González Gutiérrez presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Ensenada, Baja California, México. Febrero, 2018.

Prevalencia del hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis*
(Chytridiomycetes, Rhizophydiales) en tres poblaciones de la rana *Hyla*
regilla (Baird & Girard, 1852) del noroeste de Baja California



Aprobado por:



Dr. Carlos Alberto Flores López

Dra. Anny Peralta García



Dr. Gorgonio Ruiz Campos

Resumen

Palabras Clave: *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Bd*, *Hyliolla regilla*, Altitud, Temperatura

El hongo patógeno quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), es de los principales factores responsables de la disminución de especies de anfibios a escala mundial. Los impactos del hongo se ven fluctuados por variables tanto bióticas como abióticas. Diversos estudios han encontrado que la temperatura tiene un papel importante en la ecología de la infección debido a la naturaleza ectotérmica del huésped anfibio. Con el fin de evaluar si existe una dependencia de la temperatura con las cargas zoospóricas y prevalencia de *Bd* en una especie huésped tolerante en el norte de la península de Baja California, monitoreamos tres poblaciones de la rana *Hyliolla regilla* a distintas elevaciones durante cuatro temporadas del año. Se analizaron frotis de piel de 217 individuos por medio de PCR de tiempo real, de los cuales 107 arrojaron una infección por *Bd* sin embargo síntomas de quitridiomycosis no fueron observados en ningún sitio, confirmando el estatus de especie tolerante de *Hyliolla regilla*. Los resultados del estudio indican que: 1) efectivamente la temperatura y altitud parecen estar jugando un papel importante en la prevalencia de *Bd* en *Hyliolla regilla*; y 2) temperatura y altitud no parecen estar jugando un papel en la carga zoospórica de *Bd* en *Hyliolla regilla*.

Índice

Introducción	14
Antecedentes	19
La especie <i>Hyliola regilla</i>	20
Hipótesis.....	23
Objetivo General	23
Objetivos Particulares	24
Metodología	25
Área de Estudio	25
Toma de Datos	22
Trabajo de Laboratorio.....	23
Análisis de Datos	24
Resultados	26
Prevalencia por sitio.....	27
Prevalencia por Temporada.....	30
Carga Zoospórica	20
Temperaturas.....	31
Correlación entre variables	36

Carga Zooesporica	37
Discusiones	40
Prevalencia	40
Cargas zoospóricas.....	41
Comportamiento observado en <i>Hylliola regilla</i>	43
Temperatura	45
Conclusiones	47
Recomendaciones.....	48
Literatura citada	49

Índice de Tablas

Tabla 1. Prevalencia de *Bd* en individuos de *Hyliola regilla* por sitio y por mes de colecta. Se indica el número de individuos (n), el número de individuos infectados (N inf.), prevalencia (%) y promedio de carga zoospórica (\bar{x}). NA (No aplica) indica que no se recolectaron datos.29

Tabla 2. Valores de carga zoospórica de *Batrachochytrium dendrobatidis* en individuos de *Hyliola regilla*, en la que se muestra el número de individuos muestreados sobre número total de individuos (n inf/n), media zoospórica (XZE), desviación estándar (\pm DS) y la prueba estadística para datos no paramétricos Kruskal-Wallis (K-W). NA donde individuos de *H. regilla* no fueron encontrados. RM: Rancho Meling. Nov: noviembre.21

Tabla 3. Valores zoospóricos mayores a los valores letales (ZE>10,000), donde se indica sitio, mes y carga zoospórica registrada (ZE).23

Tabla 4. Temperaturas mínimas y máximas del agua de San Carlos, Rancho Meling y La Grulla durante Noviembre 2015 y Octubre 2016.32

Tabla 5. Temperaturas mínimas y máximas del aire de San Carlos, Rancho Meling y La Grulla durante Noviembre 2015 y Octubre 2016.34

Índice de Figuras

Figura 1. Ejemplares de <i>Hyliola regilla</i> encontradas en Rancho Meling en el mes de Marzo del 2016 (Fotografía por Jorge H. Valdez Villavicencio).	26
Figura 2. Localización de los sitios de recolecta de los individuos de <i>Hyliola regilla</i> en el municipio de Ensenada, Baja California. Los símbolos indican los sitios de recolecta de los individuos.....	20
Figura 3. Sitio de recolecta San Carlos, Rancho " Campo Delicias " poza artificial (A) Mayo del 2016 (Fotografía por Carlos Flores), (B) Agosto del 2016 (Fotografía por Norma González).....	20
Figura 4. Sitio de recolecta Rancho Meling, octubre del 2016. Zona de arroyo (Fotografía por Jorge H. Valdez)	20
Figura 5. Sitio La Grulla, Sierra San Pedro Mártir, una de las pozas de recolecta de individuos en el mes de noviembre del 2011. (Fotografía por Carlos Flores)	21
Figura 6. Número de individuos de <i>Hyliola regilla</i> infectados y no infectados para San Carlos, Rancho Meling y la Grulla, para los 4 meses de colecta.	27
Figura 7. Grafico de prevalencia de infección de <i>Bd</i> para los sitios San Carlos, Rancho Meling y La Grulla por temporada (invierno, primavera, verano y otoño) para cada uno.....	20
Figura 8. Valores de carga zoospórica (ZE Log ₁₀) para los sitios de muestreo en San Carlos, Rancho Meling y la Grulla, durante los 4 meses de colecta. Se muestran los valores atípicos. * = p< 0.01 indica diferencias entre las temporadas para dicho sitio.	30

Figura 9. Temperaturas del agua de los sitios de muestreo a lo largo de un año, noviembre del 2015 a octubre 2016. De arriba abajo, San Carlos, Rancho Meling y la Grulla. Se muestra línea a 28°C.33

Figura 10. Temperaturas del agua de los sitios de muestreo a lo largo de un año, Noviembre del 2015 a Octubre 2016. De arriba abajo, San Carlos, Rancho Meling y la Grulla. Se muestra línea a 28°C.....35

Figura 11. Diagrama de dispersión de las variables altitud y carga zoospórica, en la cual se ilustra la línea de tendencia y el área sombreada la desviación estándar.37

Figura 12. Diagrama de dispersión de las variables temperatura del agua y carga zoospórica, en la cual se ilustra la línea de tendencia y el área sombreada la desviación estándar.38

Figura 13. Diagrama de dispersión de las variables temperatura del aire y carga zoospórica, en la cual se ilustra la línea de tendencia y el área sombreada la desviación estándar.39

Introducción

Actualmente los anfibios son el grupo de vertebrados más vulnerable ante la pérdida de biodiversidad, ya que presenta declives de poblaciones a tasas más rápidas que los mamíferos, aves, reptiles y peces (Stuart, et al., 2004). Durante años dicha pérdida se atribuía a la contaminación, daños por ganado y destrucción de hábitat (Hayes y Jennings, 1986; Taylor et al., 1999); sin embargo, los procesos de alteración y destrucción del hábitat no explicaban de forma satisfactoria la rápida desaparición de anfibios en algunos sitios, puesto que algunos organismos muertos se encontraban en áreas con mínimas o escasas evidencias de impacto antropogénico (Berger et al., 1998; Mahony, 1996; Richards et al., 1994). Fue por esto que se comenzó a sospechar que ciertas enfermedades podrían ser un factor importante en la disminución de poblaciones de anfibios en algunas regiones. Patógenos tales como virus, bacterias, parásitos, gusanos, oomicetos y hongos al parecer son agentes importantes del declive de anfibios (Berger et al., 1998; Blaustein et al., 1994; Jancovich et al., 1997). No obstante estudios subsecuentes han revelado que el hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) (Longcore et al., 1999) es el factor principal del gran declive.

Hoy en día se conoce que el ciclo de infección de *Bd* comienza en las capas superficiales queratinizadas de la epidermis de los anfibios (conocido como estrato córneo y estrato granuloso) causando un engrosamiento, lo cual eventualmente ocasiona la muerte del individuo (Mazzoni et al., 2003; Weldon

et al., 2004). A la fecha no se sabe exactamente el proceso mediante el cual el hongo mata a sus hospederos anfibios, pero se hipotetiza que es a través de la interrupción de la función normal de la piel (Campbell et al., 2012; Voyles et al., 2011). Debido a que un aumento en el grosor del estrato corneo (normalmente se encuentra dentro de las 2 y 5 μm) a $\sim 60\mu\text{m}$ interrumpiría la regulación de la respiración, el agua y los electrolitos, dado que la piel de los anfibios juega un papel crucial en su fisiología (Berger et al., 1998).

Los principales síntomas asociados con la infección de *Bd* son la hiperqueratinización, decoloración, ulceración, erosión del estrato corneo de la piel y modificación del comportamiento natural del anfibio (e.g. postura anormal, debilidad, inactividad motora y pérdida del reflejo de enderezamiento) (Daszak, et al., 1999). Dichos síntomas son difíciles de observar en etapas iniciales, ya que se presentan en las últimas semanas antes de que el individuo muera. El diagnóstico de la infección es posible mediante la amplificación molecular vía PCR de marcadores específicos de *Bd* en anfibios adultos; mientras que en renacuajos el diagnóstico también se puede realizar mediante la tinción de las zoosporas infectando las partes bucales.

El origen geográfico de *Bd* sigue siendo un debate, a la fecha dos hipótesis son las principales: 1) la hipótesis del patógeno endémico (Rachowicz, et al., 2005), que expresa la patogenicidad endémica de *Bd*, y que su reciente acción sobre la población de anfibios se debe a los recientes cambios en el ambiente, la cual la describe como una enfermedad emergente y; 2) la del patógeno incipiente, que propone que el hongo es de origen reciente y se ha extendido hacia nuevas

áreas geográficas (Daszak et al., 2000).

En la actualidad se conocen cinco linajes genéticos divergentes de *Bd*, *Bd*-GLP, *Bd*-CH, *Bd*-CAPE, *Bd*-Asia y *Bd*-Brazil. Entre ellos, el *Bd*-GLP (Linaje Panzootico Global global, por sus siglas en inglés), se encuentra distribuido a nivel mundial. Este linaje es de naturaleza emergente y de características hipervirulenta y se cree es el responsable principal de los declives de anfibios por *Bd* a nivel mundial (Farrer, et al., 2011). Los otros cuatro linajes se caracterizan por ser menos virulentos (Farrer, et al., 2011; Goka, et al., 2009; Martel, et al., 2014).

Se ha observado que la biología misma de los anfibios puede desprender pequeñas variaciones en la susceptibilidad de *Bd*, observando una mayor susceptibilidad en individuos post-metamórficos (Bakar et al., 2016; Adams et al., 2017; Knapp et al., 2011), y una mayor prevalencia en los machos de *Rana boylei* (EE.UU.), lo cual se hipotetiza es debido a factores conductuales o fisiológicos (Adams, et al., 2017).

En la actualidad diversos estudios se enfocan en determinar los factores que se encuentran asociados a la prevalencia y grado de infección de *Bd*, ya que es de vital importancia conocer la ecología de la infección, con el fin de controlar la enfermedad. Por ejemplo, algunos estudios han encontrado que la destrucción de hábitat, introducción de especies exóticas, calentamiento global, entre otros, parecen jugar un rol en la ecología de la enfermedad (Blaustein et al., 2005;

Burrowes, Joglar, y Green, 2004). Mientras que otros estudios han demostrado que temperaturas extremas parecen jugar un papel importante en la prevalencia y mortalidad de los individuos infectados (Lips et al., 2008; Pounds et al., 2006; Venesky et al., 2014). Debido a que los anfibios son ectotérmicos y la infección por *Bd* es epidérmica, no es de sorprenderse que el ambiente tenga una fuerte influencia sobre la infección de *Bd*.

Batrachochytrium dendrobatidis crece dentro de una amplia gama de temperaturas (4-28°C) óptimamente de 17-25°C. Esta amplia tolerancia ambiental puede explicar la amplia extensión de hábitat adecuado de *Bd* (Piotrowski et al., 2004). A temperaturas por debajo de los 10°C o superiores a 28°C el crecimiento del hongo no es favorecido y tanto los esporangios, como las zoosporas llegan a morir por desecación (Berger 2001; Woodhams et al., 2003), aunque se cree que a bajas temperaturas tiene el mismo funcionamiento. La capacidad de persistir e incluso de crecer lentamente a 4°C permitiría a *Bd* pasar el invierno en sus huéspedes, incluso en climas templados de latitudes medias, donde las temperaturas de los ambientes acuáticos son bajas. A medida que las temperaturas aumentan en el ambiente, el quítrido entonces puede reproducirse rápidamente (Piotrowski, et al., 2004).

