

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**CONFIRMACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN  
POTENCIAL DE *Batrachochytrium dendrobatidis* Y SUS  
POTENCIALES VECTORES EN NUEVO LEÓN, MÉXICO.**

**POR**

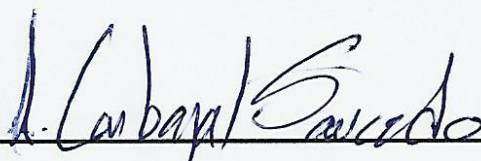
**PERLA JAZBETH CHUC MARTÍNEZ**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA  
EN CONSERVACIÓN, FAUNA SILVESTRE Y  
SUSTENTABILIDAD.**

**2024**

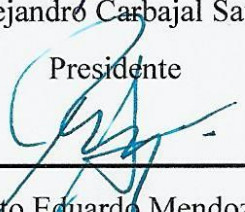
CONFIRMACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN  
POTENCIAL DE *Batrachochytrium dendrobatidis* Y SUS  
POTENCIALES VECTORES EN NUEVO LEÓN, MÉXICO.

Comité de Tesis



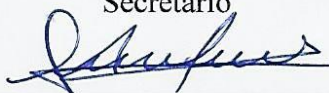
Dr. Alejandro Carbajal Saucedo

Presidente



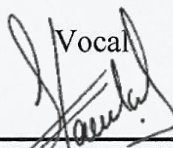
Dr. Roberto Eduardo Mendoza Alfaro

Secretario



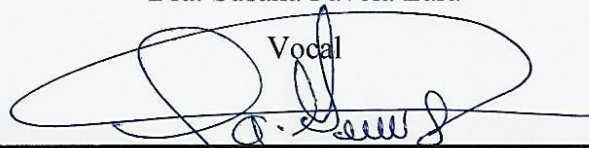
Dra. Alina Olalla Kerstupp

Vocal



Dra. Susana Favela Lara

Vocal



Dr. Juan A. García Salas

Vocal



SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO

Subdirector de Posgrado

**CONFIRMACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN  
POTENCIAL DE *Batrachochytrium dendrobatidis* Y SUS  
POTENCIALES VECTORES EN NUEVO LEÓN, MÉXICO.**

**Dirección de Tesis**



---

Dr. Alejandro Carbajal Saucedo

Director

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la M. en C. Blanca Valladares y el Laboratorio de Genómica de la Conservación en el Zoológico de Chapultepec. Esto no hubiera tomado un camino fijo sin su apoyo, gran parte de este proyecto es gracias a ti y por abrirme las puertas y recibirme en el laboratorio con mucha calidez. Espero que en un futuro podamos colaborar nuevamente.

Al Dr. Jesús, la Dra. Alejandra y la Dra. Andrea del Laboratorio de Secuenciación del ITESM. Fue un gusto aprender y trabajar en conjunto. De igual manera, este proyecto pudo concluir debido a todo su apoyo. Gracias por recibirme en el laboratorio y hacer mi estancia una grandiosa experiencia, contribuyendo no solo en mi formación académica, sino por brindarme buenos momentos y consejos.

A la doctora Susana Favela, por estar presente desde antes del inicio de este proyecto, por su atención y por brindarnos un espacio seguro durante estos dos años. Gracias por guía y compromiso para que esto fuese posible.

A la doctora Alina y a los doctores Roberto y Juan Antonio, por haber participado en mi formación académica, por expandir y enriquecer mi conocimiento en cada clase. Los admiro a ustedes y toda su trayectoria profesional, sin duda todavía me queda mucho por aprender.

Al doctor Alejandro Carbajal. Estaré agradecida siempre por haberme dado los ánimos para continuar, por brindarme consejos hasta el último día y ser paciente conmigo en todo momento.

A Mayte y Fernanda. Gracias por ser grandiosas compañeras de posgrado y brindarme su amistad. Siempre las tendré presentes sin importar dónde estemos cada una.

A mi familia. Mis papás, mis admiradores número uno y quienes me siguen motivando a ser cada día mejor; y a mis hermanos, gracias por estar presentes siempre que los necesito incluso a la distancia.

A la familia Gámez Benavides, por hacer mi estancia en Monterrey más amena y cálida, y hacerme sentir acompañada siempre.

A Raúl. Este proyecto es igual de tuyo que mío. Gracias por ser el primero en apuntarse en cada salida a campo, por acompañarme en cada paso, por los ánimos, la paciencia y por todo tu apoyo.

Y gracias a todas las personas que me han inspirado y animado para seguir aprendiendo y trabajando en la conservación de los anfibios.

## **DEDICATORIA**

*A todo aquel que quiera conocer el mundo de los anfibios.*

A veces se piensa que los anfibios son primitivos, aburridos y poco inteligentes.  
En realidad, pueden ser letalmente rápidos, espectacularmente bellos, sorprendentemente cariñosos y muy sofisticados.

- David Attenborough.

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN .....  | 1  |
| 2. ANTECEDENTES .....  | 2  |
| 2.1. Los anfibios.....   | 2  |
| 2.2. <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> y la quitridiomycosis en México ..... | 4  |
| 2.3. Especies vectores y/o reservorios.....                                      | 6  |
| 2.4. Modelo de Nicho Ecológico.....  | 7  |
| 3. JUSTIFICACIÓN .....   | 9  |
| 4. OBJETIVOS .....   | 11 |
| 4.1. Objetivo general.....   |    |
| 4.2. Objetivos específicos .....   |    |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 12 |
| 5.1. Sitio de estudio.....   | 12 |
| 5.2. Toma de muestras .....  | 13 |
| 5.3. Procesamiento de muestras .....   | 14 |
| 5.3.1 Extracción de ADN.....   | 14 |
| 5.3.2 PCR punto final.....   | 15 |
| 5.4. Modelado de nicho ecológico .....   | 16 |
| 5.4.1 Datos de presencia de las especies.....                                    | 16 |
| 5.4.2 MNE y mapas de distribución.....   | 17 |
| 6. RESULTADOS.....   | 20 |
| 7. DISCUSIÓN.....  | 30 |
| 8. CONCLUSIONES.....   | 37 |
| 9. PERSPECTIVAS .....  | 38 |
| 10. ANEXOS.....  | 39 |
| 11. REFERENCIAS.....   | 48 |



## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Coordenadas de los sitios de muestreo.....                 | 12 |
| <b>Tabla 2.</b> Cebadores.....   | 15 |
| <b>Tabla 3.</b> Condiciones del termociclador para la reacción de PCR..... | 15 |
| <b>Tabla 4.</b> Descripción de las variables bioclimáticas.....            | 18 |
| <b>Tabla 5.</b> Especies colectadas.....                                   | 20 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Sitios de muestreo en el área de estudio.....  | 15 |
| <b>Figura 2.</b> Ejemplar metamórfico de <i>Anaxyrus punctatus</i> con posible malformación.....  | 23 |
| <b>Figura 3.</b> Productos de electroforesis en gel de agarosa de ocho muestras colectadas.....   | 24 |
| <b>Figura 4.</b> Productos de electroforesis capilar. A) Control positivo a Bd, muestra la amplificación de un pico de 324 pb. B) Muestra negativa, no refleja ninguna amplificación.....   | 25 |
| <b>Figura 5.</b> Distribución potencial de <i>B. dendrobatidis</i> . A) Idoneidad con las variables bioclimáticas presentes con los sitios de muestreo. B) Idoneidad con las variables climáticas futuras.....  | 26 |
| <b>Figura 6.</b> Distribución potencial de <i>L. catesbeianus</i> . A) Idoneidad con las variables bioclimáticas presentes con los sitios de muestreo. B) Idoneidad con las variables climáticas futuras.....   | 25 |
| <b>Figura 7.</b> Distribución potencial de <i>R. horribilis</i> . A) Idoneidad con las variables bioclimáticas presentes con los sitios de muestreo. B) Idoneidad con las variables climáticas futuras.....   | 27 |
| <b>Figura 8.</b> Mapa binario de Bd y <i>L. catesbeianus</i> . (0 = Ninguna especie; 1 = Alguna de las dos especies; y 2 = Ambas especies). A) Idoneidad con las variables bioclimáticas presentes con los sitios de muestreo. B) Idoneidad con las variables climáticas futuras..... | 28 |
| <b>Figura 9.</b> Mapa binario de Bd y <i>R. horribilis</i> . (0 = Ninguna especie; 1 = Alguna de las dos especies; y 2 = Ambas especies). A) Idoneidad con las variables bioclimáticas presentes con los sitios de muestreo. B) Idoneidad con las variables climáticas futuras.....   | 29 |

## RESUMEN

Actualmente, los anfibios están considerablemente amenazados a nivel mundial debido a diversos factores, como la contaminación, el calentamiento global, la introducción de especies exóticas, el comercio ilegal y las enfermedades emergentes. En las últimas décadas se han reportado numerosos declives de poblaciones de anfibios a nivel global por el hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), causante de la enfermedad emergente quitridiomycosis, la cual desencadena diversos signos y síntomas que afectan principalmente la piel de los anfibios, pudiendo llevarlos a la muerte.

Por lo que se buscó comprobar la presencia o ausencia de Bd en distintos puntos del estado de Nuevo León, así como también se evaluó el riesgo de infección en anfibios del estado mediante Modelos de Nicho Ecológico de Bd y especies vectores y/o reservorios. Este proyecto reportó la ausencia de Bd en el estado y, de igual manera, se determinó que *Rhinella horribilis* tiene un papel potencial como reservorio del hongo, permitiendo que pueda dispersarse y prevalecer en el medio si encuentra una vía de entrada a las poblaciones en Nuevo León. Debido a esto se requiere complementar con futuros muestreos para ampliar el área de estudio que permitan respaldar con mayor seguridad los datos obtenidos.

## **ABSTRACT**

Currently, amphibians are significantly threatened worldwide due to various factors, including pollution, global warming, the introduction of exotic species, illegal trade, and emerging diseases. In recent decades, numerous declines in amphibian populations have been reported globally due to the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), which causes the emerging disease chytridiomycosis. This disease triggers various signs and symptoms that primarily affect the skin of amphibians, potentially leading to death.

Therefore, we sought to verify the presence or absence of Bd at different locations in the state of Nuevo León, as well as to assess the risk of infection in amphibians in the state using Ecological Niche Models for Bd and vector or reservoir species. This project reported the absence of Bd in the state and determined that *Rhinella horribilis* has a potential role as a reservoir for the fungus, allowing it to disperse and persist in the environment if it finds a pathway into populations in Nuevo León. Consequently, future sampling is required to expand the study area, providing more robust support for the obtained data.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los anfibios son un grupo de vertebrados que se distinguen por su piel lisa y vascularizada, que facilita el intercambio de gases y que está compuesta por glándulas mucosas que ayudan en la humectación y en diversas especies se identifica un segundo tipo de glándulas (granulares) que secretan toxinas como mecanismo de defensa (Duellman y Trueb, 1994; Parra-Olea *et al.*, 2014). Por sus características anatómicas y fisiológicas, son animales fuertemente asociados a ambientes húmedos y a cuerpos de agua (San Mauro, 2012), por lo que sus poblaciones pueden perturbarse fácilmente por la contaminación y fragmentación del hábitat. Además, en las últimas décadas se ha comprobado que las enfermedades emergentes han contribuido también en los declives y extinciones de los anfibios, principalmente causados por virus y hongos (Bosch, 2003).

La quitridiomycosis, una enfermedad causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), afecta la piel de los anfibios al grado de provocar la muerte y, por tanto, la disminución de las poblaciones de estos en diversas partes del mundo (Mendoza-Almeralla *et al.*, 2015). Se ha reportado en todos los continentes, estando presente en 86 países y donde ha infectado a más de 1000 especies (Castro-Monzon, *et al.*, 2020), y ha intervenido en el declive de más de 200 de ellas (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2019). Sin embargo, no todas las especies de anfibios sufren efectos de la infección por Bd, por lo que pueden participar como reservorios del patógeno (Brannelly *et al.*, 2018) junto con otros grupos de vertebrados, facilitando así su propagación a nuevos sitios (Prahl, *et al.*, 2020).

En el caso de México se ha documentado la presencia de Bd en 13 estados (Peralta-García *et al.*, 2018) así como se ha detectado la cepa BdGPL en el país (Basanta, Byrne, Rosenblum, *et al.*, 2021). Sin embargo, aún existen zonas con escasa información respecto a la presencia o ausencia de Bd, por lo que es ideal realizar estudios de manera específica, tomando en cuenta enfoques como los Modelos de Nicho Ecológico (Guirardi *et al.*, 2011; Basanta *et al.*, 2019; Bolom-Huet *et al.*, 2019) debido a que tienen potencial para modelar la idoneidad del hábitat y la distribución geográfica de diversas especies, siendo el caso de patógenos y sus posibles reservorios (Peterson, 2006).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Los anfibios

Según la base de datos Amphibia Web (2024a), a nivel mundial existen 8,743 especies de anfibios, los cuales se integran en tres órdenes: Anura, en el que se incluyen ranas y sapos y, además es el más diverso con 7,705 especies; seguido del orden Caudata, donde se encuentran las salamandras, con 816 especies; y finalmente el orden Gymnophiona, comúnmente conocidos como cecilias y que está compuesto por 222 especies.