Está demostrado que la humedad y el fotoperiodo pueden influir en la estacionalidad de los hongos saprobios (que obtienen sus nutrientes a partir de materiales orgánicos inertes) (Merrow et al., 2001; Talley et al., 2002), al igual el fotoperiodo y los ritmos endógenos influyen en la estacionalidad de la

inmunidad del huésped (Dowell 2001). Es por eso que los cambios estacionales distintos de la temperatura deben considerarse.

De igual manera el factor altitud también juega un papel importante en la biología de la enfermedad. En zonas templadas, los brotes pueden ocurrir en las áreas montañosas en los meses más cálidos (Bosch et al., 2001) o en las tierras bajas durante el invierno (Bradley et al., 2002; Piotrowski et al., 2004). Estudios en áreas montañosas en Centroamérica, Sudamérica (Brem y Lips 2008) y Australia (Retallick et al., 2004; Woodhams y Alford, 2005), han presenciado algunas de las mortandades más dramáticas registradas a la fecha.

Actualmente sólo un par de estudios se han enfocado a estudiar *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) en Baja California (Frías-Álvarez et al., 2010; Peralta García, 2017), en los cuales la relación *Bd*-altitud ha sido evaluada en la especie *Rana draytonii* (Peralta García, 2017).

En este trabajo se evaluó la carga zoospórica y prevalencia del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* en la rana nativa (*Hyla regilla*) como reservorio y su relación con las estaciones climáticas y altitud en tres poblaciones del noroeste de Baja California.

Antecedentes

Al final de la década 1990-2000, las convenciones de herpetología de diversos países concluyeron que las poblaciones de anfibios se encontraban en un proceso de drástico declive poblacional a escala global (Primer Congreso Mundial de Herpetología, Canterbury, Inglaterra, 1989). Dos años después se atribuyeron dichos efectos al hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Longcore, et al., 1999), causante principal de los declives observados en Australia y Panamá en 1998 (Berger et al., 2004). Desde entonces el hongo se ha encontrado entre individuos muertos, moribundos e incluso sanos en América, África, Europa (Berger, et al., 2004), Indonesia (Kusrini et al., 2008) y Japón (Goka, et al., 2009).

México no es la excepción en este declive masivo de anfibios a causa del hongo, ya que se han registrado casos positivos; la muerte de algunas especies ha sido evidenciada en diversos estados de la república (Frías-Alvarez et al., 2010; Hernández R. 2017; Lips et al., 2004; Mendoza-Almeralla et al., 2015). En Baja California existen reportes del hongo en diversas poblaciones de anfibios, tanto endémicos como exóticos. Sin embargo, la patología asociada con la enfermedad no ha sido observada (Peralta-García, 2017). Trabajo de campo realizado en el norte de Baja California, México y sur de Oaxaca y Tabasco, durante el verano y otoño de 2005, y el verano, otoño e invierno de 2006 conducidos por Frías

Álvarez et al., 2010 arrojaron resultados de cero prevalencia para Baja California en individuos de *Hyliola cadaverina* (0 individuos infectados/3 individuos muestreados) e *Hyliola regilla* (0/18) (Frías-Alvarez, et al., 2008). De manera posterior, Peralta-García (2017) detectó la presencia de *Bd* en especies tanto nativas como exóticas, tales como *Anaxyryus boreas*, *A. californicus*, *Hyliola cadaverina*, *H. regilla*, *Rana draytonii* y *Lithobates catesbeianus*, pero en dicho estudio no se analizaron datos correspondientes a las variables que pueden estar influyendo en la prevalencia o carga zoospórica de *Bd* en la región.

Diversos estudios han mostrado que algunas especies parecen ser portadoras tolerantes del hongo, y mantienen una infección subclínica (Daszak et al., 2004; Fisher y Garner et al., 2007). Estas especies se han identificado como causas probables de epizootias de *Bd* al diseminar el hongo en anfibios susceptibles (Cheng et al., 2011; Gervasi et al., 2013; Schloegel et al., 2012). En California, la rana de coro del Pacífico, *Hyliola regilla*, ha sido identificada como una posible especie de reservorio de *Bd*, por lo que se cree que puede estar jugando un rol importante en la diseminación del hongo (Padgett-Flohr y Hopkins, 2009).

La especie *Hyliola regilla*

Hyliola regilla conocida como la rana de coro del Pacífico (o rana de árbol del Pacífico), se distingue de otras ranas y sapos de la región por presentar

discos expandidos en la punta de los dedos, y por una banda ancha y oscura que se extiende desde justo antes del área de la fosa nasal, a través del ojo, y pasados el tímpano (Stebbins, 2003). Los adultos pueden alcanzar hasta 30-45 mm de largo; en promedio las hembras son más grandes que los machos (Bernard, 2005). Presenta una gran diversidad de patrones de coloración (Fig. 1), los más típicos son de color marrón y verde, pero en algunos casos presenta una coloración rojiza, gris oscuro, bronceada y cobre hasta verde lima brillante (Grismer y McGuire, 1993).

Hyliola regilla tiene una distribución geográfica que se extiende desde la Columbia Británica, Canadá (extremo norte), hasta el oeste de las Montañas Rocallosas (al este), y la península de Baja California, México como su límite sureño. En poblaciones de Baja California se presenta en altitudes de nivel del mar hasta los 2,050 msnm (Grismer, 2002). Mientras que en California ha sido encontrada hasta los 3,800 msnm (Matthews, K. R., et al 2001).

El hábitat de *H. regilla* incluye pradera, chaparral, bosques y tierras de cultivo. Es encontrada usualmente en vegetación baja cercana al agua. Se reproduce en lagos, pozas, reservorios y arroyos de bajo movimiento (Stebbins y Cohen, 1997). Actualmente la especie se encuentra categorizada como de preocupación menor en la lista roja de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza).

Hyliola regilla ha sido propuesta como un vector de dispersión de *Bd* en

la región del norte de California (Padgett-Flohr y Hopkins, 2009), ya que tiene una distribución más amplia que cualquier otra especie nativa a altas elevaciones (Jennings et al., 2016) y se reconoce como el anfibio más abundante en las zonas donde se encuentra.

Los estudios sobre la distribución y prevalencia de los portadores tolerantes a *Bd* son muy valiosos para los esfuerzos de conservación, ya que al contar con esta información podremos conocer el estatus de la infección en algunas de las poblaciones de anfibios en Baja California, y de esta forma evaluar el potencial de nuevos brotes epizooticos de la zona. El presente trabajo busca estudiar la prevalencia y carga zoospórica de *Bd* en la especie *Hyla regilla*, en tres localidades del noroeste de Baja California, a distintas elevaciones durante un año.

Hipótesis

Debido a que varios estudios han encontrado una correlación entre la incidencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) en ciertas especies de anfibios y la temperatura ambiental, se espera que la carga zoospórica y la prevalencia de infección en poblaciones de la rana *Hyla regilla* aumente en relación con las bajas temperatura presentes en el noroeste de Baja California.

Objetivo General

Determinar la prevalencia y carga zoospórica de *Batrachochytrium dendrobatidis* en la rana *Hyla regilla*, a través de un ciclo anual en tres poblaciones de distinta elevación del noroeste de Baja California.

Objetivos Particulares

- Determinar la prevalencia y carga de zoosporas del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* en la rana nativa *Hylola regilla* en tres localidades del noroeste de Baja California.
- Estimar la prevalencia y carga zoospórica del hongo *B. dendrobatidis* en la rana nativa *H. regilla* por localidad y temporada del año.
- Determinar si existe una relación de la carga zoospórica y prevalencia del hongo en los individuos de *H. regilla* recolectados a diferentes regímenes térmicos estacionales y altitudes en Baja California.

Metodología

Área de Estudio

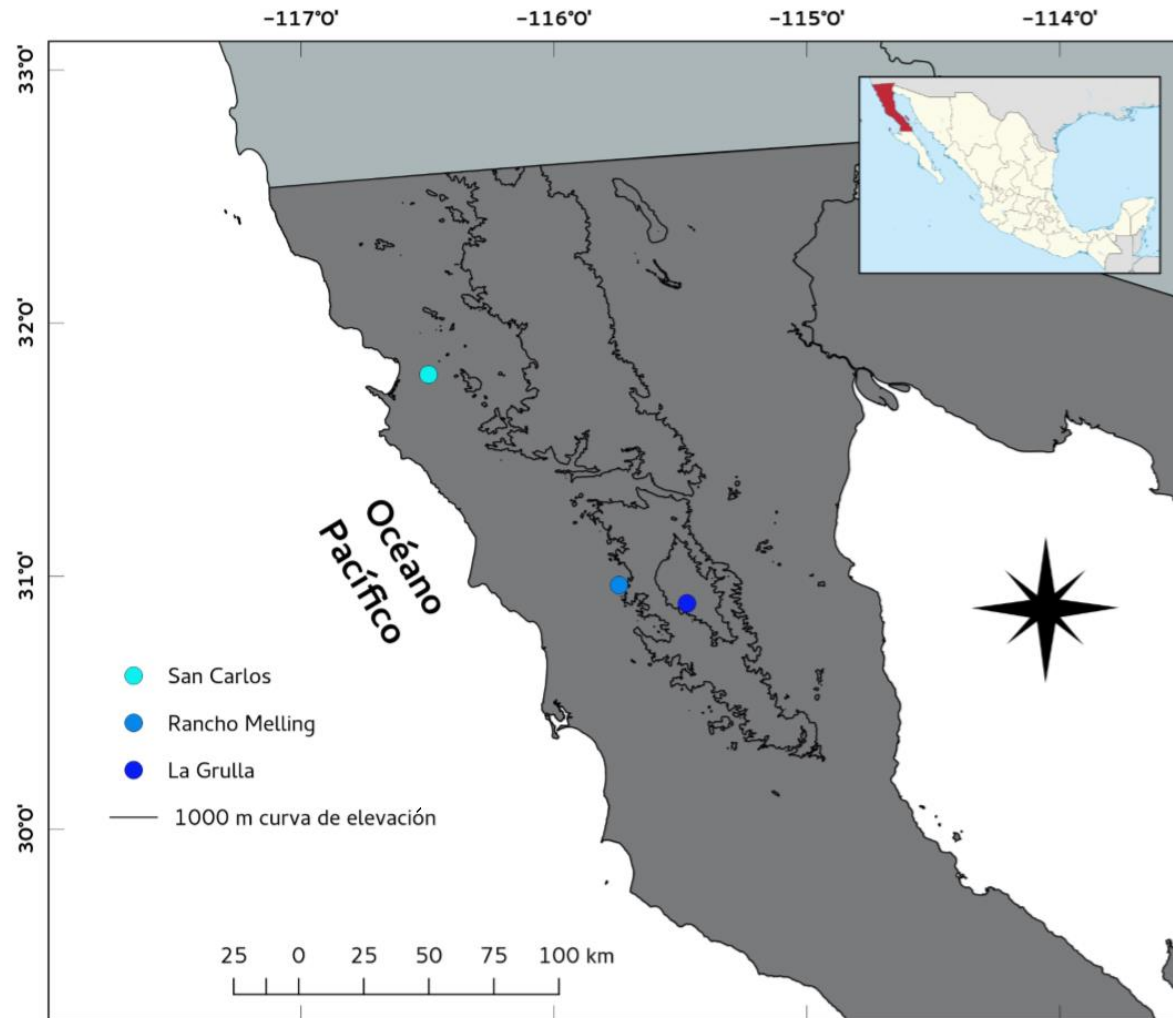
El muestreo de los individuos de *Hyliola regilla* (Figura 1) se realizó en pozas y arroyos localizados en tres sitios: 1) Campo Delicias, Arroyo San Carlos, localizado al noroeste de Baja California, México a 110 msnm, a aproximadamente 20 km del suroeste de Ensenada (31.796732°N, 116.495915°W) el cual cuenta con dos pozas artificiales que siguen el paso del Arroyo Maneadero (San Carlos). Durante la época de verano el nivel del agua descende y se llenan el resto del año, así mismo se ha detectado la presencia de rana toro exótica (*Lithobates catesbeianus*) (Ortíz-Serrato et al., 2014), y de las especies nativas *Anaxyrus boreas*, *Hyliola regilla* e *H. cadaverina* (Grismer, 2002); 2), Rancho Meling, localizado al pie de la Sierra de San Pedro Mártir a 625 msnm (30.964798°N, 115.742690°W). En dicho sitio el Arroyo San José corre en dirección oeste y a su paso se encuentran pozas naturales y artificiales con la presencia de anfibios tales como *Rana draytonii*, *Anaxyrus boreas*, *Anaxyrus californicus*, *Hyliola regilla* e *H. cadaverina* (Peralta-García et al., 2016), y en; 3), La Grulla localizada a una elevación de 2,050 msnm en el Parque Nacional Sierra San Pedro Mártir (30.892730°N, 115.474120°W), donde la presencia del hombre es remota pero se ve impactada por la actividad ganadera de la región. Este sitio cuenta con pozas naturales próximas al Arroyo La Grulla de mediana profundidad (15 a 200 cm; Ruiz-Campos, 1993) y la presencia de anfibios como *Rana draytonii*, *Anaxyrus boreas*, *Anaxyrus californicus*, *Hyliola cadaverina* e *Hyliola regilla* (Grismer, 2002). Estos cuerpos de agua poseen

valores de pH de 7.9 a 8.9, dureza total de 58 a 72 ppm, conductividad de 0.05 a 0.51 mS/cm, y oxígeno disuelto 3.7 a 7.2 mg/l (Ruiz-Campos, 2014).