Hasta el momento se tienen registradas 424 especies de anfibios en México, que están integrados por 262 anuros, 159 salamandras y tres especies de cecilias (Amphibia Web, 2024b), lo que posiciona al país en el quinto lugar a nivel mundial en diversidad de anfibios, y sumado a esto, alrededor de siete familias presentan más del 50% de especies endémicas (Parra-Olea *et al.*, 2014). De manera específica, en el estado de Nuevo León se han documentado un total de 26 especies de anfibios, que corresponden a 22 anuros y cuatro salamandras (Nevárez-De los Reyes *et al.*, 2016)

Las características de los anfibios son muy particulares, como el caso de su piel, la cual está involucrada en distintos procesos fisiológicos como el intercambio gaseoso, la osmorregulación y la termorregulación (Duellman y Trueb, 1994). Además, es sumamente relevante para su supervivencia, ya que está compuesta por glándulas granulares que presentan componentes bioquímicos que ayudan como mecanismo de defensa contra depredadores y que también tienen efectos antibacteriales y antifúngicos, lo que representa un factor importante en su sistema inmune (Duellman y Trueb, 1994; Daly, 1995; Varga *et al.*, 2019; Demori *et al.*, 2019). A su vez, se ha demostrado que los anfibios tienen una comunidad simbiótica de bacterias asociadas a la piel, que pueden variar en composición acorde a los factores abióticos y bióticos donde se encuentre la especie (Buttimer *et al.*, 2024). Estas comunidades de microorganismos funcionan potencialmente como prevención de enfermedades, como la quitridiomycosis causada por *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) y *B. salamandrivorans* (Bsal) (Rebollar *et al.*, 2020).

Otro aspecto que destaca entre estos organismos es su tipo de desarrollo ya que, en muchas especies, éste transcurre entre el medio terrestre y el acuático a lo largo de un proceso

conocido como metamorfosis. Los huevos son colocados en cuerpos de agua o cerca de éstos y al eclosionar las larvas se mantienen dentro del medio acuático hasta la maduración de diversos órganos, que provoca una transformación corporal completa, momento en el cual son capaces de incursionar en el medio terrestre hasta llegar a su etapa adulta. No obstante, también hay especies que tienen un desarrollo directo y no pasan por el proceso de metamorfosis, ya que los huevos son colocados en zonas con alta humedad y los embriones se desarrollan completamente, de esta forma, al momento de la eclosión tienen la misma anatomía y fisionomía que los adultos (Hanken, 1989; Garin y Lobos, 2008).

Los anfibios tienden a ser sensibles a los cambios que pueda haber en su entorno, como la pérdida o degradación del hábitat, los efectos del cambio climático, la contaminación del agua y, actualmente con mayor incidencia, las enfermedades emergentes (Marco, 2003; Jacinto-Maldonado *et al.*, 2023; Luedtke *et al.*, 2023).

Debido a los reportes de posibles declives de poblaciones de anfibios, se han desarrollado diversos estudios para monitorear las poblaciones de anfibios y conocer las posibles causas de sus disminuciones poblacionales. En 1997 Parra-Olea, García-París y Wake (1999) visitaron diez puntos en México para monitorear el estado de las poblaciones de salamandras de la familia Plethodontidae. Los sitios abarcan dos puntos en Chiapas, tres puntos en Oaxaca, dos en Veracruz, dos en Hidalgo y uno en Nuevo León. En este último, se visitó el Cerro El Potosí, en donde se reportaron varios ejemplares de *Chiropterotriton priscus* en un área de pinos y abetos a 3000 msnm, mientras que, en menores elevaciones, en un hábitat semiabierto de robles cerca del pueblo Pablillo, se encontraron solo tres individuos de *Pseudoeurycea galeanae* (= *Aquiloerycea galeanae*) en un agave. Se considera que tanto la variación estacional relacionada a las temporadas de mayor actividad de los anfibios, así como las modificaciones de su hábitat puede explicar los avistamientos de las especies o en la cantidad de individuos. A pesar de que los encuentros fueron escasos, en la actualidad no se cuenta con estudios que respalden el estatus de las poblaciones de estos plethodóntidos.

Por su parte, en Nuevo León se han monitoreado las regiones fisiográficas y Áreas Naturales Protegidas, con el fin de analizar la composición de especies y evaluar la categoría de riesgo de estas. De las especies que se distribuyen en el estado, seis especies

se encuentran bajo Protección especial, una como Amenazada y 18 no tienen ningún estatus en la NOM-059-SEMARNAT-2010, mientras que la Lista Roja de la IUCN dos especies están bajo la categoría de Vulnerable, tres como Casi Amenazadas, 19 como Preocupación menor y solo una especie no ha sido evaluada. Las principales amenazas que se detectaron fueron el crecimiento urbano e industrial, la contaminación, la pérdida de hábitat, los atropellamientos en carreteras, uso de pesticidas y la colecta o venta sin regulación (Nevárez-De los Reyes *et al.*, 2016; Lemos-Espinal *et al.*, 2016).

Como se menciona, aunque existen diversas especies se encuentran dentro de alguna categoría de riesgo, no hay suficiente información respecto a sus poblaciones ni de los factores que comprometen a estas, por lo que es de suma importancia poder generar información que contribuya al conocimiento de las poblaciones presentes en el estado.

## **2.2. *Batrachochytrium dendrobatidis* y la quitridiomycosis en México**

Las enfermedades infecciosas emergentes son una de las principales causas que afectan a las poblaciones de anfibios, debido a la facilidad que tienen para dispersarse y ampliar su rango de distribución, así como también afectar a diversos hospederos (Basanta, 2019; Castro-Monzon *et al.*, 2020).

*Batrachochytrium dendrobatidis* es un hongo microscópico, con hábitos acuáticos durante su fase de zoospora y que, al entrar en contacto con su hospedero, empieza a desarrollarse y reproducirse (Sewell *et al.*, 2021). Una vez que inicia su proceso de infección provoca una enfermedad llamada quitridiomycosis, la cual afecta la piel de los anfibios, principalmente en zonas queratinizadas como la boca de los renacuajos o las patas y zona ventral de los adultos (Bravo y Moreno, 2020). Algunas especies pueden ser asintomáticas ante el patógeno, sin embargo, en especies susceptibles puede generar diversas alteraciones, como deformaciones morfológicas durante la metamorfosis de los renacuajos, el engrosamiento y desprendimiento de la piel, ulceraciones, fallas en el intercambio gaseoso, la osmorregulación, hasta provocar un desbalance metabólico y la muerte del hospedero (Kolby y Daszak, 2016; Castro-Monzon *et al.*, 2020; Grogan *et al.*, 2020).



Uno de los factores que pueden influir en la virulencia de Bd es la temperatura, ya que se ha visto que de 17°C a 25°C puede tener un desarrollo óptimo, pero a mayores temperaturas su crecimiento es limitado o nulo (Turner *et al.*, 2021). Además, se ha registrado que en algunos pletodóntidos a partir de los 25°C puede ocurrir la muerte, tanto para el huésped como el patógeno, debido a la intolerancia a altas temperaturas (Mendoza-Almeralla *et al.*, 2016). Y, por el contrario, Bd puede sobrevivir a bajas temperaturas, hasta los 4°C (García-Feria *et al.*, 2019; Turner *et al.*, 2021). De igual manera, se ha reportado que tanto la altitud y las precipitaciones están estrechamente relacionadas con la presencia de Bd (Lambertini *et al.*, 2021; Fisher *et al.*, 2021).

Algunas familias de anfibios pueden presentar mayor incidencia a la infección por Bd, por ejemplo, las familias con mayor cantidad de especies positivas en México son Hylidae, Ranidae, Ambystomidae, Pletodonthidae, Bufonidae y Craugastoridae. Y, en donde la mayoría de los estudios están concentrados en la zona centro hacia el sur del país (Murrieta-Galindo *et al.*, 2014; Mendoza-Almeralla *et al.*, 2015; García-Feria *et al.*, 2019; Nava-González *et al.*, 2019; Adams *et al.*, 2022).

Hasta el momento, el único trabajo reportado para la zona noreste de México es en Tamaulipas hecho por Villamizar-Gómez y colaboradores (2015), en donde se tomaron muestras de 56 anfibios en diversos puntos. Los resultados no mostraron ningún caso positivo para Bd, a pesar de que se esperaba la presencia del hongo, por lo que los autores proponen que las comunidades de anfibios no han estado en contacto con el hongo o que posiblemente hayan desarrollado un mecanismo inmune o resistente a la infección. De igual manera, se consideró la temperatura como un factor que afectara en los resultados, sin embargo, esta no pareció ser la causa de la ausencia. Otro punto que se tomó en cuenta fue el tamaño de la muestra, por lo que los autores sugieren que es necesario completar con muestreos adicionales y con un mejor diseño de campo para que evaluar y verificar si el estado de Tamaulipas realmente no tiene presencia de Bd.

### 2.3. Especies vectores y/o reservorio

Los vectores de enfermedades son aquellos organismos que pueden transportar al agente infeccioso hasta un huésped susceptible, pudiendo multiplicarse o no el patógeno dentro de este. Mientras que un reservorio es un organismo o medio donde un agente infeccioso encuentra condiciones favorables para su desarrollo y supervivencia, sin causar la enfermedad a quien lo porta (Bonita, Beaglehole y Kjellstrom, 2008; Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2014).

A pesar de que la quitridiomycosis es una enfermedad, hasta ahora, exclusiva de los anfibios, se ha reportado la presencia del patógeno en otros grupos de invertebrados y vertebrados, los cuales pueden fungir como vectores o reservorios de este. Por ejemplo, crustáceos, nematodos (Prahl *et al.*, 2020; Bravo y Moreno, 2020) e incluso mosquitos *Culex territans* (Reinhold *et al.*, 2023) han resultado positivos a Bd.

Otros grupos en los que se tienen registros de presencia de Bd son los reptiles, como serpientes y lagartijas (Kilburn *et al.*, 2011). Mientras que en las aves acuáticas (*Branta canadensis* y *Anser anser domesticus*) por ejemplo, se ha reportado que pueden traer consigo zoosporas de Bd en las patas. A pesar de que el patógeno tiene baja tolerancia a la desecación, las aves pueden ser potenciales vectores y llevar al hongo a nuevos sitios (Garmyn *et al.*, 2012).

Sin embargo, son los propios anfibios los que pueden fungir como reservorios y vectores del patógeno sin presentar ninguna sintomatología. Se ha visto que algunas especies de anfibios pueden infectar a otras especies susceptibles, incluso sin necesidad de estar en el mismo espacio a la vez (Burns *et al.*, 2020). La dispersión del patógeno se ve incrementada cuando las especies asintomáticas son también comercializadas (García-Feria *et al.*, 2017), como el caso de *Xenopus leavis*, *Rhinella marina* y *Lithobates catesbeianus* (Greenspan *et al.*, 2012; Brannelly *et al.*, 2018; Elmassry *et al.*, 2020; Greenspan *et al.*, 2012; Adams *et al.*, 2022; Pineda-Vázquez *et al.*, 2022), lo que puede generar daños de alto impacto en las especies nativas y su hábitat (Aguirre-Muñoz *et al.*, 2009).

## 2.4. Modelos de Nicho Ecológico

Hutchinson (1957) propuso el concepto de nicho ecológico como todas las condiciones bióticas y abióticas, en las que puede o podría sobrevivir una especie en particular. A su vez, diferenció el nicho fundamental y el nicho efectivo o realizado. El primero hace referencia a las condiciones abióticas en las que una especie podría vivir, mientras que el segundo se refiere al área en la que una especie subsiste y se encuentra limitada por la acción de las interacciones bióticas.

Los Modelos de Nicho Ecológico (MNE) son una estimación aproximada del nicho fundamental de la especie existente en la geografía, los cual pueden predecir las condiciones ambientales óptimas que podrían beneficiarle para sobrevivir, tomando en cuenta en dónde se encuentra la especie actualmente, al igual que las regiones que no han sido accesibles históricamente (Peterson y Soberón, 2012; Mota-Vargas *et al.*, 2019).

Debido a la capacidad que tienen los MNE, se han convertido en una herramienta útil para conocer sitios idóneos para ubicar especies de interés (Ríos-Muñoz y Espinosa-Martínez, 2019). Por ejemplo, el modelo de nicho fundamental de *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) el Nuevo Mundo evidenció que una porción significativa de diversos ecosistemas desde parte de la Sierra Madre Oriental hacia Centroamérica y parte de Sudamérica está ocupada por localidades positivas a Bd, lo que sugiere que la mayoría de los ambientes neotrópicos pueden ser adecuados para el hongo. Estas localidades están caracterizadas por una variedad de rangos de temperatura y precipitación. Los autores mencionan que el modelado puede verse afectado por dos tipos de errores: a) comisión, el cual es la inclusión de regiones no habitadas y b) la omisión, que es la exclusión de regiones habitadas. Por lo que se recomienda, debido a la amplia disponibilidad de regiones idóneas para Bd, una necesaria implementación de regulaciones para evitar la propagación del patógeno a causa de actividades antropogénicas (Ron, 2005).

Basanta y colaboradores (2019) indicaron que la Sierra Madre Oriental, el Cinturón Volcánico Transmexicano, la Sierra Madre del Sur, el Golfo de México y la Península de Yucatán son las áreas más adecuadas para *B. salamandrivorans* (Bsal), un pariente cercano a Bd. Los autores mencionan que el 51% de las especies de salamandras de México están presentes en las áreas que son óptimas para Bsal y se identificaron 13 áreas

que son críticas por la alta idoneidad para el hongo, principalmente ubicados en el centro y sureste del país y, en donde además se distribuyen cinco o más especies de salamandras microendémicas y catalogadas en peligro de extinción. Por ello, se consideró que utilizar los rangos de idoneidad para la presencia de Bsal en vez de los rangos del huésped puede ofrecer resultados más precisos al momento de modelar el área de invasión potencial del patógeno y, así poder sugerir el monitoreo de los puntos críticos para prevenir la posible propagación del patógeno.

Otro aspecto que también se ha evaluado es la relación entre Bd y *Lithobates catesbeianus*, un anuro de la familia Ranidae que ha sido reportado como portador asintomático más importantes en América y que está incluido entre las cien especies invasoras más importantes del mundo (Rico-Sánchez *et al.*, 2021). Con base en esto, se ha reportado que ambas especies comparten nichos realizados, ya que en las áreas donde se encuentran las ranas toro de forma nativa o invasiva, también le brindan las condiciones climáticas óptimas a Bd. Por tanto, existe la posibilidad de que las ranas toro introduzcan al patógeno a nuevos sitios, lo que promueve la preservación del patógeno en el medio. Asumiendo este escenario, se ha sugerido y remarcado la importancia de aplicar rápidamente medidas de control, incluyendo los aspectos legales y comerciales de este vector (Rodder *et al.*, 2013). Es en este sentido que el mapeo de los sitios de los MNE puede convertirse en una herramienta muy útil para dirigir esfuerzos de conservación para el control de la rana toro y otros posibles vectores.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En México, la riqueza de anfibios representa el quinto lugar a nivel mundial, así como un alto nivel de endemismos (Parra-Olea *et al.*, 2014). La anfibio fauna de Nuevo León incluye 22 especies de anuros y cuatro de salamandras que ocupan todas las regiones fisiográficas del Estado, aún en las zonas más secas, ya que los anfibios presentan alta plasticidad fenotípica y, por tanto, desarrollan diversas estrategias para sobrevivir en ambientes poco favorables para este grupo de vertebrados (Aguillón-Gutiérrez, 2018). Cinco de las especies que habitan Nuevo León son endémicas del país (Nevárez-De Los Reyes *et al.*, 2016), por lo que considerar los factores potenciales de riesgo es primordial para plantear programas que aseguren su conservación.

Debido a que los anfibios poseen características ecofisiológicas particulares para llevar a cabo sus modos de vida y que estas características están fuertemente ligadas a requerimientos específicos en su hábitat para mantener la estabilidad de sus poblaciones, es necesario fortalecer el conocimiento sobre la relación de estos factores, en específico sobre aquellos que pudieran poner en riesgo su supervivencia. Como es el caso del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, el cual a nivel mundial se considera una de las enfermedades infecciosas que más especies han afectado y que se ha detectado en diversos estados de la República Mexicana, especialmente en las regiones montañosas del centro y sur del país (Mendoza-Almeralla *et al.*, 2015). A pesar de que este patógeno tiene rangos óptimos de temperatura (17°C a 25°C) y de distribución altitudinal (1000 a 1800 msnm) principalmente para su desarrollo eficaz en el medio, se ha reportado la presencia de Bd en condiciones distintas (Frías-Alvarez *et al.*, 2008; Luján, Rodríguez-Estrella *et al.*, 2012; Peralta-García *et al.*, 2018). Así mismo, se han detectado especies de anfibios que funcionan como reservorios de la enfermedad, en donde el huésped es asintomático, siendo únicamente portador del patógeno, pudiendo llevar la infección a nuevos sitios y exponiéndolo a especies susceptibles (Brannelly *et al.*, 2017).

Por lo anterior, resulta de suma importancia establecer un monitoreo para la detección de Bd en poblaciones nativas de anfibios del país, especialmente en las regiones con menor cantidad de información, como es el caso de la zona norte de México, con la finalidad de planes de contención o tratamiento que ayuden a detener posibles infecciones y evitar la

disminución de poblaciones nativas de anfibios. En este sentido, el uso de herramientas bioinformáticas para la creación de modelos de nicho ecológico permitirá determinar las zonas con mayor potencial de presencia e infección de Bd con el fin de dirigir adecuadamente los esfuerzos hacia zonas particulares del Estado.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Confirmar la presencia de Bd en anfibios de Nuevo León y evaluar el riesgo de infección mediante la determinación de modelos de nicho ecológico que involucren especies portadoras asintomáticas bajo distintos escenarios climáticos.

### **4.2. Objetivos específicos**

Determinar la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) en poblaciones actuales de anfibios del estado de Nuevo León.

Obtener un Modelo de Nicho Ecológico para Bd y dos especies portadoras asintomáticas del patógeno con distribución dentro del estado de Nuevo León.

Evaluar el riesgo de prevalencia y/o aumento de presencia de Bd en el estado de Nuevo León bajo distintos escenarios climáticos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Sitios de estudio

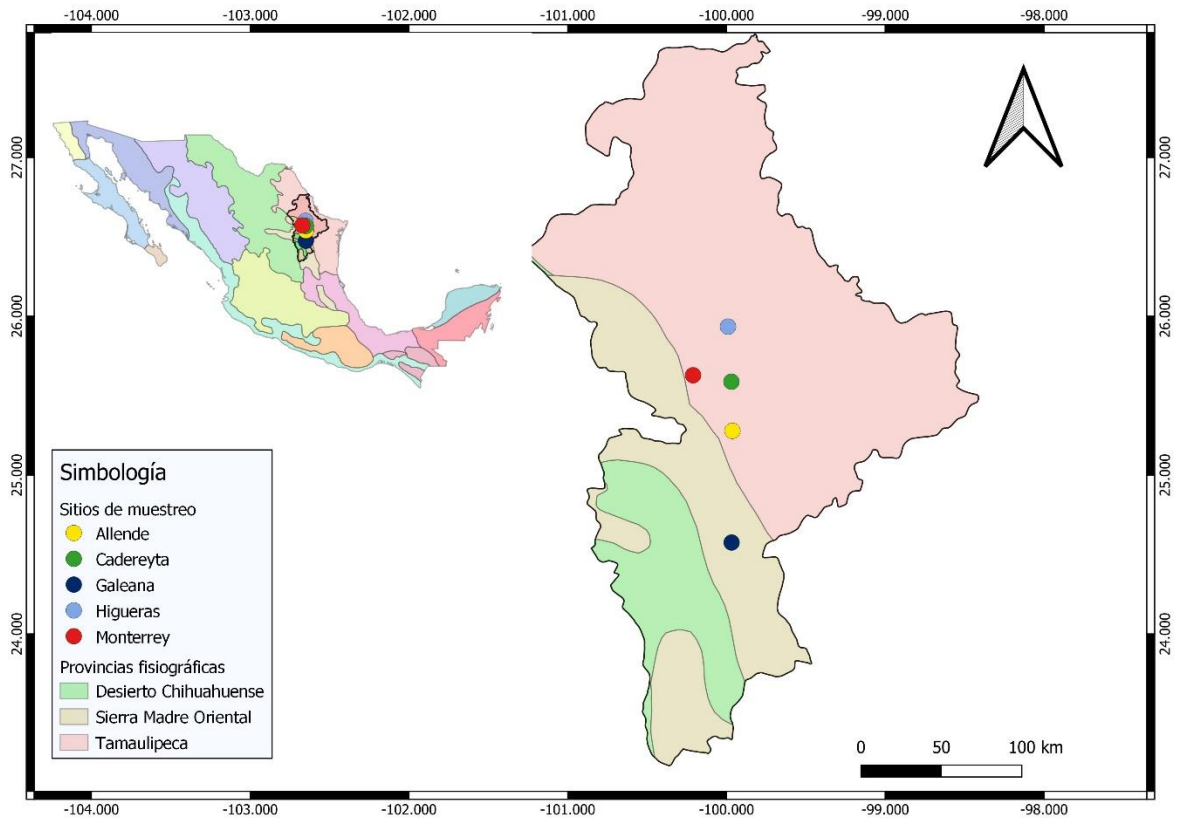
El estado de Nuevo León está ubicado en la zona noreste de México y está comprendido por tres provincias fisiográficas: la Sierra Madre Oriental, el Desierto Chihuahuense y la Tamaulipeca (Morrone *et al.*, 2017). Los sitios de mayor altitud en el estado alcanzan los 3,700 msnm en el Cerro El Morro y el Cerro El Potosí (Contreras-Hidalgo, 2007).

Dentro del Estado se seleccionaron cinco sitios de muestreo (Tabla 1; Figura 1) con apoyo de la literatura y los registros de colecta de la Colección Herpetológica UANL, con el objetivo de conocer las zonas con una mayor cantidad de avistamientos de anfibios. Las colectas se realizaron en los meses de marzo a junio del 2023, durante la mañana (6:00 a 9:00 a.m.) y durante la noche (7:00 a 11:00 p.m.).

**Tabla 1. Coordenadas de los sitios de muestreo.**

| <b>Sitio</b> | <b>Latitud</b> | <b>Longitud</b> |
|--------------|----------------|-----------------|
| Higueras     | 25.93532429    | -99.99055992    |
| Galeana      | 24.57594718    | -99.96763067    |
| Allende      | 25.27907930    | -99.96297167    |
| Cadereyta    | 25.58857701    | -99.96904412    |
| Monterrey    | 25.62915641    | -100.2103227    |





**Figura 1. Sitios de muestreo en el área de estudio.**

## 5.2. Toma de muestras

Para la identificación de especies se usó el Manual de Identificación de Herpetofauna de México (González-Hernández *et al.*, 2021). Para complementar los registros, se tomaron fotografías de algunos ejemplares con una cámara Canon EOS Rebel T7 con un objetivo 18-55 mm.

La captura de anfibios se realizó a través de encuentros visuales (Heyer *et al.* 1994; Viáfara-Vega *et al.*, 2020), buscando en la hojarasca, árboles, arbustos, entre troncos y rocas, con el fin de realizar un mayor esfuerzo de muestreo. El manejo se hizo mediante captura directa bajo los lineamientos de bioseguridad para evitar contaminación cruzada entre los ejemplares (Phillot *et al.*, 2010), utilizando guantes de nitrilo libres de polvo por cada ejemplar. Cuando fue necesario, las manos o cualquier instrumento que pudiera haber

estado en contacto con algún individuo, fueron limpiados con etanol 96% y enjuagados con agua destilada.

Las muestras se tomaron siguiendo las indicaciones de Hyatt y colaboradores (2007) utilizando hisopos estériles, frotando sobre la zona ventral, en la ingle, las patas, los dedos y las membranas interdigitales, un total de cinco veces en cada parte. El hisopo se resguardó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Una vez que se colectaron las muestras, estas fueron llevadas al laboratorio y se guardaron a -20°C.

### **5.3. Procesamiento de muestras**

De las 54 muestras colectadas, 31 fueron analizadas en el Laboratorio de Genómica de la Conservación ubicado dentro del Zoológico de Chapultepec en la Ciudad de México y 23 muestras fueron procesadas en el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM).

#### **5.3.1. Extracción de ADN**

La extracción de ADN se hizo con base en el protocolo de Miller y colaboradores (1988) con los siguientes ajustes. Se añadieron 400 µl de buffer de lisis (Qiagen, Puregene Cell Lysis Solution) a los tubos Eppendorf que contenían las muestras, se agitaron utilizando un vórtex por 20 segundos y después se incubaron a 70°C en baño maría durante 20 minutos. Se les añadieron 7 µl de Proteinasa K (Qiagen, Proteinase K Solution 20mg/ml) y se dejaron incubando nuevamente a 56°C durante toda la noche. Posteriormente, se retiraron los hisopos de los tubos Eppendorf intentando frotarlos contra las paredes de estos. A cada tubo se le añadieron 135 µl de buffer de precipitación de proteínas (Qiagen, Puregene Protein Precipitation Solution), agitándolos en un vórtex por 40 segundos y centrifugándolos a 13,000 rpm durante 10 minutos. El pellet fue descartado mientras que los sobrenadantes de los tubos se pasaron a nuevos tubos Eppendorf y se añadieron 400 µl de isopropanol. Luego de 30 inversiones, se incubaron toda la noche a -20°C. Posteriormente, se llevaron a centrifugar a 13,000 rpm, por 10 minutos, y los sobrenadantes se descartaron, manteniendo los pellets dentro de los tubos. Cada pellet fue lavado con 400 µl de etanol al 70%, y se volvió a centrifugar las muestras con las mismas

condiciones. Finalmente, se descartaron los sobrenadantes y se dejaron las tapas de los tubos Eppendorf abierta con el fin de permitir que el exceso de etanol se evaporara. Una vez que los pellets estuvieran secos, se añadió agua libre de nucleasas para solubilizar las muestras y se incubaron a 65°C por 20 minutos. Se resguardaron a -20°C para su posterior cuantificación y procesamiento para PCR.