Figura 1. Ejemplares de *Hyla regilla* encontradas en Rancho Meling en el mes de Marzo del 2016 (Fotografía por Jorge H. Valdez Villavicencio).

Figura 2. Localización de los sitios de recolecta de los individuos de *Hylola regilla* en el municipio de Ensenada, Baja California. Los símbolos indican los sitios de recolecta de los individuos.



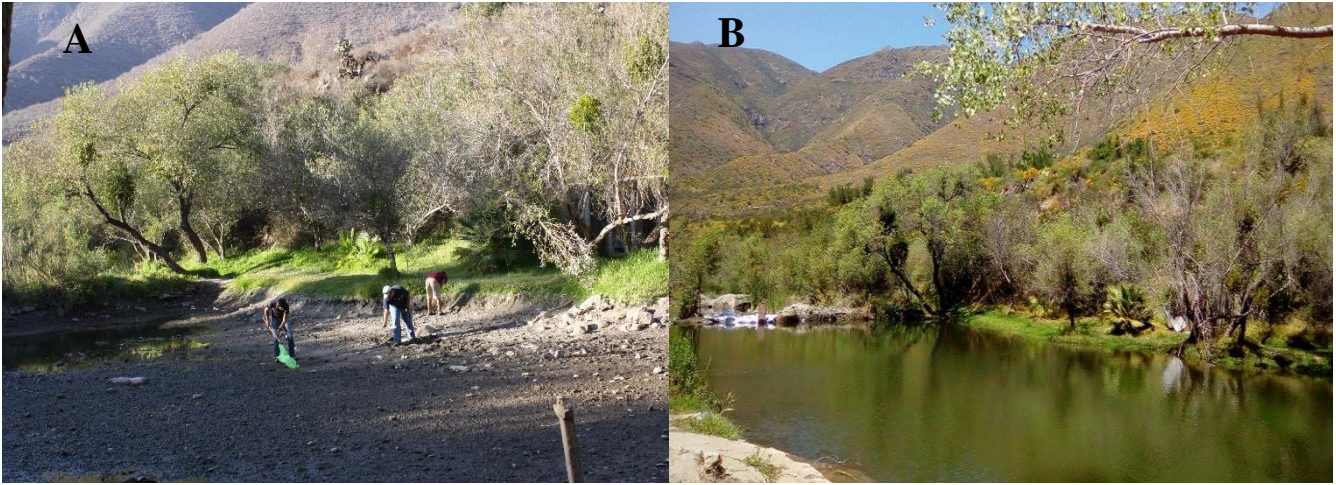


Figura 3. Sitio de recolecta San Carlos, Rancho " Campo Delicias " poza artificial (A) Mayo del 2016 (Fotografía por Carlos Flores), (B) Agosto del 2016 (Fotografía por Norma González)



Figura 4. Sitio de recolecta Rancho Meling, octubre del 2016. Zona de arroyo (Fotografía por Jorge H. Valdez)



Figura 5. Sitio La Grulla, Sierra San Pedro Mártir, una de las pozas de recolecta de individuos en el mes de noviembre del 2011. (Fotografía por Carlos Flores)

Toma de Datos

Se realizaron cuatro muestreos en los tres sitios de recolecta, uno por cada estación del año (diciembre 2015, abril 2016, agosto 2016 y octubre 2016). Durante cada muestreo se realizaron caminatas diurnas y nocturnas por zonas circundantes a las pozas de la zona. Los individuos adultos fueron capturados mediante la utilización de una red de cuchara de aproximadamente 2 metros de largo, y después colocados en bolsas de red, mientras que los renacuajos fueron colocados en bolsas con agua para mantenerlos vivos, intentado recolectar hasta un máximo de 30 organismos por muestreo.

Una vez capturados los individuos se procedió inmediatamente a la obtención del ADN del hongo mediante un frotis con un hisopo estéril utilizando el protocolo de Hyatt, et al., 2007, el cual consta de realizar exactamente 30 movimientos de frotis por individuo con el fin de permitir la comparación futura de la carga zoospórica (10 frotis en el abdomen, 10 frotis en las piernas y 10 frotis en las membranas interdigitales de las patas posteriores), en el caso de larvas, el frotis se realizó en las partes bucales. Los hisopos fueron colocados en tubos estériles de 1.5 mL con alcohol al 95% rotulados con un código de identificación. Una vez obtenido el frotis los individuos se liberaron a la zona donde fueron recolectados.

Los datos sobre la temperatura tanto superficial como del agua donde se

encontraban los individuos fueron registrados por un año mediante un registrador de temperatura marca HOBO modelo U23-003 "2 External temperature data logger". Estos fueron colocados en diferentes microhábitats donde habitan los anfibios tales como estanques y arroyos. Dichos aparatos recopilaron datos de temperatura del agua y del aire cada hora durante todo el estudio.

Trabajo de Laboratorio

Los frotis colectados en campo fueron procesados en la Universidad de California de Santa Bárbara, por la M.C. Andrea Adams (colaboradora del proyecto), mediante PCR de tiempo real.

El procedimiento para la extracción de ADN de los frotis inició por la adición de 40 microlitros de PrepMan Ultra (Applied Biosystems), en un tubo estéril rotulado, incubado a 100°C por 10 minutos. Los tubos fueron sometidos a centrifugación a 13,000xg por 3 minutos, y el sobrenadante fue extraído y colocado en un tubo nuevo y estéril de 1.5 mL. Las muestras fueron diluidas 1:10 con solución estéril de DNase-free 0.25X TE (Tris-EDTA). Siguiendo las reacciones de PCR y amplificación de parámetros de Boyle et al. (2014) el análisis de qPCR fue realizado en un sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems StepOnePlus™.

Se utilizaron controles positivos en cantidades de 100, 10, 1 y 0.1

zoosporas, corridos en cada plato por triplicados, en adición a tres controles negativos y ADN estándar de *Bd* desarrollado por Mary Toothman, de la Universidad de California, Santa Barbara, EE.UU. Los resultados del qPCR fueron multiplicados por 80 para obtener el total de zoosporas equivalente (ZE) por muestra de frotis y así considerar la dilución del extracto de *Bd* y calcular la cantidad de ADN de *Bd* por frotis.

Análisis de Datos

Se asignó un estado de infección positivo a cualquier rana en cuyo hisopo se detectó al menos un equivalente positivo de zoospora de *B. dendrobatidis*. Para graficar dichos datos estos fueron estandarizados por la función Logaritmo de 10, posteriormente fueron representados en diagramas de caja (Box-Plot) mediante la librería Rcmdr (Fox, 2005). La media zoospórica y desviación estándar, incluyendo límites de confianza fueron incluidos, obtenidos a partir del programa. Valores registrados menores a uno en ZE, fueron estandarizados a 0.

Los datos de temperatura fueron obtenidos extrayendo la media de las temperaturas tomadas durante el mes de recolecta y con el fin de determinar si existían diferencias significativas entre la temperatura de los sitios se realizó un análisis de varianza entre sitio por mes. Cabe mencionar que no se registraron valores de temperatura del agua en el periodo Marzo-Abril, debido a fallas que presento el HOBBO.

Los análisis realizados fueron realizados en el sistema estadístico R (R Development Core Team, 2008), con la aplicación de R Commander (Fox, 2005), y la librería Nortest (Gross y Ligges., 2012). Se extrajo síntesis numérica para la obtención de la desviación estándar y medias de los datos obtenidos.

La prevalencia de infección de *Bd* fue calculada a partir del porcentaje de individuos infectados (individuos infectados/número total de individuos*100), prevalencias por sitio y por temporada fueron obtenidos.

La prueba de normalidad Shapiro-Wilk (Royston, 1995) indicó valores no paramétricos para los datos de equivalente zoespórico (ZE) y prevalencia, y paramétricos para los valores de temperatura del agua y del aire; por lo que se utilizaron pruebas estadísticas adecuadas para cada caso.

A fin de evaluar una posible relación entre las variables de prevalencia versus altitud, temperatura del agua y del aire, se realizó una correlación no paramétrica de Spearman para cada situación. Para dichos análisis se tomaron los valores de prevalencia por mes de colecta entre los sitios (n=9). Se realizó además una prueba de regresión lineal utilizando las temperaturas registradas durante cada mes de muestreo y la correspondiente altitud de cada uno de los sitios por temporada de recaptura para evaluar una posible relación entre carga zoespórica y la variable de temperatura y altitud.

Resultados

Se muestrearon un total de 217 ejemplares en las 4 salidas de campo a lo largo de un año, se colectaron un total de 106 adultos, 60 juveniles, 42 metamórficos y 5 renacuajos, únicamente 4 individuos no fueron catalogados en su estadio de vida. Los resultados arrojaron una prevalencia general de 45.03% ($SD\pm 29.66$) con una media zoospórica de 1,489.04 ($SD\pm 6,488.29$). Se consideraron positivos los valores zoospóricos mayores a uno (>1), únicamente dos valores pertenecientes a San Carlos fueron modificados a cero.

Prevalencia por sitio

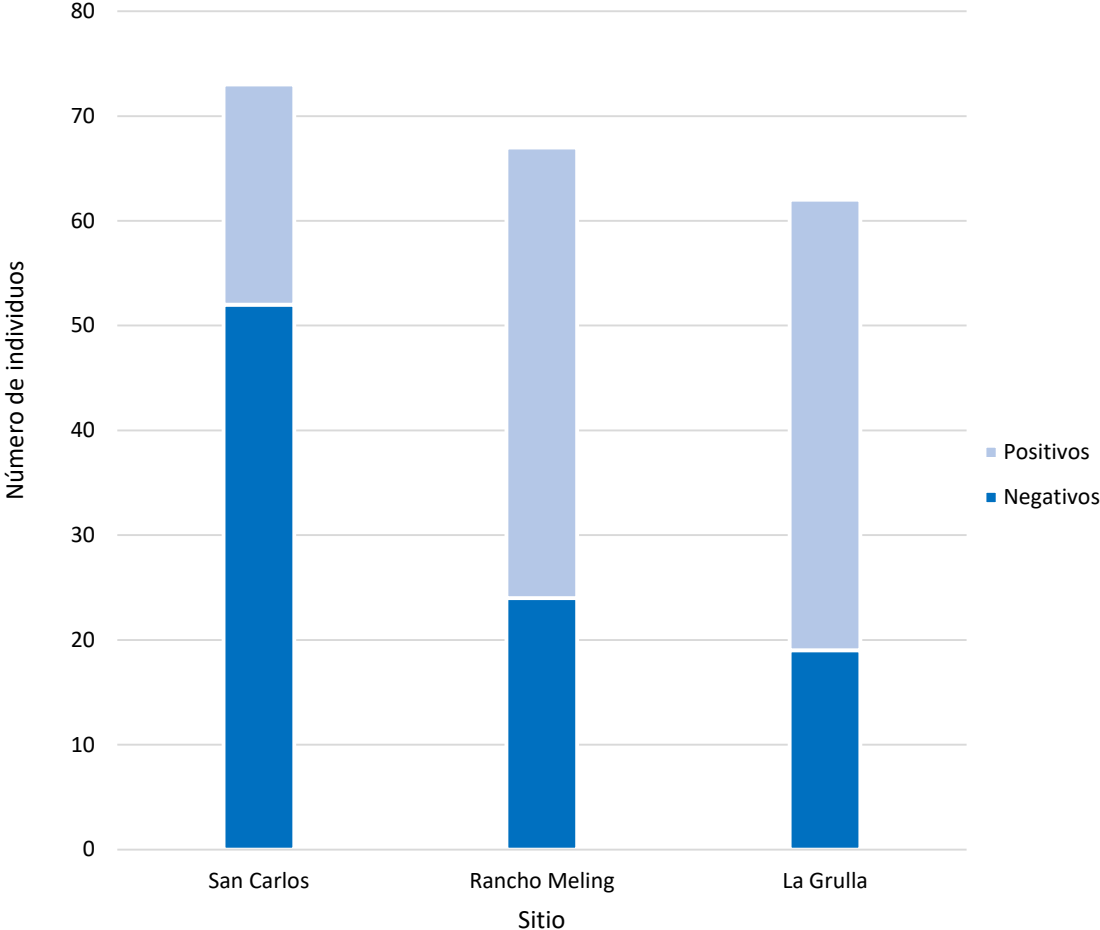


Figura 6. Número de individuos de *Hyliola regilla* infectados y no infectados para San Carlos, Rancho Meling y la Grulla, para los 4 meses de colecta.