### 5.3.2. PCR punto final

Se utilizó el protocolo propuesto por Annis *et al* (2004) para realizar la amplificación de los genes de Bd por PCR punto final. Se preparó un MasterMix utilizando 6.25 µl de DreamTaq (ThermoFisher, DreamTaq PCR Máster Mix 2X), 1 µl de cada cebador (Tabla 2). (proporcionados por el Laboratorio de Genómica de la Conservación) y 1.8 ul de agua libre de nucleasas.

**Tabla 2. Cebadores**

|      |                               |
|------|-------------------------------|
| Bd1a | 5' - CAGTGTGCCATATGTCACG - 3' |
| Bd2a | 5' - CATGGTTCATATCTGTCCAG 3'  |

Se enumeraron los tubos para PCR y de forma individual se añadieron 8 µl del MasterMix. Después, se añadieron 2 µl de cada muestra (equivalente a >10 ng DNA) a cada tubo. De manera independiente se prepararon dos controles: a) control positivo, proporcionado por el Laboratorio de Genómica de la Conservación, y del cual se utilizaron 2 µl (equivalentes a 10 ng DNA); b) control negativo, para el que se utilizaron 2 µl de agua libre de nucleasas. En la tabla 3 se describen las condiciones y ciclos utilizados para la reacción de PCR.

**Tabla 3. Condiciones del termociclador para la reacción de PCR.**

| <b>Etapas</b> | <b>Condiciones</b>     | <b>Tiempo</b> |
|---------------|------------------------|---------------|
| 1             | 94°C                   | 10 min        |
| 2             | 95°C                   | 45 seg        |
| 3             | 60°C                   | 45 seg        |
| 4             | 72°C                   | 1 min         |
|               | Pasos 1 a 4 se repiten | [35 ciclos]   |
| 5             | 72°C                   | 10 min        |
| 6             | 4°C                    | ∞             |

En el Laboratorio de Genómica de la Conservación se visualizaron los productos de PCR en electroforesis de gel de agarosa. Estos se prepararon con 0.9 g de agarosa en polvo con 45 ml de TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0). El orden en el que fueron colocadas los reactivos dentro de los pocillos fue de izquierda a derecha, siendo el marcador molecular, seguido del control positivo, el control negativo y el resto de las muestras. La potencia usada fue de 78 V durante una hora. Al finalizar la corrida, las bandas se visualizaron en un transiluminador UV. Las presencias de bandas de un peso de 300 pb indicarían un resultado positivo a Bd.

Las muestras procesadas para PCR en el ITESM fueron amplificadas bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Los productos obtenidos se visualizaron en electroforesis capilar (QSEP400, Bioptic Inc.) colocando 10 µl de volumen final (2 µl + 8 µl de agua libre de nucleasas). Se designaron dos marcadores moleculares y dos controles: a) LM equivalente a 20 pares de bases; b) UM equivalente a 5000 pares de bases; c) Control positivo; d) Control negativo equivalente a agua libre de nucleasas, respectivamente. Al concluir el proceso, desde el QSEP400 se elaboró un reporte para su posterior análisis. Las presencias de picos de alrededor 300 pb indicarían resultados positivos a la secuencia esperada de Bd.

## **5.4. Modelado de Nicho Ecológico (MNE)**

### **5.4.1. Datos de presencia de las especies**

Los registros globales de Bd fueron obtenidos a través de la plataforma Amphibian Diseases (<https://amphibiandisease.org/>; Mayo, 2024), mientras que los registros globales para las dos especies reservorios (*Lithobates catesbeianus* y *Rhinella horribilis*) se descargaron desde GBIF (<https://www.gbif.org/es/>; Febrero, 2024).

Se hizo la depuración y limpieza de las ocurrencias en Microsoft Office Excel 2016, descartando los datos que estuviesen incompletos y eliminando registros que tuvieran una precisión mayor a un kilómetro. Posteriormente en RStudio se terminaron de eliminar

registros que estuvieran duplicados y que tuvieran una distancia menor a diez kilómetros entre cada uno.

Se obtuvieron 268 ocurrencias de *B. dendrobatidis* distribuidas en el mundo, mientras que los 4647 registros de *L. catesbeianus* y 1893 de *R. horribilis* se utilizaron con base en su distribución nativa.

#### **5.4.2. MNE y mapas de distribución**

Los Modelos de Nicho Ecológico (MNE) se calcularon utilizando el algoritmo de Máxima Entropía (MaxEnt), debido a que proporciona una estimación precisa de la idoneidad ecológica y geográfica de las especies (Phillips *et al.*, 2006; Rivera *et al.*, 2021), por medio del software RStudio (v2023.12.0) haciendo uso el paquete “dismo” (Sillero *et al.*, 2023; Hijmans *et al.*, 2023).

Se descargaron las 19 variables bioclimáticas (Tabla 4) y las variables de proyección climática futura (2041-2060) del Modelo Climático Global (GCM) ACCESS-CM2 con la Ruta Socioeconómica Compartida (SSP) ssp370 de WorldClim (v 2.1; <http://worldclim.org/>, Mayo, 2024). Ambas en una resolución espacial de 2.5 minutos.

**Tabla 4. Descripción de las variables bioclimáticas**

| <b>Variable</b> | <b>Descripción</b>                          |
|-----------------|---|
| BIO1            | Temperatura media anual                     |
| BIO2            | Rango diurno medio                          |
| BIO3            | Isotermalidad (BIO2/BIO7)                   |
| BIO4            | Estacionalidad de temperatura               |
| BIO5            | Temperatura máxima del trimestre más cálido |
| BIO6            | Temperatura mínima del mes más frío         |
| BIO7            | Rango anual de temperatura                  |
| BIO8            | Temperatura media del trimestre más húmedo  |
| BIO9            | Temperatura media del cuarto más seco       |
| BIO10           | Temperatura media del trimestre más cálido  |
| BIO11           | Temperatura media del cuarto más frío       |
| BIO12           | Precipitación anual                         |
| BIO13           | Precipitación del mes más húmedo            |
| BIO14           | Precipitación del mes más seco              |
| BIO15           | Estacionalidad de precipitación             |
| BIO16           | Precipitación del trimestre más húmedo      |
| BIO17           | Precipitación del trimestre más seco        |
| BIO18           | Precipitación del trimestre más cálido      |
| BIO19           | Precipitación del trimestre más frío        |

Una vez obtenidos los modelos de cada especie se proyectaron hacia el área geográfica, la cual era México. Se destacó la división de Nuevo León como área de interés, una vez proyectados los modelos. Estos primeros productos permitieron visualizar las zonas con mayor idoneidad para cada especie en el estado y en las provincias fisiográficas que lo componen.

Posteriormente, con estas primeras proyecciones se hicieron mapas binarios del patógeno y las dos especies reservorio para simplificar la información, en donde 0 es la ausencia y 1 es la presencia de la especie.

Los mapas binarios de Bd se conjuntaron con los mapas binarios y *L. catesbeianus* y *R. horribilis*. Los nuevos productos permitieron agrupar los sitios de idoneidad en tres categorías: a) donde no existe idoneidad para ninguna especie (= 0), b) en donde se

presenta idoneidad para alguna de las dos especies (= 1) y, c) en donde existen las condiciones idóneas para ambas especies (= 2). Esto mismo se realizó para la distribución bajo proyecciones climáticas futuras.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Colecta de muestras

Se colectaron 54 muestras de ocho especies de anuros y una especie de salamandra, que en conjunto representan seis familias de anfibios. La familia con mayor representación fue Bufonidae con tres especies que, a su vez, tuvieron la mayor cantidad de muestras colectadas: *Incilius nebulifer* con 15 individuos en tres sitios, seguido de *Rhinella horribilis* con 12 individuos en dos sitios y *Anaxyrus punctatus* con 10 individuos en un único sitio. Por su parte, las especies con menor representación fueron *Aquiloerycea galeanae*, *Rheohyla miotympanum*, *Smilisca baudinii* y *Eleutherodactylus campi* (Tabla 5).

**Tabla 5.** Especies colectadas

| Sitio                                      | Especie                        | Familia             | Individuos | ID Muestras |
|--|--------------------------------|---------------------|------------|-------------|
| Higueras                                   | <i>Rhinella horribilis</i>     | Bufonidae           | 10         | 1-10        |
|  | <i>Incilius nebulifer</i>      | Bufonidae           | 6          | 11-16       |
|  | <i>Lithobates berlandieri</i>  | Ranidae             | 4          | 17-20       |
|  | <i>Scaphiopus couchii</i>      | Scaphiopodidae      | 4          | 21-24       |
|  | <i>Smilisca baudinii</i>       | Hylidae             | 1          | 25          |
| Allende                                    | <i>Incilius nebulifer</i>      | Bufonidae           | 6          | 26-31       |
|  | <i>Eleutherodactylus campi</i> | Eleutherodactylidae | 1          | 32          |
|  | <i>Rhinella horribilis</i>     | Bufonidae           | 2          | 33-34       |
| Galeana                                    | <i>Anaxyrus punctatus</i>      | Bufonidae           | 10         | 35-44       |
|  | <i>Aquiloerycea galeanae</i>   | Plethodontidae      | 3          | 45-47       |
|  | <i>Lithobates berlandieri</i>  | Ranidae             | 2          | 48-49       |
| Cadereyta                                  | <i>Incilius nebulifer</i>      | Bufonidae           | 3          | 50-52       |
| Cascadas del Cerro de la Silla (Guadalupe) | <i>Rheohyla miotympanum</i>    | Hylidae             | 2          | 53-54       |



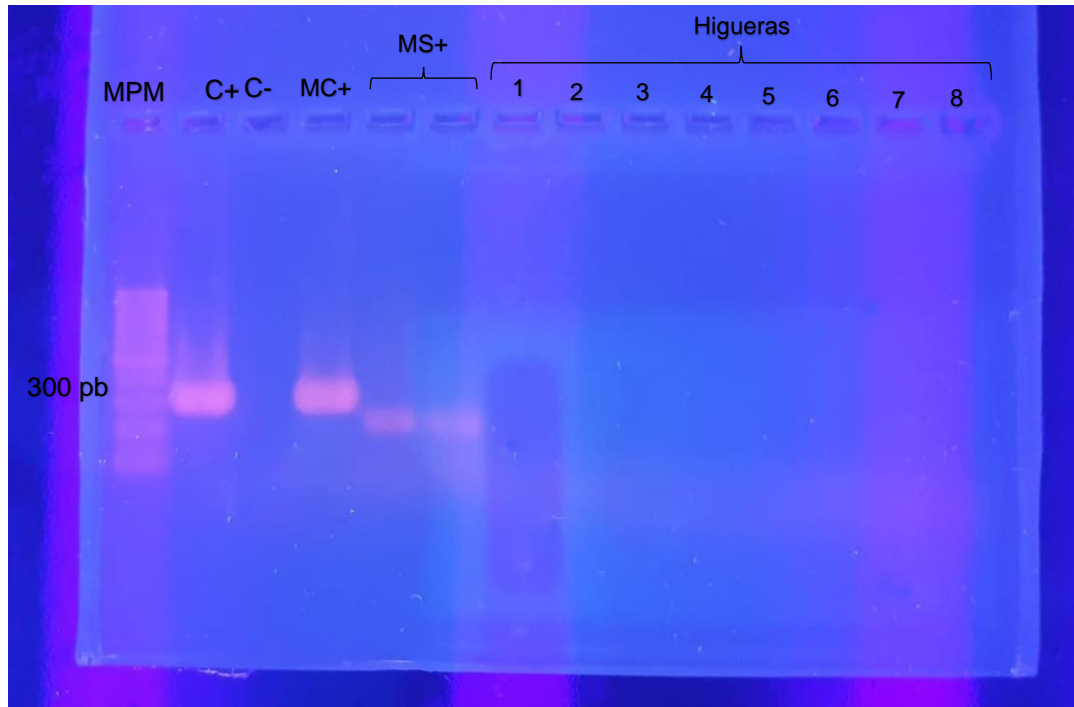
Los diez ejemplares de *A. punctatus* y uno de *L. berlandieri* estaban en su fase metamórfica, mientras que el resto de los ejemplares eran adultos. De igual forma, ninguno de los individuos presentaba signos aparentes de la enfermedad, sin embargo, un individuo de *A. punctatus* mostraba una posible mal formación en el desarrollo de sus patas anteriores (Figura 2).