El promedio de prevalencia de infección por *Bd* a través del año de muestreo fue mayor en La Grulla (2050 msnm), con un porcentaje de individuos infectados del 69.3% (SD±38.72), seguido del Rancho Meling (a 620 msnm), en donde el porcentaje de infección corresponde al 45.7%(SD±29.67); San Carlos (110 msnm), presenta el menor porcentaje de individuos infectados con 28.76% (SD±20.55). (figura 6, Tabla 1).

Tabla 1. Prevalencia de *Bd* en individuos de *Hyliola regilla* por sitio y por mes de colecta. Se indica el número de individuos (n), el número de individuos infectados (N inf.), prevalencia (%) y promedio de carga zoospórica (\bar{x}). NA (No aplica) indica que no se recolectaron datos.

Sitio	Mes	n	N inf.	%
San Carlos	Noviembre	22	1	4.5
	Abril	21	9	42.8
	Agosto	NA	NA	NA
	Octubre	30	11	36.6
	Total	73	21	\bar{x} 28.76
Rancho Meling	Noviembre	15	5	33.3
	Abril	20	9	45
	Agosto	17	3	17.6
	Octubre	30	26	86.9
	Total	67	43	\bar{x} 45.7
La Grulla	Noviembre	NA	NA	NA
	Abril	31	30	96.7
	Agosto	31	13	41.93
	Octubre	NA	NA	NA
	Total	62	43	\bar{x} 69.3
Totales		217	107	\bar{x} 45.03

Prevalencia por Temporada

En San Carlos, la prevalencia por infección de *Bd* mostró un mayor porcentaje en primavera, presentándose en el 42.8% de los individuos analizados, en tanto que, en invierno, mostró el valor más bajo, siendo este un 4.5%. En Rancho Meling el porcentaje más elevado de infección por *Bd* encontrado fue de 86.9% para el otoño, y 17.6% en verano. Por último, en La Grulla, para las temporadas de primavera y verano tienen un valor de 96.7% y 41.93%, respectivamente (Figura 7).

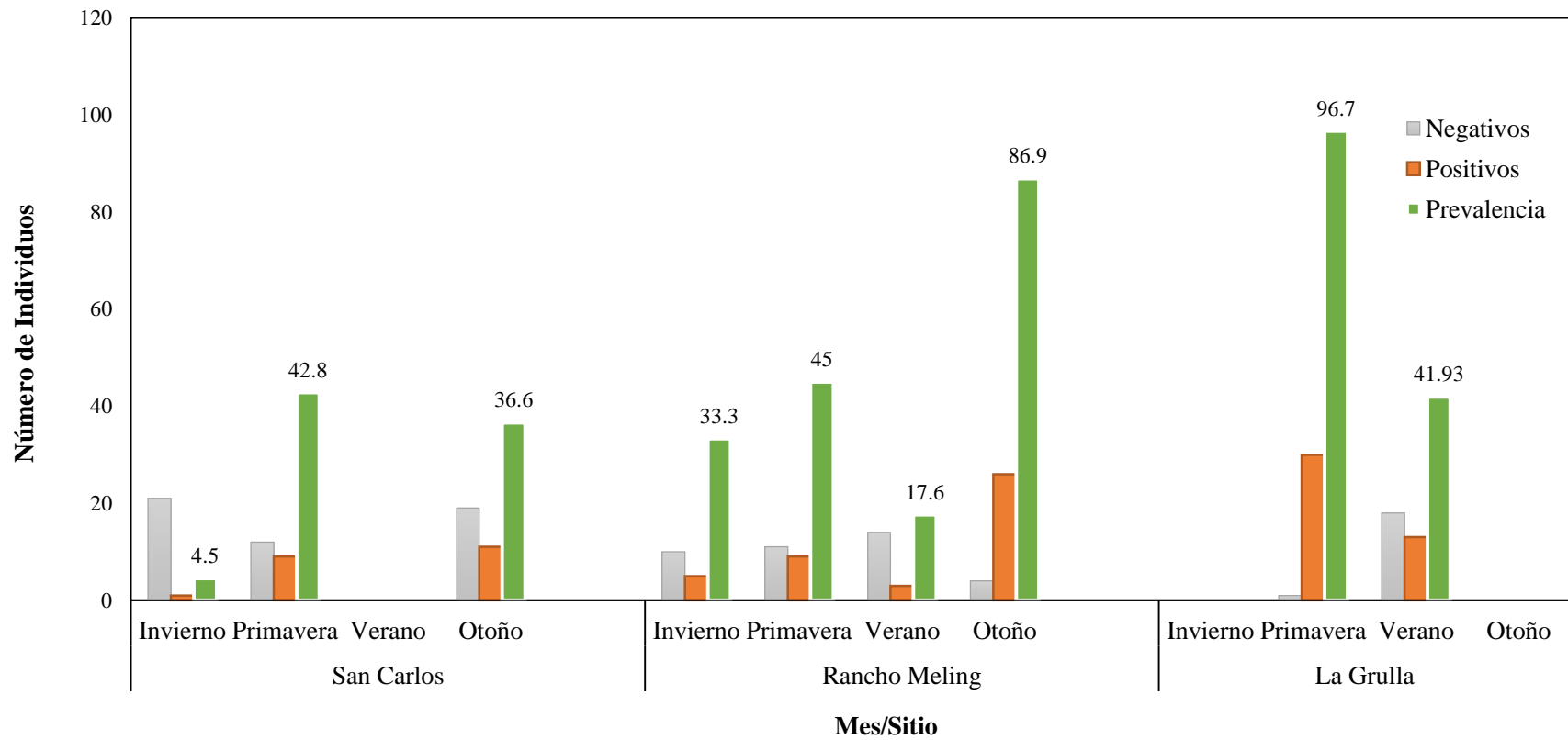


Figura 7. Gráfico de prevalencia de infección de *Bd* para los sitios San Carlos, Rancho Meling y La Grulla por temporada (invierno, primavera, verano y otoño) para cada uno.

Carga Zoospórica

La media zoospórica mostró valores elevados en Rancho Meling con un valor zoospórico medio de 2,502.54, seguido de La Grulla 1,295.43 y San Carlos 46.70. A su vez Rancho Meling arrojó uno de los valores más altos en relación con el mes de octubre con una carga media de 6,024.22, seguido del mes de Abril para la Grulla 2,438.48. Los valores más bajos fueron encontrados en San Carlos, en el mes de noviembre y octubre con un valor zoospórico de 2.72 y 52.68 respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de carga zoospórica de *Batrachochytrium dendrobatidis* en individuos de *Hyllola regilla*, en la que se muestra el número de individuos muestreados sobre número total de individuos (n inf/n), media zoospórica (XZE), desviación estándar (\pm DS) y la prueba estadística para datos no paramétricos Kruskal-Wallis (K-W). NA donde individuos de *H. regilla* no fueron encontrados. RM: Rancho Meling. Nov: noviembre.

Sitio	Altitud	Mes	n inf/n	XZE	\pm SD	K-W
San Carlos	110m	Nov.	01/21	2.72	\pm 12.76	P=0.699
		Abril	09/21	88.46	\pm 219.13	
		Agosto	NA	NA	NA	
		Octubre	11/31	52.68	\pm 214.15	
		Total	21/73	46.70	179.757	
RM	625m	Nov.	05/15	413.2	\pm 1465.65	P<0.001
		Abril	09/20	850.80	\pm 3340.45	
		Agosto	03/17	74.54	\pm 305.07	
		Octubre	26/30	6024.22	\pm 14636.8	
		Total	43/82	2502.54	9328.55	
La Grulla	2050m	Nov.	NA	NA	NA	P<0.001
		Abril	30/31	2438.48	\pm 5164.90	
		Agosto	13/31	152.37	\pm 404.80	
		Octubre	NA	NA	NA	
		Total	43/62	1295.43	3811.57	
Totales			207/107			

En San Carlos (110 m) las medias zoospóricas para el mes de noviembre fueron de 2.72, seguidos de abril con la carga zoospórica promedio más alta del sitio de 88.46, finalmente octubre arrojó un promedio zoospórico de 52.68. Las pruebas estadísticas no mostraron evidencia de una diferencia significativa entre los valores por meses de muestreo para dicho sitio.

Para Rancho Meling (625 msnm) los valores promedio zoospóricos fueron de 413.2, 850.80, 74.54 y 6,024.22 para los meses de noviembre, abril, agosto y octubre respectivamente. Dicho sitio presentó el valor zoospórico promedio más alto de los sitios con un valor de 2,502.54, seguido del mes de octubre con los valores elevados de todo el estudio. Los análisis estadísticos nos indican que para Rancho Meling (625m) existe una diferencia significativa entre los meses de noviembre, abril, agosto y octubre ($p > 0.01$).

Por último, en La Grulla (2050 m) para el mes de abril se obtuvo una media zoospórica de 2,438.48 y 152.37 para el mes de agosto, con una diferencia significativa entre dichos meses (figura 6) ($p < 0.01$).

Debido a que las cargas zoospóricas no mostraron diferencias significativas en el sitio San Carlos, los análisis estadísticos se basaron en los sitios Rancho Meling y La Grulla.

Se detectaron seis individuos (5.6%) de *H. regilla* que superaban los valores letales ($ZE < 10,000$), los dos más altos registrados en individuos de

Rancho Meling para el mes de octubre (Tabla3).

Tabla 3. Valores zoospóricos mayores a los valores letales ($ZE > 10,000$), donde se indica sitio, mes y carga zoospórica registrada (ZE).

Sitio	Mes	ZE
Rancho Meling	Octubre	34,625.06
	Octubre	57,734.80
	Octubre	50,169.90
	Octubre	11,944.03
La Grulla	Abril	24,841.04
	Abril	14,540.33

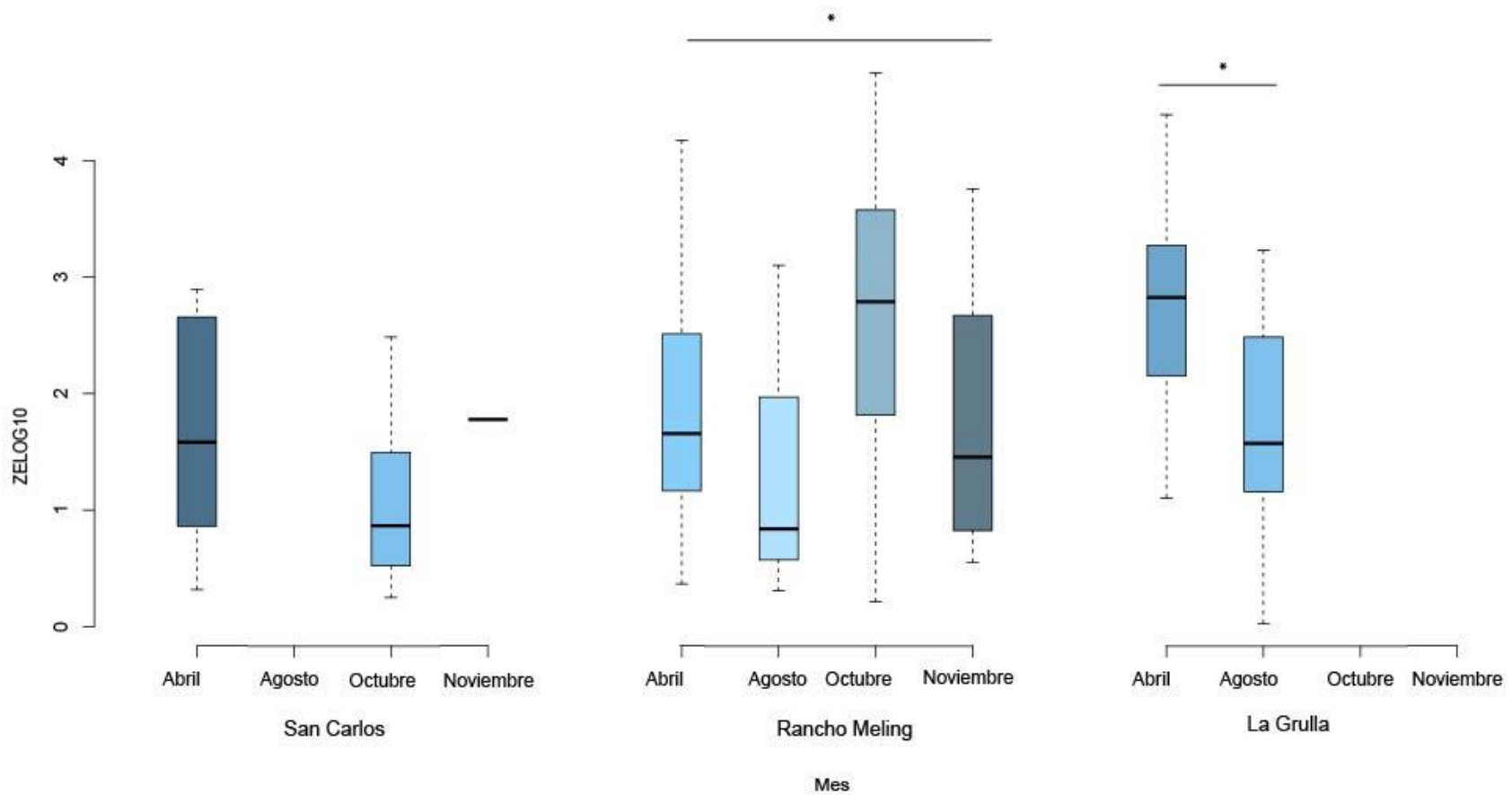


Figura 8. Valores de carga zoospórica (ZE Log10) Para los sitio de muestreo en San Carlos, Rancho Meling y la Grulla, durante los 4 meses de colecta. Se muestran los valores atípicos. * = $p < 0.01$ indica diferencias entre las temporadas para dicho sitio.

Temperaturas

San Carlos

Mediciones diarias revelaron que las temperaturas del aire varían de 1.9°C a 43.04 y las temperaturas del agua variaron de 8.86 a 41.38°C. Los meses más cálidos se presentaron en julio y agosto y los más fríos en diciembre y enero. La temperatura promedio del agua 18.69°C fue ligeramente más alta que el aire 18.01°C.

Rancho Meling

Para Rancho Meling las temperaturas del aire variaron de -4.71°C a 42.09°C y del agua de 6.17° a 27.75°C. Los meses más cálidos se dieron en los meses de julio y agosto y los más fríos en diciembre enero y febrero. La temperatura promedio del agua fue de 16.29°C, más alto que el promedio del aire 14.84°C ($P < 0.001$).

La Grulla

Las temperaturas del aire en La Grulla variaron de -14.62°C a 33.23°C, y en el agua de 3.88°C a 28.87. Los registros de las temperaturas indican que los meses más cálidos fueron en julio y agosto, los meses más fríos se presentaron en noviembre y diciembre. La temperatura del aire de 8.72°C presento una media más baja que la temperatura del agua 15.16°C ($P < 0.001$). En este sitio no se registraron datos para los meses enero a marzo debido a fallas con el equipo colector de datos.

Tabla 4. Temperaturas mínimas y máximas del agua de San Carlos, Rancho Meling y La Grulla durante noviembre 2015 y octubre 2016.

Mes	Sitio					
	San Carlos (110 m)		Rancho Meling (625 m)		La Grulla (2050 m)	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max
<i>Noviembre</i>	-	-	12.87	20.55	3.88	8.76
<i>Diciembre</i>	1.99	35.39	11.97	18.58	3.93	9.75
<i>Enero</i>	6.05	39.008	6.17	18.88	-	-
<i>Febrero</i>	5.23	40.11	11.95	18.88	-	-
<i>Marzo</i>	6.99	31.79	12.65	20.007	-	-
<i>Abril</i>	9.80	43.04	12.82	21.27	9.85	26.42
<i>Mayo</i>	17.48	22.84	13.40	24,.02	9.97	18.74
<i>Junio</i>	11.75	28.69	14.12	27.55	13.18	22.27
<i>Julio</i>	12.36	29.38	12.87	27.75	11.56	26.08
<i>Agosto</i>	13.13	35.07	16.17	27.75	9.60	28.86
<i>Septiembre</i>	10.90	37.81	15.46	23.23	8.96	19.27
<i>Octubre</i>	12.001	36.36	15.46	23.23	8.96	14.55

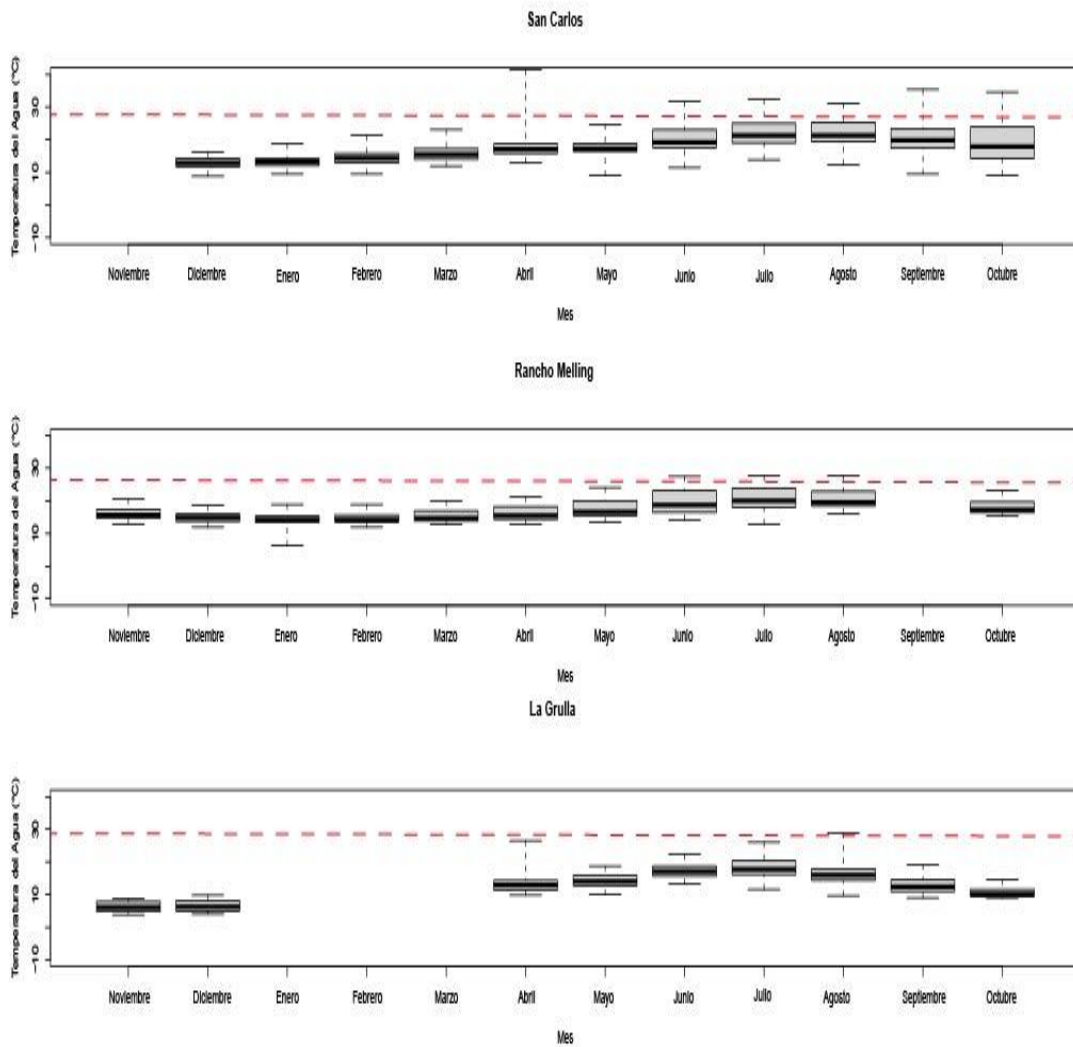


Figura 9. Temperaturas del agua de los sitios de muestreo a lo largo de un año, noviembre del 2015 a octubre 2016. De arriba abajo, San Carlos, Rancho Meling y la Grulla. Se muestra línea a 28°C.

Tabla 5. Temperaturas mínimas y máximas del aire de San Carlos, Rancho Meling y La Grulla durante noviembre 2015 y octubre 2016.

Mes	Sitio					
	San Carlos (110 m)		Rancho Meling (625 m)		La Grulla (2050 m)	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max
<i>Noviembre</i>	-	-	-2.27	34.12	-9.91	10.05
<i>Diciembre</i>	8.86	16.27	-4.71	30.92	-14.62	18.22
<i>Enero</i>	9.55	18.69	-3.86	31.28	-12.01	15.79
<i>Febrero</i>	9.43	21.36	-3.03	32.04	-14.43	20.07
<i>Marzo</i>	11.97	23.08	-0.22	35.95	-9.33	19.12
<i>Abril</i>	13.81	41.38	1.34	24.00	-5.17	26.03
<i>Mayo</i>	8.99	24.67	1.88	29.79	-3.95	20.88
<i>Junio</i>	11.49	31.74	4.55	40.86	2.93	23.37
<i>Julio</i>	13.88	32.33	6.15	42.09	6.76	25.42
<i>Agosto</i>	12.38	31.17	6.56	35.18	-0.90	33.23
<i>Septiembre</i>	9.55	35.42	4.15	37.17	-1.58	28.51
<i>Octubre</i>	9.08	34.67	0.218	37.17	3.32	22.84

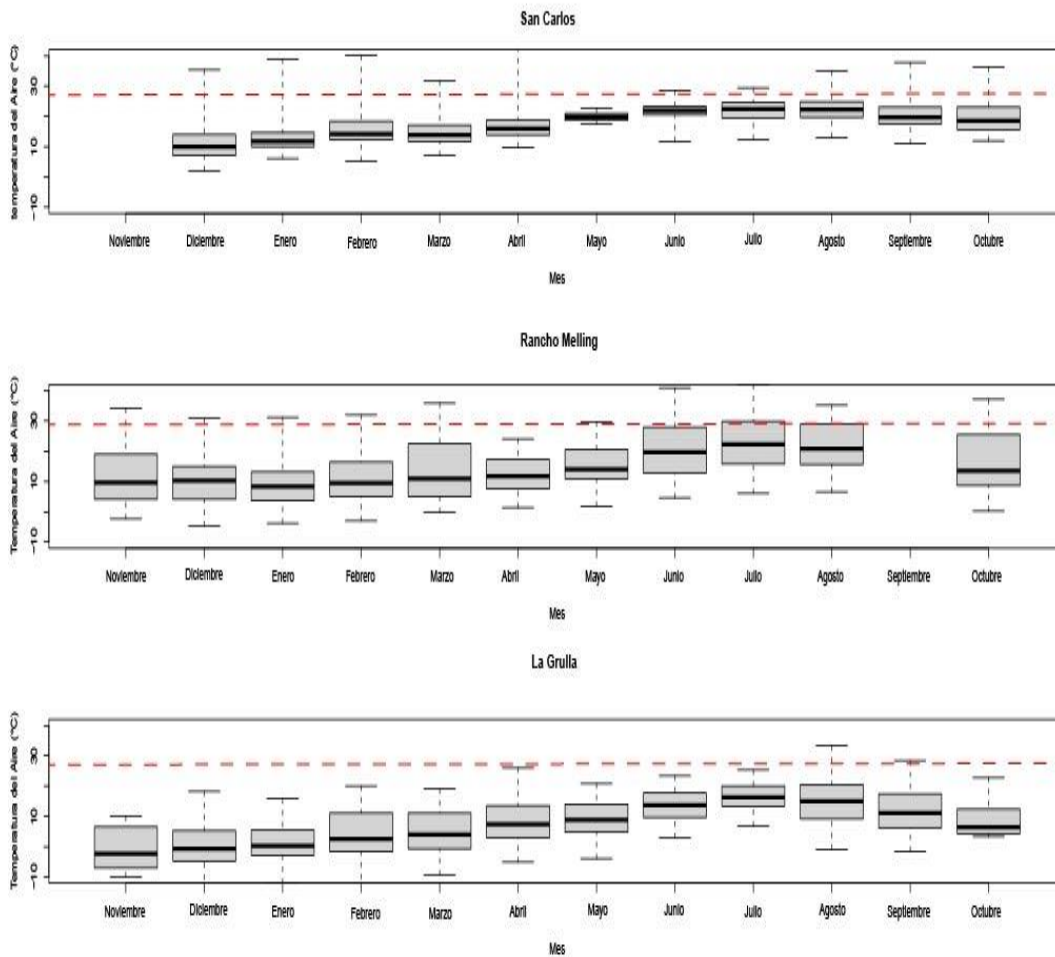


Figura 10. Temperaturas del agua de los sitios de muestreo a lo largo de un año, noviembre del 2015 a octubre 2016. De arriba abajo, San Carlos, Rancho Meling y la Grulla. Se muestra línea a 28°C.

Correlación entre variables

Prevalencia

Resultados del análisis de correlación de Spearman indican una relación positiva entre la prevalencia por mes de muestreo y la altitud de los sitios muestreados ($p < 0.001$, $\rho = 0.40$).