**Figura 2. Ejemplar metamórfico de *A. punctatus* con posible mal formación.**

## **6.2. Productos de PCR para la detección de Bd**

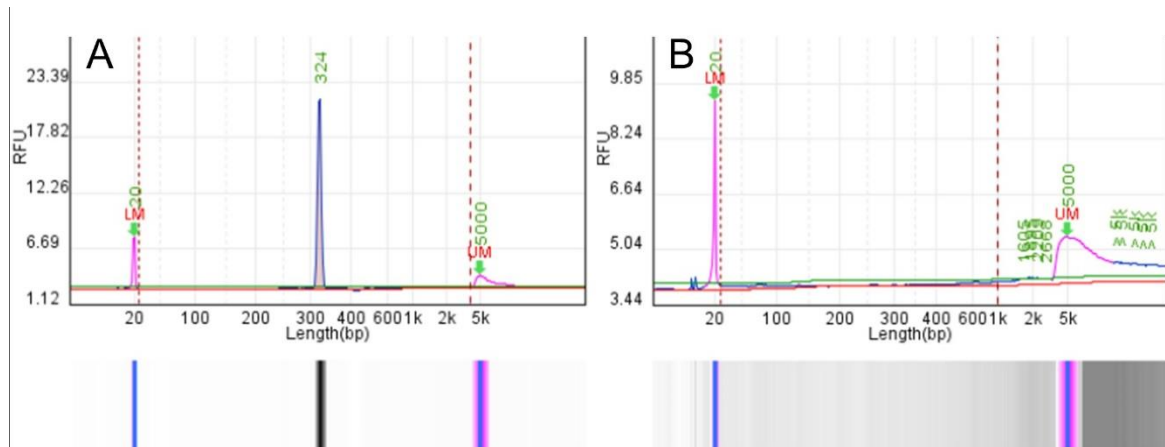
Las 54 muestras procesadas por PCR punto final resultaron negativas a la presencia de Bd. Con el fin de identificar visualmente las posibles amplificaciones resultantes de la PCR, los productos de reacción fueron cargados junto con muestras control (positivas a la amplificación de gen de Bd). El control positivo mostró una banda que indica la presencia del patógeno y, por tanto, el correcto funcionamiento del protocolo realizado. Sin embargo, en las muestras colectadas para este proyecto no se observó amplificación de producto, por lo que no se observó ninguna banda en el gel (Figura 3).



**Figura 3. Producto de electroforesis en gel de agarosa de ocho muestras colectadas.**

**MPM = Marcador de peso molecular; C+ = control positivo a Bd; C- = control negativo; MC+ = muestra positiva a Bd en ejemplar de cautiverio; MS+ = muestras positivas a Bd de ejemplares en vida libre; Higuera 1 al 8 = productos de PCR de las muestras de anfibios colectados en el estado de Nuevo León.**

De igual manera, los productos de la electroforesis capilar hechas en el ITESM tampoco mostraron ningún pico de amplificación que indicaran la presencia de genes del patógeno (Figura 4). En el apartado de Anexos se muestran el resto de los productos de la electroforesis capilar que se realizaron.

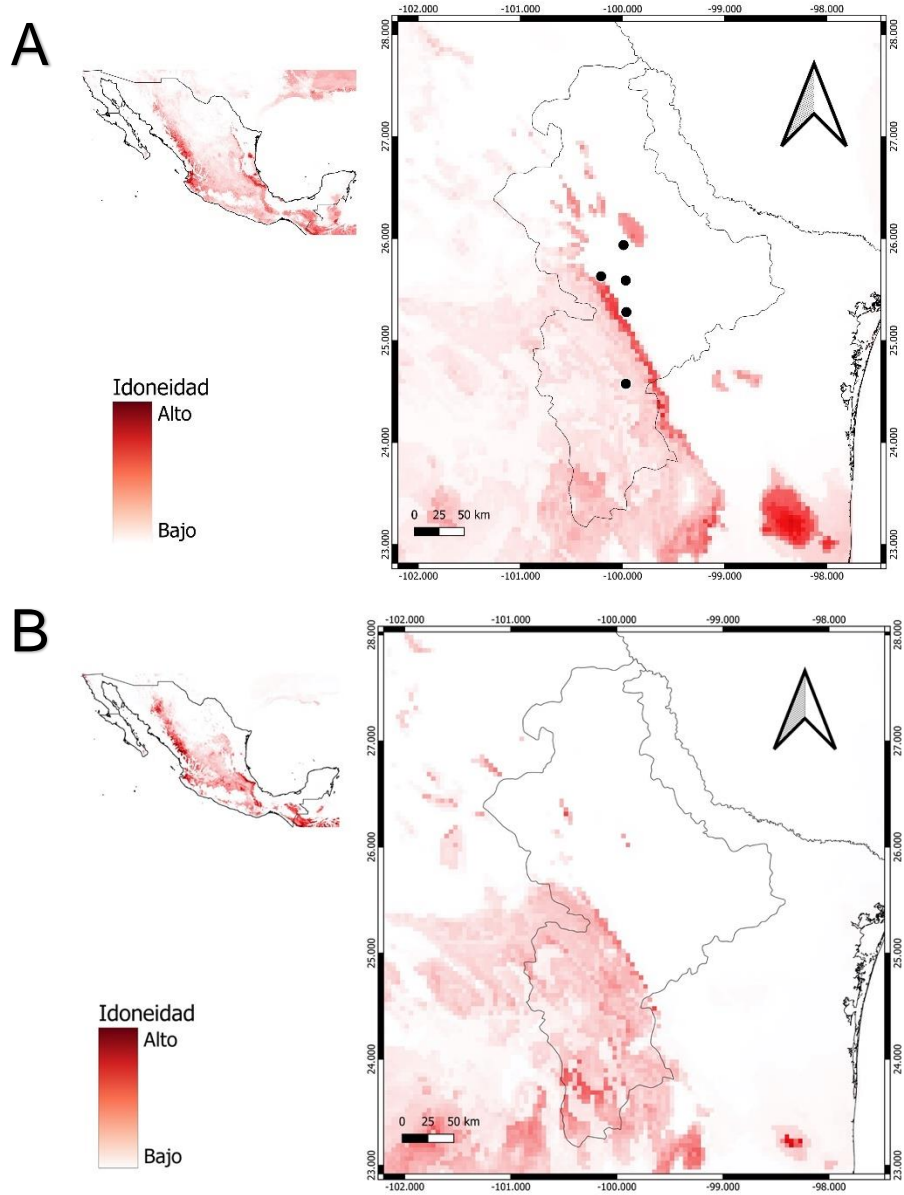


**Figura 4. Productos de electroforesis capilar. A) Control positivo a Bd, muestra la amplificación de un pico de 324 pb. B) Muestra negativa, no refleja ninguna amplificación. Los electroferogramas correspondientes a las muestras restantes se observan en el material anexo.**

### 6.3. Modelos de Nicho Ecológico

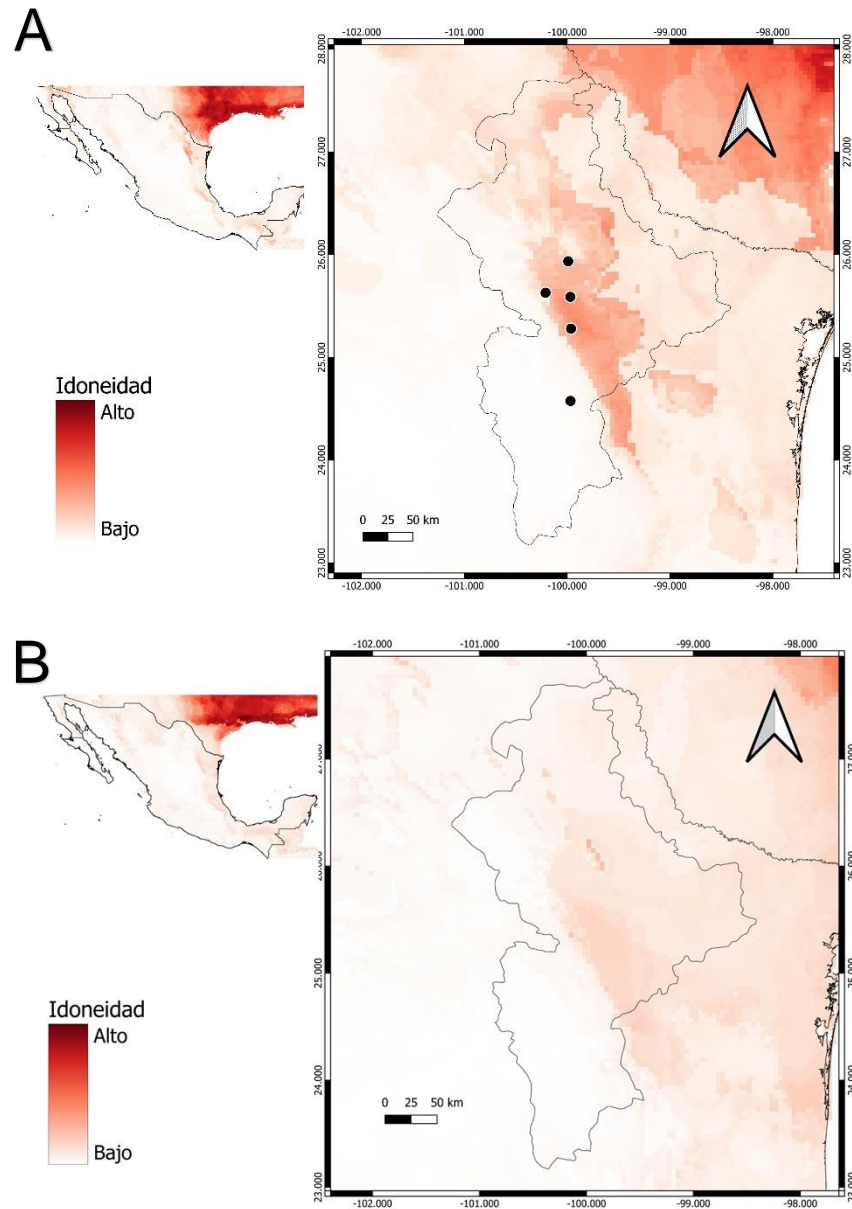
El Modelo de Nicho Ecológico de Bd obtuvo un valor de AUC de 0.85, mientras que los modelos de *L. catesbeianus* y *R. horribilis* mostraron valores de AUC de 0.88 y 0.87 respectivamente, lo que indica que los modelos tuvieron una calidad aceptable.

El MNE de Bd (Figura 4) indicó una idoneidad media en las zonas de la Provincia Sierra Madre Oriental (SMO) y parte de la Provincia Tamaulipeca (TAM). Mientras que hacia el sur del estado abarca también la Provincia del Desierto Chihuahuense (DC), pero con condiciones menos favorables para el patógeno. Sin embargo, esta distribución potencial se reduce bajo el escenario climático futuro. Solamente los puntos muestreados en Galeana y Monterrey corresponden a la distribución potencial de Bd, en donde la idoneidad se encuentra baja a media, respectivamente.



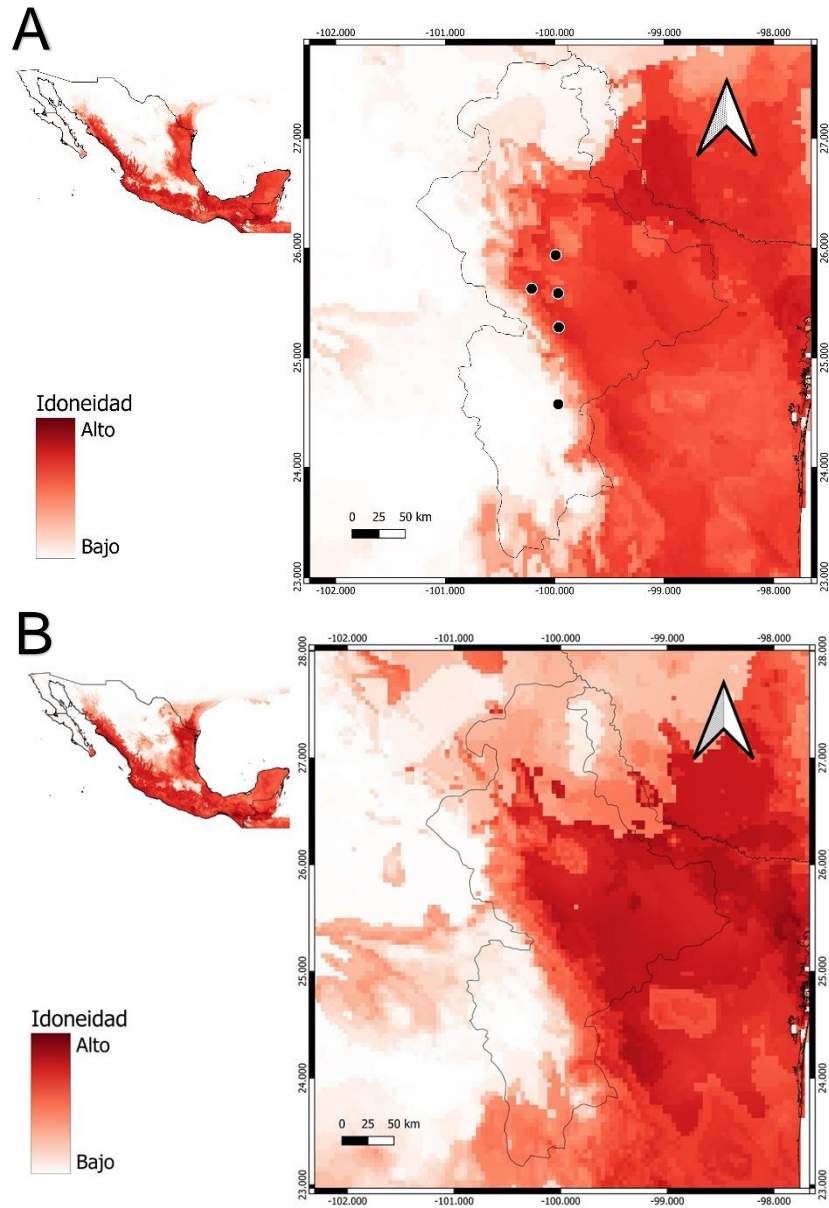
**Figura 5. Distribución potencial de *B. dendrobatidis*. A) Idoneidad con las variables bioclimáticas presentes con los sitios de muestreo. B) Idoneidad con las variables climáticas futuras.**

En el caso del MNE de *L. catesbeianus* (Figura 5) la idoneidad es aparentemente de baja a media en la Provincia TAM con las variables presentes. A excepción del sitio en Galeana, el resto de los puntos de muestreo abarcaron su distribución potencial. Aunque durante las salidas a campo no se observaron ejemplares de la especie. Al igual que Bd, las condiciones climáticas favorables se reducen para *L. catesbeianus* bajo el escenario climático futuro.