En adición, existe una relación significativa de la prevalencia con la temperatura del agua ($p < 0.01$, $\rho = -0.24$) y la temperatura del aire, pero esta última con una relación inversamente proporcional ($p < 0.001$, $\rho = -0.59$).

Carga Zoospórica

Resultados de la regresión lineal no demostraron una correlación significativa entre las variables descarga zoospórica y altitud ($p=0.7836$, Figura 10).

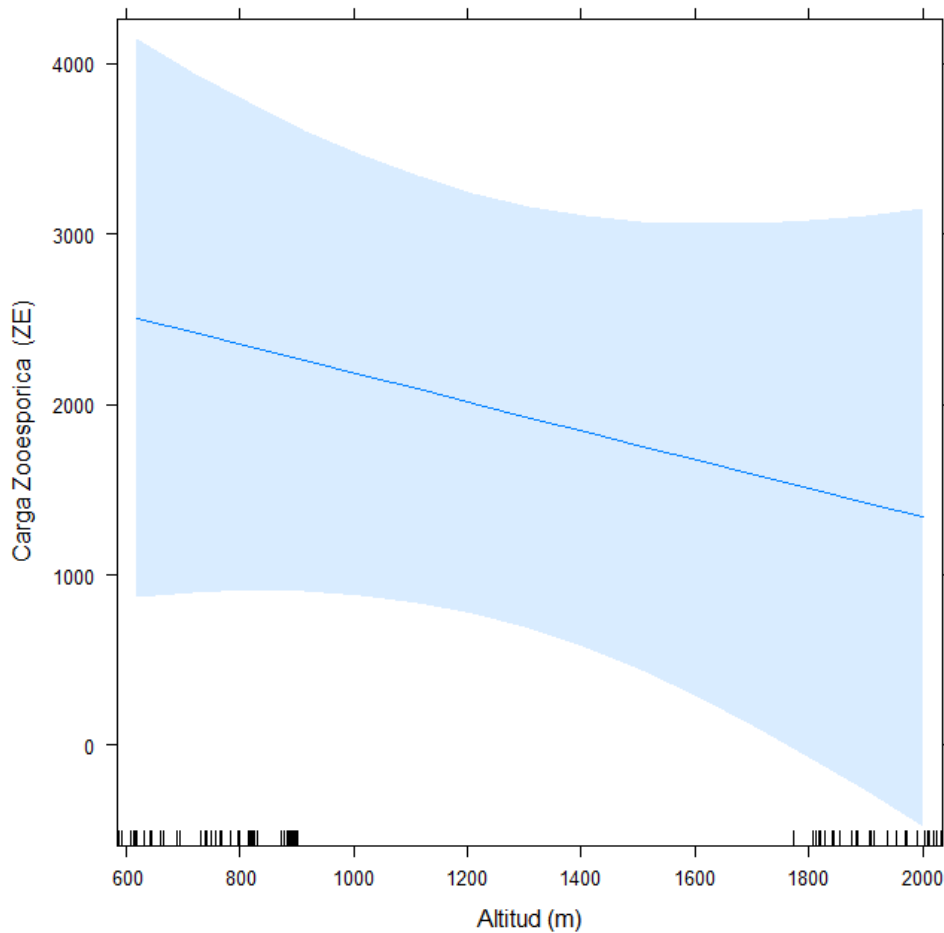


Figura 11. Diagrama de dispersión de las variables altitud y carga zoospórica, en la cual se ilustra la línea de tendencia y el área sombreada la desviación estándar.

Valores no significativos de la regresión lineal fueron mostrados para las variables carga zoospórica y la temperatura del agua ($p= 0.857$, Figura 11).

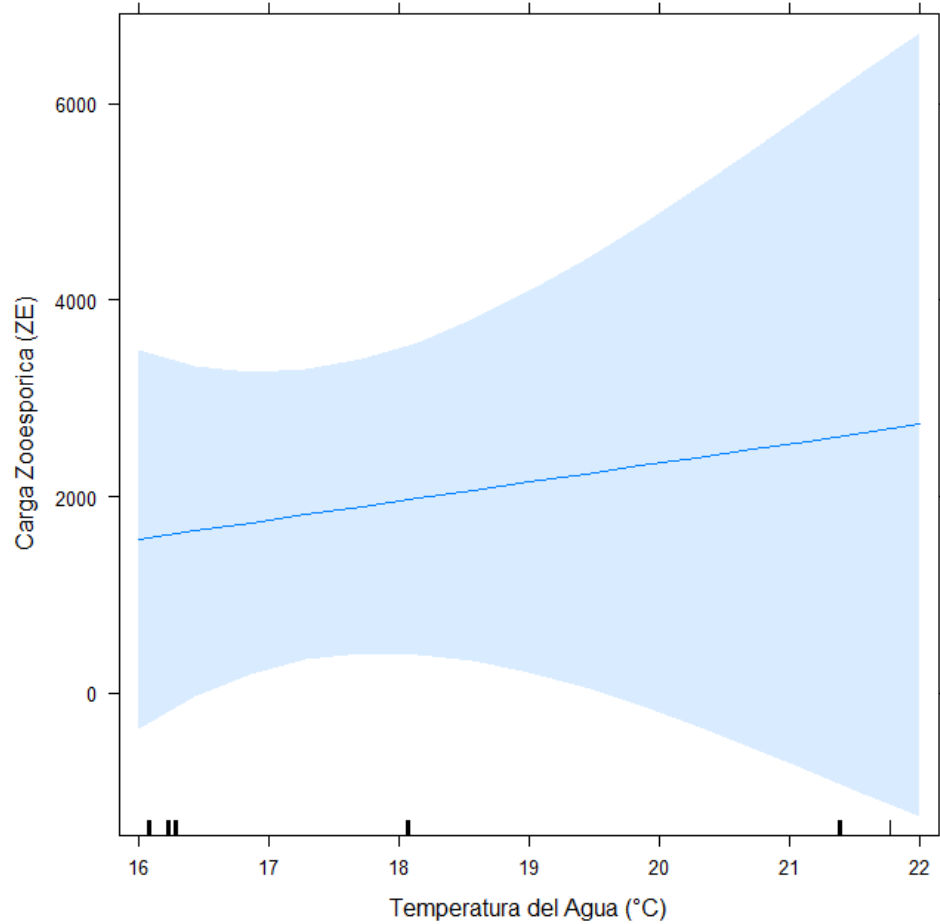


Figura 12. Diagrama de dispersión de las variables temperatura del agua y carga zoospórica, en la cual se ilustra la línea de tendencia y el área sombreada la desviación estándar.

Por otro lado, entre las variables carga zoospórica y temperatura del aire, los resultados indican una relación no significativa ($p=0.415$, Figura 12).

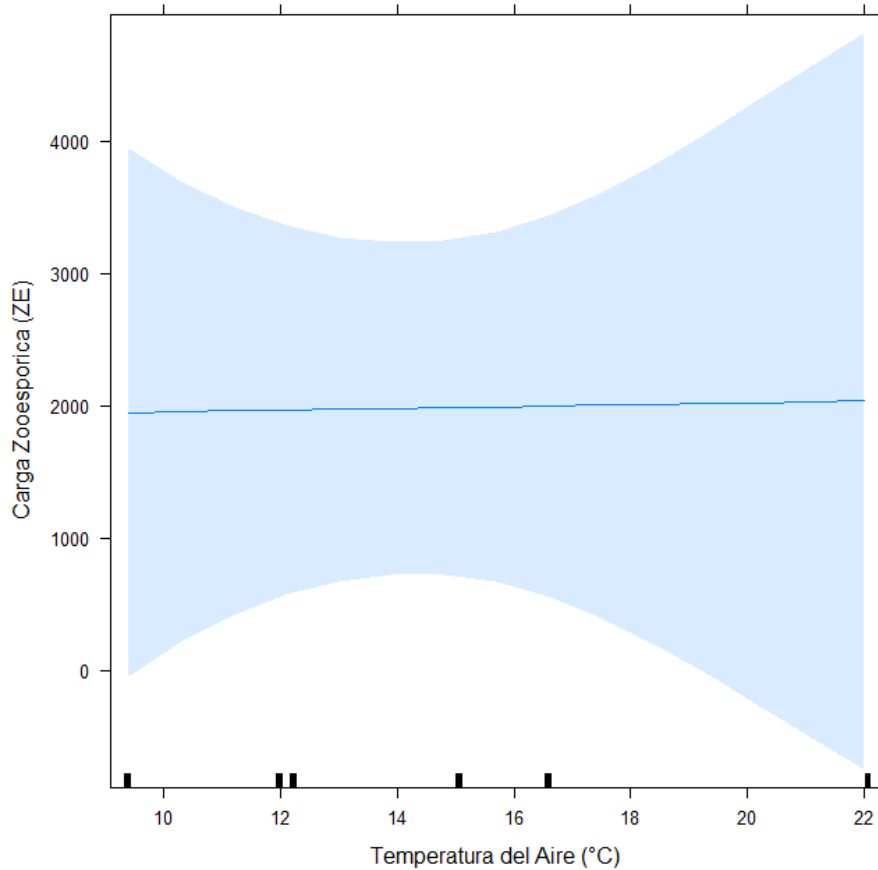


Figura 13. Diagrama de dispersión de las variables temperatura del aire y carga zoospórica, en la cual se ilustra la línea de tendencia y el área sombreada la desviación estándar.

Discusiones

Prevalencia

Los resultados encontrados en este estudio sobre la carga zoopsórica y prevalencia del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) en la rana reservorio *Hyliola regilla* en tres sitios del noroeste de Baja California, indican que existen diferencias significativas en la prevalencia de infección por el hongo en relación con la altitud, temperatura del agua y del aire. Se encontró que la prevalencia fue mayor en sitios de mayor elevación (Figura 10) y con respecto a la temperatura del agua y del aire, ambos indican que las mayores prevalencias son encontradas a menores temperaturas (Fig. 13, 15). Los valores elevados de prevalencia en sitios de mayor altitud es un patrón que se ha venido observando globalmente (Kriger et al., 2007; Lips et al., 2004; Retallick et al., 2004), al igual que a temperaturas frías (Kriger y Hero, 2008); ya que se ha reportado que la prevalencia e intensidad de infección por Bd incrementa en los meses más fríos (Ouellet et al., 2005; Woodhams y Alford 2005; Kriger y Hero 2007).

La prevalencia promedio de infección por *Bd* en individuos de *Hyliola regilla* fue de un 45.03% (\pm DE 29.66). Dichos resultados son congruentes con registros anteriores de 40.5% en otros ecosistemas del norte de Baja California (Peralta-García, 2017). Estudios en California Central han reportado prevalencias de 0 a 35% en el año 2009 (Padgett-Flohr y Hopkins, 2009), en el año 2011 se realizaron muestreos que indican un aumento en las prevalencias de

dicha zona; Cuenca Olema (79.6%), Cuenca Bridalveil (20.7) y Cuenca Dana (30%) (Fellers et al., 2011). Estos intervalos son similares a los encontrados en este estudio (54%). En el valle de La Grulla obtuvimos una prevalencia de 96.7% en el mes de abril, con una media zoospórica de 152.37, lo cual se asemeja a lo reportado por Peralta-García (2017) para la especie *Rana draytonii* en esta misma localidad en 2014, con valores de prevalencia y media zoospórica de 92% y 195, respectivamente. La especie de reservorio que aquí nos ocupa tiene una alta resistencia a la patología asociada a la infección por Bd (Padgett-Flohr y Lohr, 2008). La condición de tener altos valores de Bd implicará un gran riesgo para especies simpátricas, ya que al entrar en contacto con tales cargas pondría afectar a las poblaciones de otras especies de anfibios no tolerantes.

Cargas zoospóricas

Parte de la hipótesis planteada es descartada debido a que los valores de cargas zoospóricas no indicaron una relación dependiente con las variables de altitud, temperatura del aire o agua. Los análisis de correlación mostraron resultados no significativos ante tales relaciones. Se esperaría que debido a la aparente correlación observada entre prevalencia de infección por Bd y los sitios de mayor altitud, que la misma relación se observaría con las cargas zoospóricas. Sin embargo se observó que en Rancho Meling (625 msnm) hubo una media de carga zoospórica más alta ($2502.54 \pm DE9328.55$), a aquellos valores registrados en el sitio de mayor altitud (La Grulla, $1295.43 \pm DE 3811.57$). Esa misma

ausencia de correlación de las cargas zoospóricas fue observado con las temperaturas del agua y aire (Fig. 13, 15), lo cual podría indicar que existen otros factores que están actuando en la ecología de la carga zoospórica de *Hyliola regilla*.