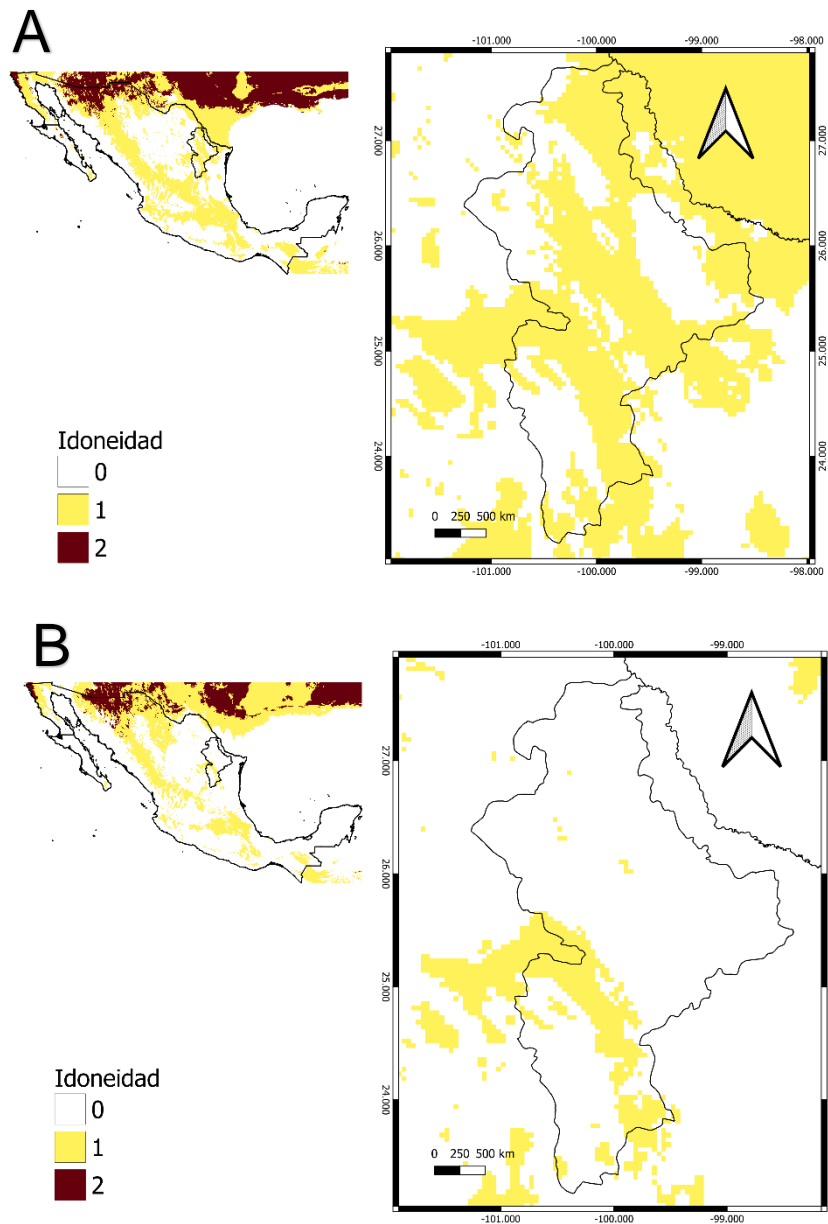
**Figura 6. Distribución potencial de *L. catesbeianus*. A) Idoneidad con las variables bioclimáticas presentes con los sitios de muestreo. B) Idoneidad con las variables climáticas futuras.**

La especie que resultó con un rango de distribución aparentemente mayor fue *R. horribilis* (Figura 6), abarcando la Provincia TAM y una parte de la Provincia SMO, la cual indicó una idoneidad de media a alta. Cuatro de los sitios de muestreo, exceptuando Galeana, abarcaron su distribución potencial. También *R. horribilis* fue la especie con más muestras colectadas. A diferencia de las otras dos especies, la distribución potencial bajo el escenario climático futuro incrementa, ahora incluyendo zonas del norte y sur del estado (parte de la Provincia DC), las cuales presentan una idoneidad de baja a media.



**Figura 7. Distribución potencial de *R. horribilis*. A) Idoneidad con las variables bioclimáticas presentes con los sitios de muestreo. B) Idoneidad con las variables climáticas futuras.**

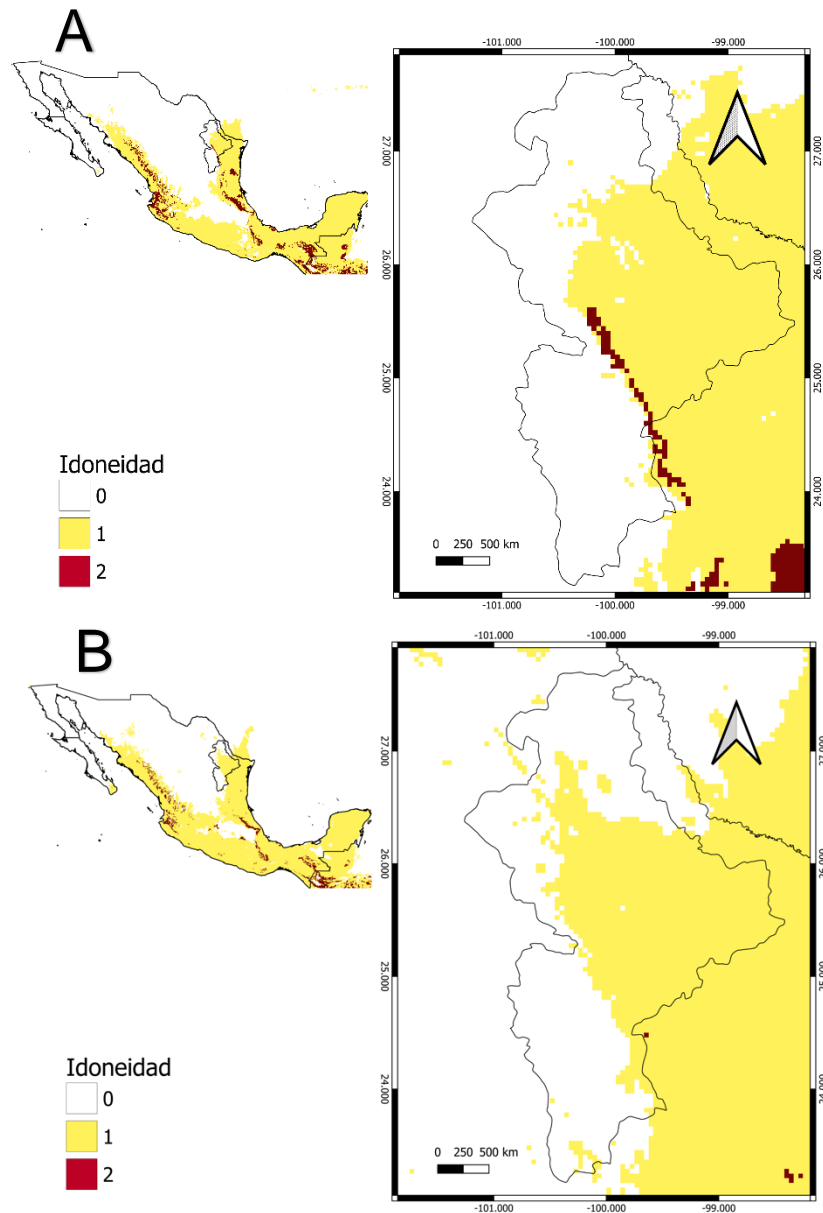
Una vez obtenidos los modelos, se procedió a simplificar la información en mapas binarios. En el caso de los sitios de correspondencia entre Bd y *L. catesbeianus* resultaron ser limitados, debido a que abarcan únicamente algunas zonas de la Provincia SMO y la Provincia TAM. En el escenario climático futuro las distribuciones se reducen, por tanto, el nivel de idoneidad entre ambas especies es bajo.



**Figura 8. Mapa binario de Bd y *L. catesbeianus*. (0 = Ninguna especie; 1 = Alguna de las dos especies; y 2 = Ambas especies). A) Idoneidad con las variables bioclimáticas presentes con los sitios de muestreo. B) Idoneidad con las variables climáticas futuras.**



En contraparte, *Bd* y *R. horribilis* presentan una mayor extensión de áreas en común, las cuales incluyen la Provincia SMO, la TAM y la DC en el extremo sur del estado. A pesar de que la idoneidad del hábitat de *Bd* se reduce a futuro, sigue manteniendo zonas de correspondencia con *R. horribilis*, contemplando aún la Provincia SMO y aumentando su idoneidad en la Provincia DC.



**Figura 9. Mapa binario de *Bd* y *R. horribilis*. (0 = Ninguna especie; 1 = Alguna de las dos especies; y 2 = Ambas especies). A) Idoneidad con las variables bioclimáticas presentes con los sitios de muestreo. B) Idoneidad con las variables climáticas futuras.**

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Colecta de muestras

Los anfibios presentan variaciones en su actividad a lo largo del año, dependiendo de diversos factores ambientales, como la estacionalidad, la temperatura, precipitaciones o la biología de la propia especie (Galoyan *et al.*, 2017). Por ejemplo, la salamandra *Plethodon cinereus* muestra su mayor actividad sobre la superficie del terreno cerca de los 13° C, temperatura ambiental, y cerca de los 800 mm de precipitación acumulada, pero disminuye considerablemente esa actividad en valores que salen de esos rangos (Sánchez *et al.*, 2020). En este sentido, es posible que los tiempos de muestro hayan estado fuera de los rangos óptimos de actividad de las diferentes especies, aunque para el caso de la salamandra *Aquiloemyza galeanae* las observaciones que se registraron durante el muestreo fueron similares con las reportadas por Parra-Olea *et al* (1999) dentro del mismo sitio de colecta. Es relevante señalar que, en Pablillo, en el área muestreada dentro del municipio de Galeana, presentaba modificaciones a causa de la ganadería, entrada de público general para acampar y la vegetación en la zona se encontraba seca, por lo que estos elementos pudieron influir en la presencia de los ejemplares.

Otra especie con baja cantidad de individuos colectados fue *Rheohyla. miotypanum*, que aparenta ser una especie frecuente de observar debido a la cantidad de ocurrencias que suelen registrar en la plataforma digital Naturalista (<https://mexico.inaturalist.org/>) y con respecto a lo reportado por Lazcano *et al* (2009), en donde encontraron 29 ejemplares dentro de la Sierra “Cerro de la Silla”. Considerando esto, y debido a las bajas temperaturas durante el muestreo (14°C), la actividad de los ejemplares era relativamente baja, por lo que el esfuerzo de búsqueda en el sitio pudo resultar insuficiente para obtener un mayor número de colectas.

En contraparte, una de las especies con mayor cantidad de avistamientos y colectas fue *Anaxyrus punctatus* en fase metamórfica. Uno de los ejemplares presentaba una posible malformación en la extremidad anterior derecha. Los registros de malformaciones en anfibios han ido incrementando en los últimos años (García y Schalk, 2020) que podrían estar relacionados errores durante el desarrollo embrionario (Cortés-Suárez, 2018), la

exposición a radiación UV, la contaminación, parásitos y enfermedades (Blaustein y Johnson, 2009; Sessions y Ballengée, 2010). A pesar de esto, la relación entre la malformación del ejemplar y la infección de Bd fue descartada al momento de procesar las muestras en el laboratorio. Sin embargo, es importante mencionar que individuos fueron encontrados en una charca temporal sin ningún tipo de cobertura vegetal, lo que provocaba mayor exposición a radiación solar, con residuos urbanos y de ganado, por lo que el conjunto de estos factores puede estar relacionado con el desarrollo de estos (Ankley *et al.*, 2004).

Otra especie que destacó durante los muestreos en campo fue *Rhinella horribilis*, anteriormente considerada como subespecie de *R. marina* hasta que Acevedo *et al* (2016) confirmaron la distinción genética y morfológica entre ambas, catalogando a *R. horribilis* como especie, al igual que delimitaron la distribución geográfica entre ambas, por lo que *R. horribilis* se encontrará desde la zona noroeste de Sudamérica hasta parte de Norteamérica. A pesar de estas diferencias, comparten características biológicas y ecológicas similares, como sus modos reproductivos explosivos particulares de la familia Bufonidae y poder alcanzar altas densidades en sus poblaciones a causa de que su desarrollo puede completarse en pocos días (Navarro-Salcedo *et al.*, 2020; Andrade-Soto *et al.*, 2022), por lo que esto pudo propiciar a que tuviera mayor presencia en los sitios muestreados. De igual manera, *R. horribilis* ha demostrado tener capacidad para adaptarse a distintas condiciones de perturbación o climas extremos (Andrade-Soto *et al.*, 2022; Duque-Amado y Megía-Palma, 2024) lo que la podría catalogar como una posible especie invasora y potencial reservorio de Bd, como *R. marina*, que en vida libre aparenta mantener cargas de infección bajas y no letales (Brannelly *et al.*, 2018a; Brannelly *et al.*, 2018b; Lampo, 2021).

## **7.2. Productos de PCR para la detección de Bd**

La ausencia del patógeno en las muestras colectadas puede deberse a diversos factores. En primer lugar, el bajo número de muestras presentado en este trabajo, en comparación con estudios previos sobre el hongo (Aceves-Hernández *et al.*, 2014; Zumbado-Ulate *et al.*, 2019; Nava-González *et al.*, 2019; Adams *et al.*, 2022), puede afectar la probabilidad

de detección del patógeno y por lo tanto se requería un mayor número de muestras. Sin embargo, trabajos previos han reportado el uso de 20 hasta 400 muestras de anfibios y en todos los casos han reportado muestras positivas (García-Feria *et al.*, 2019; Viáfara-Vega *et al.*, 2020) lo que sugiere que la detección del hongo no está en función directa del tamaño de la población muestreada y sugiere que la cantidad obtenida en el presente estudio puede resultar suficiente para la detección de quitridiomycosis. Aun así, resulta desable aumentar la cantidad de muestras de anfibios provenientes del Estado de nuevo León, tanto para comprobar la ausencia de casos positivos como para ampliar la zona de trabajo que aquí se muestra.

En segundo lugar, los resultados negativos a la detección de Bd también pueden concordar con lo sugerido por Villamizar-Gómez *et al.* (2015), en donde las poblaciones de anfibios presentan un sistema inmune resistente al patógeno. Por ejemplo, se ha reportado que algunos microorganismos simbióticos presentes en la piel de los anfibios tienen efectos antifúngicos, conocidos actualmente como “anti-Bd”, aunque la composición de la microbiota varía entre las especies y entre los diversos hábitats en los que se pueden encontrar, les permite eliminar o limitar el crecimiento de hongos patógenos (Woodhams *et al.*, 2007; Mutnale *et al.*, 2021). En especies resistentes a la infección tienden a presentar mayor diversidad de microbiota fúngica y mayor abundancia en ciertos géneros de microbiota bacteriana, lo que puede otorgar dicha resistencia a la enfermedad (Elmassry *et al.*, 2020; Kruger, 2020). Así mismo, las glándulas granulares (glándulas de veneno) que componen la piel de los anfibios, secretan diversos péptidos que juegan un papel fundamental como parte del sistema inmune innato y que pueden afectar el tiempo de desarrollo del patógeno, lo que se considera un factor adicional para contrarrestar el grado de infección (Rollins-Smith *et al.*, 2002; Gible *et al.*, 2007; Demori *et al.*, 2019).

Asimismo, la infección por Bd puede variar según la estacionalidad, siendo el invierno y otoño en donde la prevalencia del patógeno y la mortalidad de los huéspedes aumenta a comparación de estaciones más cálidas (Sonn *et al.*, 2019; Ruggeri *et al.*, 2020). A su vez, el microbioma y secreción de sustancias antifúngicas también cambia su composición y dinámica en las temporadas secas o durante los meses más fríos (Ruthsatz *et al.*, 2020; Rosa *et al.*, 2022). En estas épocas del año, los anfibios tienen una mayor acumulación y

almacenamiento de péptidos como un posible mecanismo de prevención (Le Sage *et al.*, 2020). Esto sugiere, por un lado, que las poblaciones de anfibios presentes en el estado poseen un sistema inmunológico y microbiota eficiente para contrarrestar la quitridiomycosis y, por otro lado, que la marcada estacionalidad de la región (con temporadas frías, secas y lluviosas muy marcadas) y las condiciones ambientales (cambios de temperaturas y niveles de humedad muy marcados) puedan influir en la carga zoosporica del patógeno y, por tanto, en una baja incidencia.

En tercer lugar, el método de detección también puede mostrar limitaciones. La PCR punto final, a diferencia de la PCR tiempo real, muestra menor sensibilidad de detección (Annis *et al.*, 2004; Boyle *et al.*, 2004). Durante el montaje de la PCR se utilizaron muestras previamente conocidas como positivas a Bd con el fin de verificar la eficiencia de detección, lo que corroboró los resultados positivos a la infección, generando confiabilidad en el proceso (Viáfara-Vega *et al.*, 2020). Sin embargo, se sugiere que en futuros estudios se busque la posibilidad de utilizar una técnica de PCR con mayor sensibilidad y fiabilidad para descartar falsos negativos, debido a que los ejemplares presenten un grado de infección bajo y que no es posible detectar con la PCR convencional (Kriger *et al.*, 2006).

### **7.3. Modelos de Nicho Ecológico**

Hasta hace unos años, se consideraba que Bd se mantenía en sitios con rango de temperatura de 17°C a 25°C y niveles altitudinales de 1,000 a 3,500 msnm, por lo que los estudios de detección y monitoreo se centraban en áreas con estas características (Mendoza-Almeralla *et al.* 2015). En la actualidad se ha registrado la presencia del hongo en regiones áridas o semiáridas (Roth *et al.*, 2024), en donde la temperatura ambiental puede alcanzar los 40°C, mientras que la temperatura de los escasos cuerpos de agua alcanza los 30°, mientras que los niveles altitudinales se sitúan por debajo de los 100 msnm (Luja *et al.*, 2012; Turner *et al.*, 2021; Roth *et al.*, 2023). Los Modelos de Nicho Ecológico (MNE) forman una poderosa herramienta para ubicar y delimitar las posibles zonas de presencia de una especie, considerando que las variables ambientales de las que se alimenta son el factor principal para ubicar a un taxón en el espacio (Cuervo-Robayo

et al., 2017). Sin embargo, estos modelos no consideran la participación de otros factores que, en conjunto, delimitan la capacidad de una especie para ocupar un espacio dado. Por ello, aunque la Sierra Madre Oriental representa un área con características idóneas para registrar Bd, como se ha mostrado en trabajos anteriores (Bolom-Huet *et al.*, 2019; Basanta *et al.*, 2019), la ausencia de muestras positivas a Bd sugiere la existencia de factores no ambientales (como podrían ser sistema inmune de hospederos o la competencia con otros patógenos) que limitan la presencia dentro de zonas de idoneidad. Además, otro punto importante es que dentro del estado existen barreras fisiográficas que pueden tener un papel fundamental con la dispersión del hongo, ya que las barreras ecológicas pueden delimitar la distribución y desplazamiento de los anfibios hospedadores (Sun *et al.*, 2023).

El MNE obtenido para *L. catesbeianus* tuvo diferencias con respecto a Becerra-López *et al.* (2017), sin embargo, ambos modelos abarcan áreas de la Provincia Tamaulipeca. Contrario a lo que se esperaba, el modelo no muestra sitios de correspondencia entre el patógeno y el huésped, tanto en proyecciones presentes como futuras (Rodder *et al.*, 2013). Se tiene bien documentado que la rana toro tiene una alta capacidad para adaptarse a distintas condiciones ambientales y hábitats, además, presenta características adecuadas para fungir como reservorio de Bd y, por tanto, potencial para transmitir enfermedades a los sitios donde son introducidas de manera intencional o accidental, incluyendo áreas con bajas elevaciones y de ambientes áridos (Luja *et al.*, 2012; Galindo-Bustos *et al.*, 2014; Becerra-López *et al.*, 2017). Aunque en los muestreos que se realizaron no hubo encuentros con *L. catesbeianus*, se tiene la reportada la presencia de la especie en Nuevo León (Nevárez-De Los Reyes *et al.*, 2016), por lo que no se debe descartar la posibilidad de infección en el área de estudio, ni restar importancia en el monitoreo de sus poblaciones de la rana toro actuales en futuros estudios. Además, podría ser relevante considerar a otra especie del mismo género, *L. berlandieri*, que también se encuentra en el estado (Lemos-Espinal *et al.*, 2016), aun cuando no hay documentación que sugiera que puede fungir como un reservorio del patógeno, es una especie con alta prevalencia de infección y, además, presenta capacidad de adaptarse a sitios nuevos, lo que permite ser una vía de entrada para el patógeno a nuevas zonas (Lovich *et al.*, 2008).

En cambio, en el caso de *Rhinella horribilis* aparenta ser un potencial reservorio y dispersor de Bd, debido a que dentro de la Sierra Madre Oriental hay algunas zonas de correspondencia entre ambas especies y que en las proyecciones climáticas futuras esta distribución aumenta. Dado que *R. horribilis* tiene gran tolerancia a ambientes cálidos y a un amplio nivel de precipitaciones anuales (0 a 800 mm<sup>3</sup>), puede beneficiar a que en las proyecciones futuras permita ampliar su rango de contacto con el patógeno (Sales *et al.*, 2021). Ahora bien, es importante mencionar que los sitios de traslape entre el patógeno y el huésped solo indican las áreas en las que ambas pueden encontrarse, ya que *R. horribilis* puede desplazarse hasta 1.8 km en una sola noche (Lampo, 2021) durante la época de reproducción, dándole la capacidad de moverse rápido para colonizar nuevas áreas (Phillips *et al.*, 2006), lo que puede permitir que el patógeno llegue a estas nuevas zonas de infección que este modelo propuesto no señala. Así mismo, en el estado se distribuyen otras especies de sapos, como *Anaxyrus cognatus*, *A. debilis*, *A. punctatus*, y *Scaphiopus couchii* (Lemos-Espinal *et al.*, 2016), los cuales suelen presentar ausencia de signos a la enfermedad, pero una prevalencia alta de casos positivos (Hernández-Martínez *et al.*, 2019). Esto supone que tanto la capacidad del huésped como los factores ambientales anteriormente mencionados influyen en la sobrevivencia de estas especies, lo que le permite al patógeno prevalecer en el medio.

Finalmente, a pesar de que ambas especies de anuros tienen la capacidad de afectar a la fauna nativa, ya sea depredándola o desplazándola (Boelter y Cechin, 2007; Lampo, 2021), *L. catesbeianus* y *R. horribilis* muestran pocos sitios de correspondencia en los modelos, posiblemente por la tendencia a habitar una gran diversidad de ecosistemas y eviten estar presentes en el mismo sitio a la vez, como un mecanismo de eludir la competencia por recursos entre ambas especies (Cruz-Cordovez *et al.*, 2020), lo que infiere que dentro del estado la dispersión del patógeno pueda darse principalmente por una de las dos especies hospedadoras, con mayor capacidad de dispersión y de resistencia al patógeno (Llewelyn *et al.*, 2010).

La disminución de la idoneidad en el hábitat del modelo de Bd, comparada con la reportada por (Xie *et al.*, 2016) puede ser debido a la biología y ecología del patógeno y, también a causa de los requerimientos para su persistencia en el medio, (Marmolejo-

Vargas *et al.*, 2023) como es el caso de los cuerpos de agua, la altitud, la temperatura y humedad. Sin embargo, la resistencia innata de las especies que ocupan la SMO es un fenómeno poco estudiado que también podría explicar este resultado. Por lo que el presente estudio sugiere que *R. horribilis* puede ser una vía que facilite la prevalencia de Bd en el medio, tanto en escenarios actuales como futuros, ya que en los puntos de encuentro pueden presentar características que beneficien la reproducción de ambas especies, como por ejemplo en ambientes con cuerpos de agua temporales o permanentes (Brannelly *et al.*, 2018).



## 8. CONCLUSIONES

Los estudios de detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* son necesarios para comprender su distribución y, aún más importante, continuar comprendiendo su ecología. Este proyecto descartó la presencia del patógeno, con apoyo de la técnica molecular PCR punto final, en algunas poblaciones de anfibios en el estado de Nuevo León.

Los Modelos de Nicho Ecológico proporcionan información útil para conocer zonas potenciales de infección que permitan enfocar futuros estudios de monitoreo en dichas zonas y, a su vez, tomar en cuenta especies reservorios que puedan beneficiar en la dispersión del hongo. Con base en esto, se sugiere a *Rhinella horribilis* como una especie reservorio y vector del patógeno debido a su adaptación a las diversas condiciones climáticas, su capacidad de movilidad y dispersión.

## 9. PERSPECTIVAS

El proyecto de investigación brinda apertura para derivar futuros enfoques de estudio y áreas de oportunidad para la conservación de los anfibios.

De manera particular, se requiere ampliar los sitios de estudio y, a la vez, aumentar el esfuerzo de muestreo, con el fin de incrementar el número de muestras y especies colectadas.

Las zonas potenciales para la colecta de muestras deben estar enfocadas hacia el altiplano del norte y las zonas montañosas del sur de Nuevo León, los cuales no se abarcaron en el proyecto. Dentro de las zonas se considera un amplio rango altitudinal, así como condiciones ambientales contrastes, ya que se considera importante tomar en cuenta la colecta de muestras durante las estaciones anuales, como la temporada de lluvias, de sequía e invierno.

Así mismo, las especies vectores o reservorios juegan un papel fundamental en la ecología del patógeno, por lo que se puede realizar Modelos de Nicho Ecológico de otras especies de anfibios, al igual que de invertebrados, aves y reptiles, que permitan la dispersión de las zoosporas del hongo.