Con anterioridad Peralta-García (2017) encontró una relación significativa entre los valores de carga zoospórica y la altitud en poblaciones de *Rana draytonii* en Baja California. En dicho estudio, los valores zoospóricos elevados fueron observados en primavera pero decayendo en verano, mientras que en este estudio no se puede indicar la temporada donde se presentaron los mayores promedios de cargas zoospóricas, debido a que hubo sitios que no disponen de datos completos. El único sitio que exhibió un pico de aumento de la temperatura fue el Rancho Meling, durante el mes de octubre (otoño).

Un 5.6% de los individuos infectados arrojó valores zoospóricos letales, lo cual nos indica que *Bd* continúa estable en las poblaciones de *Hyliola regilla*. Los valores más altos registrados en este estudio fueron de 57,734.8 en la localidad del Rancho Meling en el mes de octubre, las más altas registradas a la fecha en las poblaciones de Baja California y no parecen tener efecto en *Hyliola regilla* (Vredenburg et al., 2010). No es la primera vez que *H. regilla* no muestra reacción ante exposición experimental a *Bd* (Blaustein et al., 2005, Garner et al., 2006).

Cabe mencionar que la cantidad de datos colectados no revelan un coeficiente de asociación indicativo de una relación fuerte ($\rho < 1$), dichas

relaciones se verían enriquecidas por el aumento de muestreos para determinar el grado en la cual estas variables juegan un papel en las cargas zoospóricas de *Bd*, a pesar de eso, no se descarta la posibilidad que una o múltiples variables ambientales influyan en los valores zoospóricos de *Bd*. Con el tiempo se conoce que la susceptibilidad de la especie juega un papel importante en determinar si la prevalencia o la concentración de cargas zoospóricas elevadas jugaran un papel importante en la especie.

En complemento se realizó un análisis para determinar una posible relación entre los valores de carga zoospórica y prevalencia. Dichos análisis demostraron que a mayor prevalencia se presentaban cargas zoospóricas elevadas, lo que abre la posibilidad de que el intervalo altitudinal en el cual las muestras fueron tomadas no era lo suficientemente amplio para que se detectaran los efectos de la altitud en las cargas zoospóricas. En lo que concierne a las temperaturas (tanto del agua y aire) se considera poco probable que los datos tomados fueran escasos.

Comportamiento observado en *Hyla regilla*

En el estado de California estudios previos han considerado a *Hyla regilla* como un vector para *Bd*, incluso superior a otros anuros como *Xenopus laevis* o *Lithobates catesbeianus* (Padgett-Flohr y Hopkins, 2009). Este estudio

corroborar esta observación de *H. regilla*, ya que presenta cargas zoospóricas elevadas de *Bd*, no obstante permanece asintomática al no mostrar un incremento de mortalidad como resultado a la exposición de *Bd* (García et al., 2006), que a diferencia de otras especies susceptibles aceleran su desarrollo larval en respuesta al incremento del riesgo (Romansic et al., 2011). Cargas zoospóricas reportadas en individuos de la rana toro *Lithobates catesbeianus*, la cual es catalogada como vector en Baja California, alcanzan un valor promedio zoospórico de 221.80, en tanto que la rana africana *Xenopus laevis* no resultó positiva para infección de *Bd* (Peralta-García 2017). Lo anterior resalta la importancia de mantener monitoreados los valores de carga zoospórica de *Bd* en Baja California, ya que efectivamente *Hyliola regilla* parece estar jugando un papel de reservorio y vector de *Bd*.

El Arroyo San Carlos cuenta con la presencia del anfibio exótico *Lithobates catesbeianus* y este factor podría influir en cómo se comporta la especie nativa en dicho sitio, ya que varios estudios proponen que la depredación y competencia podrían influir en los valores de *Bd* (Blaustein et al., 2002; Relyea, 2003). Por otro lado, en otros estudios *H. regilla* no parece ser afectada por la presencia de *L. catesbeianus* (Govindarajulu, 2004; Kupferberg, 2017), por lo que recomendaría evaluar más de cerca los valores de carga zoospórica en ambas especies y determinar si existe una relación que podría estar afectando directamente los valores de *Bd* en *H. regilla*.

Estudios anteriores indican que las poblaciones de anfibios en la región

de Baja California están presenciando un estado post-epizootico (Lips, et al., 2004), en donde los declives relacionados a *Bd* ya han pasado en la región. Sin embargo, se requiere de investigación molecular para determinar la antigüedad y linaje de *Bd* en Baja California y ver si se trata de un evento reciente y con futuro a desarrollar eventos fatales epizooticos o si estamos evidenciando un estado post-epizootico como en la mayoría de los casos (Berger et al., 1998; Voyles et al., 2009). Determinar las características del linaje filogenético de *Bd* en Baja California nos ayudaría a comprender lo alcances o debilidades a lo que los anfibios se enfrentan, más cuando se he demostrado que las características de la misma juegan un papel en la respuesta del individuo afectado (Antwis y Weldon, 2017).

Temperatura

Batrachochytrium dendrobatidis tiene la tasa de crecimiento más alta a temperaturas entre 17 y 25 ° C, pero puede crecer y reproducirse a temperaturas que oscilan entre 4 y 25°C, lo que le permite sobrevivir en huéspedes en brumación (Johnson et al., 2004).

En este estudio se reportaron temperaturas que van desde -14 a 33°C en La Grulla, de -4 a 42°C en el Rancho Meling y de 1.9 a 43°C en San Carlos. Este amplio intervalo de temperatura puede estar afectando directamente el desarrollo del hongo en individuos de *Hyliola regilla*. Ya que por un lado se observó que en San Carlos (el sitio más caluroso) las concentraciones se mantuvieron bajas en comparación con Rancho Meling y La Grulla, los cuales presentaron las

temperaturas más bajas. No obstante, no se encontraron patrones de relación entre la carga zoospórica de *Bd* y la temperatura, aun reportando que las temperaturas rebasan los límites de 28°C, temperaturas que impiden el crecimiento de *Bd*.

Dentro de la región de Baja California, las fluctuaciones ambientales estacionales indican tener consecuencias importantes para el desarrollo de la enfermedad; la estacionalidad climática tan única de los sitios influye en el crecimiento de *Bd*. Observamos que las temperaturas presentes en San Carlos se encuentran muy cercanas o sobrepasan en algunos casos la temperatura letal del hongo, la cual mantiene los valores promedios de carga zoospórica bajos a lo largo del año. Por otro lado Rancho Meling y La Grulla nos ofrecen promedios elevados de carga zoospórica ya que ofrecen temperaturas que favorecen los requerimientos térmicos del hongo.

Finalmente aunque no se han reportado muertes de anfibios por *Bd* en estas localidades, se hipotetiza que esto es debido a la carencia de monitoreos continuos de las poblaciones de anfibios, ya que las muertes son eventos abruptos y con baja probabilidad de ser observados, especialmente en sitios remotos de regiones poco visitadas (i.e. valle de La Grulla).

Conclusiones

- La temperatura del aire y del agua condicionados por procesos adiabáticos en función de la altitud de los sitios de muestreo, reflejan una relación con los valores de prevalencia de *Bd* en las poblaciones muestreadas de *Hyliola regilla* en el noroeste de Baja California. Lo cual nos indica una mayor prevalencia de infección de *Bd* en climas fríos y poblaciones de mayor altitud.
- la altitud o temperatura del agua o del aire no influyeron en los niveles de cargas zoospóricas.
- Una prevalencia elevada en individuos de *Hyliola regilla* infectados con *Bd* fueron encontrados en La Grulla, sin embargo, en Rancho Meling se presentaron las cargas zoospóricas promedio más elevadas del estudio.
- La especie *Hyliola regilla* arrojó valores similares de prevalencia de infección de *Bd* en localidades pertenecientes a Baja California y parte de California.

Recomendaciones

En Baja California aún faltan muchos estudios para esclarecer el papel de *Bd* en los anfibios de la región, de entre los cuales recomiendo:

- Determinar las características del linaje filogenético actualmente circulando en Baja California mediante herramientas moleculares, dado que se ha reportado variabilidad en la patogenicidad de la infección asociado a los linajes genéticos de *Bd*.
- Determinar el papel que juega *Hyla regilla* con *Bd* con base en los factores abióticos en localidades a lo largo de la península, tales como humedad y por otro lado la introducción de exóticos y vegetación.
- Evaluar la relación entre la infección por *Bd* ante otras especies de anfibios distribuidos a lo largo de la península de Baja California y determinar el grado de afectación por diversos factores bióticos o abióticos que pueden estar interactuando.
- Monitoreo continuo de *Bd* sobre las especies de anfibios localizadas a mayores elevaciones.

Literatura citada

- Adams, A. J., Kupferberg, S. J., Wilber, M. Q., Pessier, A. P., Grefsrud, M., Bobzien, S., ... & Briggs, C. J. (2017). Extreme drought, host density, sex, and bullfrogs influence fungal pathogen infection in a declining lotic amphibian. *Ecosphere*, 8(3).
- Antwis, R. E., y Weldon, C. (2017). Amphibian skin defences show variation in ability to inhibit growth of *Batrachochytrium dendrobatidis* isolates from the Global Panzootic Lineage. *Microbiology*, 163(12), 1835-1838.
- Bakar, A. A., Bower, D. S., Stockwell, M. P., Clulow, S., Clulow, J., y Mahony, M. J. (2016). Susceptibility to disease varies with ontogeny and immunocompetence in a threatened amphibian. *Oecologia*, 181(4), 997-1009.
- Berger, L. (2001). Diseases in Australian frogs (Doctoral dissertation, James Cook University).
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A. A., Goggin, C. L., Slocombe R., Ragan M. A, Hyatt A. D., McDonal K. R., Hines H. B. Lips K. R., Marantelli G. Y Parkes H. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15), 9031-9036.
- Berger, L., Speare, R., Hines, H. B., Marantelli, G., Hyatt, A. D., McDonald, K. R., Skerrati L. F., Olsen V., Clarke J. M.M Gillspie G., Mahony, M., Sheppard N., Williams C. y Tyler M. J. (2004). Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Australian Veterinary Journal*, 82(7), 434-439.

- Bernard, M. 2005. "Natural History of the Pacific Chorus Frog *Pseudacris regilla*" (Online). Accessed Agosto 01, 2017 at <http://www.mistertoad.com/PacificTreeFrog.html>.
- Blaustein, A. R., y Kiesecker, J. M. (2002). Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology letters*, 5(4), 597-608.
- Blaustein, A. R., Romansic, J. M., Scheessele, E. A., Han, B. A., Pessier, A. P., y Longcore, J. E. (2005). Interspecific variation in susceptibility of frog tadpoles to the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology*, 19(5), 1460-1468.
- Blaustein, A. R., Wake, D. B., y Sousa, W. P. (1994). Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation biology*, 8(1), 60-71.
- Bradley, P. W., Brawner, M. D., Raffel, T. R., Rohr, J. R., Olson, D. H., y Blaustein, A. R. (2017). Shifts in temperature influence how *Batrachochytrium dendrobatidis* infects amphibian larvae. *bioRxiv*, 165985.
- Bosch, J., Martínez-Solano, I., y García-París, M. (2001). Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological conservation*, 97(3), 331-337.
- Bradley, G. A., Rosen, P. C., Sredl, M. J., Jones, T. R., y Longcore, J. E. (2002). Chytridiomycosis in native Arizona frogs. *Journal of wildlife diseases*, 38(1), 206-212.
- Brem, F. M., y Lips, K. R. (2008). *Batrachochytrium dendrobatidis* infection patterns among Panamanian amphibian species, habitats and elevations during epizootic

- and enzootic stages. *Diseases of aquatic organisms*, 81(3), 189-202.
- Burrowes, P. A., Joglar, R. L., y Green, D. E. (2004). Potential causes for amphibian declines in Puerto Rico. *Herpetologica*, 60(2), 141-154.
- Campbell, C. R., Voyles, J., Cook, D. I., y Dinudom, A. (2012). Frog skin epithelium: electrolyte transport and chytridiomycosis. *The international journal of biochemistry and cell biology*, 44(3), 431-434.
- Cheng, T. L., Rovito, S. M., Wake, D. B., y Vredenburg, V. T. (2011). Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(23), 9502-9507.
- Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A. A., Hyatt, A. D., Green, D. E., y Speare, R. (1999). Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging infectious diseases*, 5(6), 735.
- Daszak, P., Strieby, A., Cunningham, A. A., Longcore, J. E., Brown, C. C., y Porter, D. (2004). Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetological Journal*, 14, 201-208.
- Daszak, P., Cunningham, A. A., y Hyatt, A. D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *science*, 287(5452), 443.
- Dowell, S. F. (2001). Seasonal variation in host susceptibility and cycles of certain infectious diseases. *Emerging infectious diseases*, 7(3), 369.
- Farrer, R. A., Weinert, L. A., Bielby, J., Garner, T. W., Balloux, F., Clare, Bosh J., Cunningham A. A., Weldon C., Preez L. H., Anderson, L., Kosakovsky P., Shahar-Golan R., Henk D. A. y Fisher M. C. (2011). Multiple emergences of

- genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(46), 18732-18736.
- Fellers, G. M., Cole, R. A., Reinitz, D. M., & Kleeman, P. M. (2011). Amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in coastal and montane California, USA anurans. *Herpetological Conservation and Biology*, 6(3), 383-394.
- Fisher, M. C., y Garner, T. W. (2007). The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biology Reviews*, 21(1), 2-9.
- Frías-Alvarez, P., Vredenburg, V. T., Familiar-López, M., Longcore, J. E., González-Bernal, E., Santos-Barrera, G., Zambrano L. y Parra-Olea, G. (2008). Chytridiomycosis survey in wild and captive Mexican amphibians. *EcoHealth*, 5(1), 18-26.
- Frías-Alvarez, P., Zúniga-Vega, J. J., y Flores-Villela, O. (2010). A general assessment of the conservation status and decline trends of Mexican amphibians. *Biodiversity and Conservation*, 19(13), 3699-3742.
- Garcia, T. S., Romansic, J. M., & Blaustein, A. R. (2006). Survival of three species of anuran metamorphs exposed to UV-B radiation and the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of aquatic organisms*, 72(2), 163-169.
- Garner, T. W., Perkins, M. W., Govindarajulu, P., Seglie, D., Walker, S., Cunningham, A. A., y Fisher, M. C. (2006). The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biology letters*, 2(3), 455-459.
- Gervasi, S., Gondhalekar, C., Olson, D. H., y Blaustein, A. R. (2013). Host identity

- matters in the amphibian-Batrachochytrium dendrobatidis system: fine-scale patterns of variation in responses to a multi-host pathogen. *PLoS One*, 8(1), e54490.
- Goka, K., Yokoyama, J. U. N., Une, Y., Kuroki, T., Suzuki, K., Nakahara, M., Kobayashi A., Inaba S., Mizutani T. y Hyatt AD. (2009). Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology*, 18(23), 4757-4774.
- Govindarajulu, P. (2004). Introduced bullfrogs (*Rana catesbeiana*) in British Columbia: impacts on native Pacific treefrogs (*Hyla regilla*) and red-legged frogs (*Rana aurora*).
- Grismer, L. L. (2002). Amphibians and reptiles of Baja California, including its Pacific islands and the islands in the Sea of Cortés (Vol. 4). Univ of California Press.
- Grismer, L. L., y McGuire, J. A. (1993). The oases of central Baja California, Mexico. Part I. A preliminary account of the relict mesophilic herpetofauna and the status of the oases. *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences*, 92(1), 2-24.
- Hayes, M. P., y Jennings, M. R. (1986). Decline of ranid frog species in western North America: are bullfrogs (*Rana catesbeiana*) responsible?. *Journal of herpetology*, 490-509.
- Hernández, R. C. (2017). Evaluación de la presencia del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, en poblaciones de anfibios en área cero extinción (aze) en Oaxaca y Chiapas, México. *Lacandonia*, 6(1), 7-16.
- Hyatt, A.D.; Boyle, D.G.; Olsen, V.; Boyle, D.B.; Berger, L.; Obendorf, D.; Dalton, A.; Kriger, K.; Hero, M.; Hines, H.; Phillott, R.; Campbell, R.; Marantelli, G.;

- Gleason, F.; Colling, A. (2007). Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of aquatic organisms*, 73(3), 175-192.
- Jancovich, J. K., Davidson, E. W., Morado, J. F., Jacobs, B. L., y Collins, J. P. (1997). Isolation of a lethal virus from the endangered tiger salamander *Ambystoma tigrinum stebbinsi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 31(3), 161-167.
- Knapp, R. A., Briggs, C. J., Smith, T. C., y Maurer, J. R. (2011). Nowhere to hide: impact of a temperature-sensitive amphibian pathogen along an elevation gradient in the temperate zone. *Ecosphere*, 2(8), 1-26.
- Kruger, K. M., Pereoglou, F., y HERO, J. (2007). Latitudinal variation in the prevalence and intensity of chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) infection in eastern Australia. *Conservation Biology*, 21(5), 1280-1290.
- Kupferberg, S. J. (1997). Bullfrog (*Rana catesbeiana*) invasion of a California river: the role of larval competition. *Ecology*, 78(6), 1736-1751.
- Kusrini, M. D., Skerratt, L. F., Garland, S., Berger, L., y Endarwin, W. (2008). Chytridiomycosis in frogs of Mount Gede Pangrango, Indonesia. *Diseases of aquatic organisms*, 82(3), 187-194.
- Lips, K. R., Diffendorfer, J., Mendelson III, J. R., & Sears, M. W. (2008). Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLoS biology*, 6(3), e72.
- Lips, K. R., Mendelson Iii, J. R., Munoz-Alonso, A., Canseco-Márquez, L., y Mulcahy, D. G. (2004). Amphibian population declines in montane southern Mexico: resurveys of historical localities. *Biological Conservation*, 119(4), 555-564.
- Longcore, J. E., Pessier, A. P., y Nichols, D. K. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis*

- gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 219-227.
- Mahony, M. (1996). The decline of the green and golden bell frog *Litoria aurea* viewed in the context of declines and disappearances of other Australian frogs. *Australian Zoologist*, 30(2), 237-247.
- Martel, A., Blooi, M., Adriaensen, C., Van Rooij, P., Beukema, W., Fisher, M. C., Farrer R. A., Schmidt B. R., Tobler U., Goka K., Lips, K. R., Muletz C., Zamudio K. R., Bosch J., Lötters S., Wombwell E., Garner T. W., Cunningham A. A., . Spitzen-van der Sluijs A, Salvidio S., Ducatelle R., Nishikawa K., Nguyen T. T., Kolby J. E., Van Bocxlaer I., Bossuyt F. y Pasmans F. (2014). Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *science*, 346(6209), 630-631.
- Matthews, K. R., Pope, K. L., Preisler, H. K., y Knapp, R. A. (2001). Effects of nonnative trout on Pacific treefrogs (*Hyla regilla*) in the Sierra Nevada. *Copeia*, 2001(4), 1130-1137.
- Mazzoni, R., Cunningham, A. A., Daszak, P., Apolo, A., Perdomo, E., y Speranza, G. (2003). Emerging pathogen in wild amphibians and frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. *Emerging infectious diseases*, 9(8), 995.
- Mendoza-Almeralla, C., Burrowes, P., y Parra-Olea, G. (2015). La quitridiomycosis en los anfibios de México: una revisión. *Revista mexicana de biodiversidad*, 86(1), 238-248.
- Morrow, M., Franchi, L., Dragovic, Z., Görl, M., Johnson, J., Brunner, Macino G, y Roenneberg T. (2001). Circadian regulation of the light input pathway in *Neurospora crassa*. *The EMBO Journal*, 20(3), 307-315.
- Ortíz-Serrato, L., Ruiz-Campos, G., y Valdez-Villavicencio, J. H. (2013). Diet of the

- exotic American bullfrog, *Lithobates catesbeianus*, in a stream of northwestern Baja California, Mexico. *Western North American Naturalist*, 74(1), 116-122.
- Ouellet, M., Mikaelian, I., Pauli, B. D., Rodrigue, J., y Green, D. M. (2005). Historical evidence of widespread chytrid infection in North American amphibian populations. *Conservation Biology*, 19(5), 1431-1440.
- Padgett-Flohr, G. E., y Hopkins II, R. L. (2009). *Batrachochytrium dendrobatidis*, a novel pathogen approaching endemism in central California. *Diseases of Aquatic Organisms*, 83(1), 1-9.
- Padgett-Flohr, G. E. (2008). Pathogenicity of *Batrachochytrium dendrobatidis* in two threatened California amphibians: *Rana draytonii* and *Ambystoma californiense*. *Herpetological Conservation and Biology*, 3(2), 182-191.
- Peralta-García, A., Hollingsworth, B. D., Richmond, J. Q., Valdez-Villavicencio, J. H., Ruiz-Campos, G., Fisher, R. N., Cruz-Hernandez P. y Galina-Tessaro, P. (2016). Status of the California Red-legged Frog (*Rana draytonii*) in the State of Baja California, México. *Herpetological Conservation and Biology*, 11(1), 168-180.
- Peralta García, A. (2017). Distribución, amenazas y estructura genética de la rana de patas rojas (*Rana draytonii*) en Baja California.
- Piotrowski, J. S., Annis, S. L., y Longcore, J. E. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, 96(1), 9-15.
- Pounds, J. A., Bustamante, M. R., Coloma, L. A., Consuegra, J. A., Fogden, M. P., Foster, P. N., La Marca E, Masters KL, Merino-Viteri A, Puschendorf R, Ron SR, Sánchez-Azofeifa GA, Still CJ, y Young BE. (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439(7073), 161-167.

- Rachowicz, L. J., HERO, J., Alford, R. A., Taylor, J. W., Morgan, J. A., Vredenburg, V. T., Collins J. P. y Briggs, C. J. (2005). The novel and endemic pathogen hypotheses: competing explanations for the origin of emerging infectious diseases of wildlife. *Conservation Biology*, 19(5), 1441-1448.
- Relyea, R. A. (2003). Predator cues and pesticides: a double dose of danger for amphibians. *Ecological Applications*, 13(6), 1515-1521.
- Retallick, R. W., McCallum, H., y Speare, R. (2004). Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community post-decline. *PLoS biology*, 2(11), e351.
- Richards, S. J., McDonald, K. R., y Alford, R. A. (1994). Declines in populations of Australia's endemic tropical rainforest frogs. *Pacific Conservation Biology*, 1(1), 66-77.
- Romansic, J. M., Johnson, P. T., Searle, C. L., Johnson, J. E., Tunstall, T. S., Han, B. A., Rohr JR, Blaustein AR. (2011). Individual and combined effects of multiple pathogens on Pacific treefrogs. *Oecologia*, 166(4), 1029-1041.
- Ruiz Campos, G. (1993). *Bionomía y ecología poblacional de la trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss neisoni* (Evermann), de la Sierra San Pedro Mártir, Baja California, México.*
- Ruiz-Campos, G., Camarena-Rosales, F., González-Acosta, A. F., Maeda-Martínez, A. M., De León, F. J. G., Varela-Romero, A., & Andreu-Soler, A. (2014). Estatus actual de conservación de seis especies de peces dulceacuícolas de la península de Baja California, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85(4), 1235-1248.
- Schloegel, L. M., Toledo, L. F., Longcore, J. E., Greenspan, S. E., Vieira, C. A., Lee,

- M., Zhao S, Wangen C, Ferreira CM, Hipolito M, Davies AJ, Cuomo CA, Daszak P, y James TY. (2012). Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology*, 21(21), 5162-5177.
- Stebbins, R. C. (2003). *A field guide to western reptiles and amphibians*. Houghton Mifflin Harcourt.
- Stebbins, R. C., y Cohen, N. W. (1997). *A natural history of amphibians*. Princeton University Press.
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S., Fischman, D. L., y Waller, R. W. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306(5702), 1783-1786.
- Talley, S. M., Coley, P. D., y Kursar, T. A. (2002). The effects of weather on fungal abundance and richness among 25 communities in the Intermountain West. *BMC ecology*, 2(1), 7.
- Taylor, S. K., Williams, E. S., Thorne, E. T., Mills, K. W., Withers, D. I., y Pier, A. C. (1999). Causes of mortality of the Wyoming toad. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(1), 49-57.
- Venesky, M. D., Raffel, T. R., McMahon, T. A., y Rohr, J. R. (2014). Confronting inconsistencies in the amphibian-chytridiomycosis system: implications for disease management. *Biological Reviews*, 89(2), 477-483.
- Voyles, J., Rosenblum, E. B., y Berger, L. (2011). Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity. *Microbes and Infection*, 13(1), 25-32.
- Voyles, J., Young, S., Berger, L., Campbell, C., Voyles, W. F., Dinudom, A., Cook D,

- Webb R, Alford RA, Skerratt LF, y Speare R. (2009). Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science*, 326(5952), 582-585.
- Vredenburg, V. T., Knapp, R. A., Tunstall, T. S., y Briggs, C. J. (2010). Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(21), 9689-9694.
- Weldon, C., Du Preez, L. H., Hyatt, A. D., Muller, R., y Speare, R. (2004). Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging infectious diseases*, 10(12), 2100.
- Woodhams, D. C., y Alford, R. A. (2005). Ecology of chytridiomycosis in rainforest stream frog assemblages of tropical Queensland. *Conservation Biology*, 19(5), 1449-1459.
- Woodhams, D. C., Alford, R. A., y Marantelli, G. (2003). Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Diseases of aquatic organisms*, 55(1), 65-67.