De esta forma se puede determinar la dinámica estacional de la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en especies de anfibios y su dispersión a través de la fauna silvestre en Nuevo León.

## 10. ANEXOS

**Anexo 1.** La extracción de ADN se hizo con base en la siguiente metodología: a los tubos Eppendorf que contenían las muestras, se les añadieron 400 µl de buffer de lisis (Qiagen, Puregene Cell Lysis Solution), se agitaron utilizando un vórtex por 20 segundos y se incubaron a 70°C en baño maría durante 20 minutos. Se les añadieron 7 µl de Proteinasa K (Qiagen, Proteinase K Solution 20mg/ml) y se dejaron incubando nuevamente a 56°C durante toda la noche. Se retiraron los hisopos de los tubos Eppendorf. A cada tubo se le añadieron 135 µl de buffer de precipitación de proteínas (Qiagen, Puregene Protein Precipitation Solution), agitándolos en un vórtex por 40 segundos y centrifugándolos a 13,000 rpm durante 10 minutos. El pellet fue descartado mientras que los sobrenadantes de los tubos se pasaron a nuevos tubos Eppendorf y se añadieron 400 µl de isopropanol. Se les dieron 30 inversiones y se incubaron toda la noche a -20°C.

Se centrifugaron a 13,000 rpm, por 10 minutos, y los sobrenadantes se descartaron, manteniendo los pellets dentro de los tubos. Cada pellet fue lavado con 400 µl de etanol al 70%, y se volvió a centrifugar las muestras con las mismas condiciones. Finalmente, se descartaron los sobrenadantes y se dejaron los tubos Eppendorf con la tapa abierta para que el etanol se evaporara por completo. Al terminar, se añadió agua libre de nucleasas para solubilizar las muestras y se incubaron a 65°C por 20 minutos. Se resguardaron a -20°C para su posterior cuantificación y procesamiento para PCR.

Con base en el protocolo propuesto por Annis *et al* (2004) se realizó la amplificación de los genes de Bd por PCR punto final. Se preparó un MasterMix utilizando 6.25 µl de DreamTaq (ThermoFisher, DreamTaq PCR Máster Mix 2X), 1 µl de cada cebador (Tabla 2) y 1.8 µl de agua libre de nucleasas.

**Tabla complementaria 1. Cebadores.**

|      |                               |
|------|-------------------------------|
| Bd1a | 5' - CAGTGTGCCATATGTCACG - 3' |
| Bd2a | 5' - CATGGTTCATATCTGTCCAG 3'  |

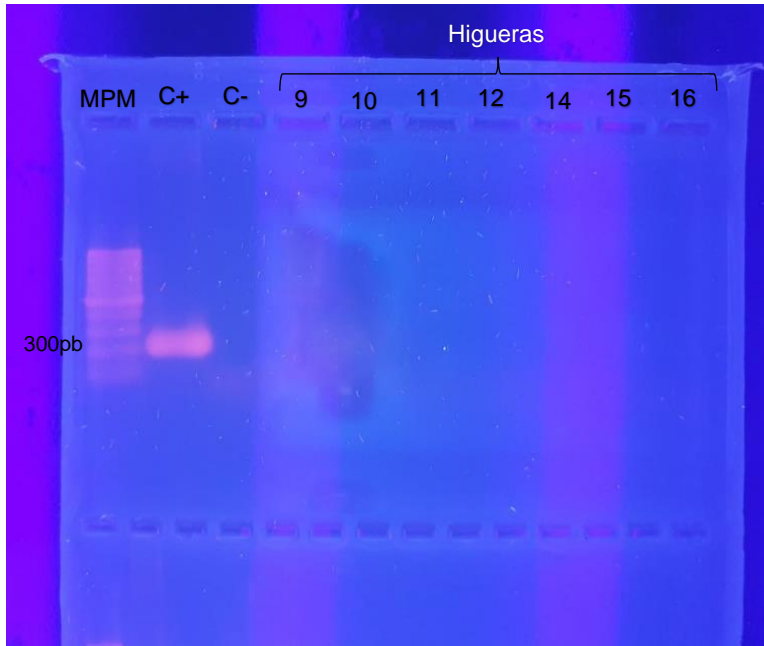
En tubos de PCR, de forma individual se añadieron 8 µl del MasterMix. Después, se añadieron 2 µl de cada muestra (equivalente a >10 ng DNA) a cada tubo y de manera individual se prepararon dos controles: a) control positivo (proporcionado por el Laboratorio de Genómica de la Conservación) y b) control negativo, hecho con agua libre de nucleasas. De ambos se añadieron 2 µl a cada tubo. En la tabla complementaria 2 se detallan las condiciones y ciclos utilizados para la reacción de PCR.

**Tabla complementaria 2.** Condiciones del termociclador para la reacción de PCR.

| <b>Etapas</b> | <b>Condiciones</b>     | <b>Tiempo</b> |
|---------------|------------------------|---------------|
| 1             | 94°C                   | 10 min        |
| 2             | 95°C                   | 45 seg        |
| 3             | 60°C                   | 45 seg        |
| 4             | 72°C                   | 1 min         |
|               | Pasos 1 a 4 se repiten | [35 ciclos]   |
| 5             | 72°C                   | 10 min        |
| 6             | 4°C                    | ∞             |

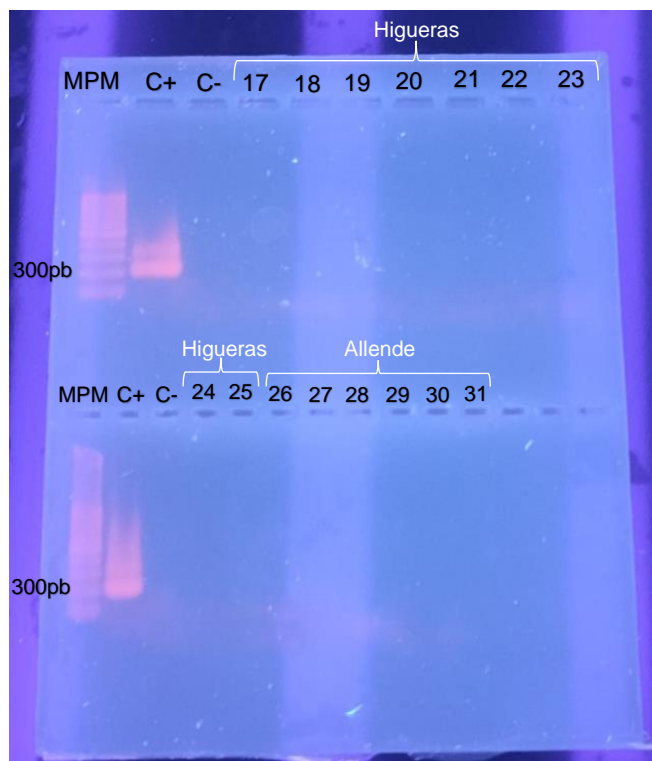
En el Laboratorio de Genómica de la Conservación se visualizaron los productos de PCR en electroforesis de gel de agarosa. Estos se prepararon con 0.9 g de agarosa en polvo con 45 ml de TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0). El orden en el que fueron colocados los reactivos y las muestras se indican en la Figura complementaria 1 y 2. La potencia usada fue de 78 V durante una hora. Al concluir, las bandas se visualizaron en un transiluminador UV. Las presencias de bandas de un peso de 300 pb indicarían un resultado positivo a Bd.

Los productos de las electroforesis se muestran a continuación, siguiendo el número asignado para cada muestra y los sitios de colecta que se mencionan en la Tabla 5 de la sección de Resultados.



**Figura complementaria 1.**

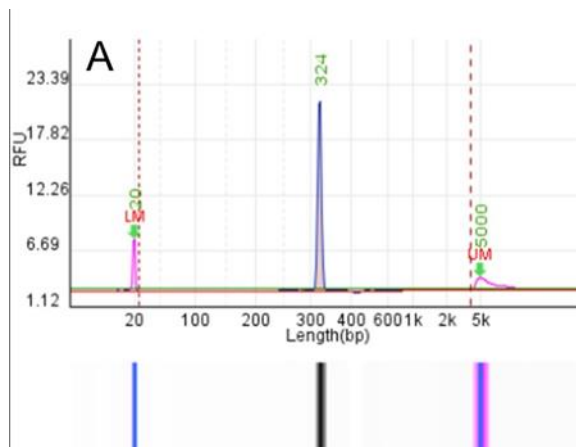
MPM = Marcador de peso molecular; C+ = control positivo a Bd; C- = control negativo; Higuera 9 a 16 = productos de PCR de las muestras de anfibios colectados en el estado de Nuevo León.



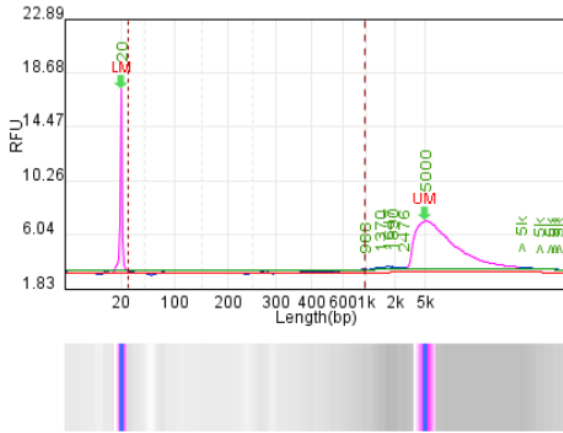
**Figura complementaria 2.**

MPM) Marcador de peso molecular; C+) control positivo a Bd; C-) control negativo; 17-25) = productos de PCR de las muestras colectadas en Higueras; 26-31) productos de PCR de muestras colectadas en Allende.

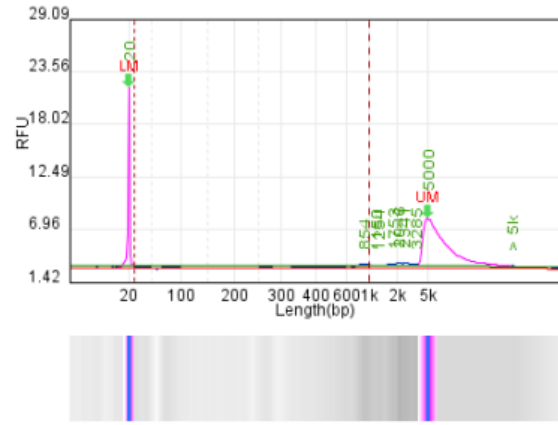
**Anexo 2.** Las 23 muestras procesadas para PCR en el ITESM fueron amplificadas bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. En este caso, los productos obtenidos se visualizaron por medio de electroforesis capilar (QSEP400, Bioptic Inc.) colocando 10 µl de volumen de los productos de PCRSe designaron dos marcadores moleculares y dos controles: a) LM equivalente a 20 pares de bases; b) UM equivalente a 5000 pares de bases; c) Control positivo, secuencia de Bd; d) Control negativo equivalente a agua libre de nucleasas. Al concluir el proceso, desde el QSEP400 se elaboró un reporte final para su posterior análisis. Las presencias de picos de alrededor 300 pb indicarían resultados positivos a la secuencia esperada de Bd. Con base en el número asignado para cada muestra y los sitios de colectada que se mencionan en la Tabla 5 de la sección de Resultados, se desglosan los siguientes productos de la electroforesis capilar a continuación: Figuras complementarias 3 a 26, las cuales señalan el control positivo y el resto de las muestras colectadas en los distintos puntos de muestreo.



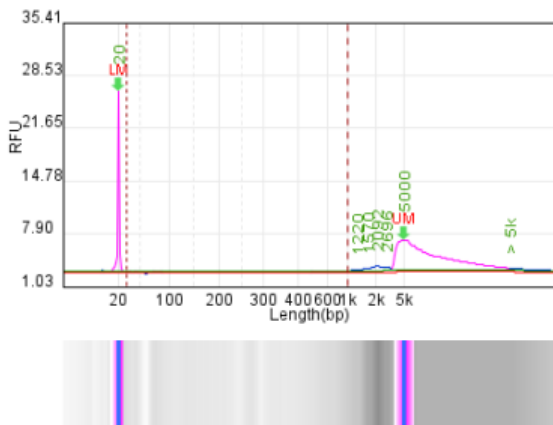
**Figura complementaria 3.** Producto de electroforesis capilar: Control + de Bd.



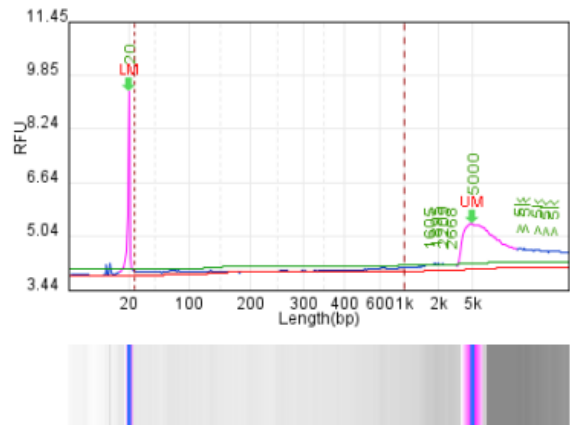
**Figura complementaria 4.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 32 de *Scaphiopus couchii* colectada en Allende.



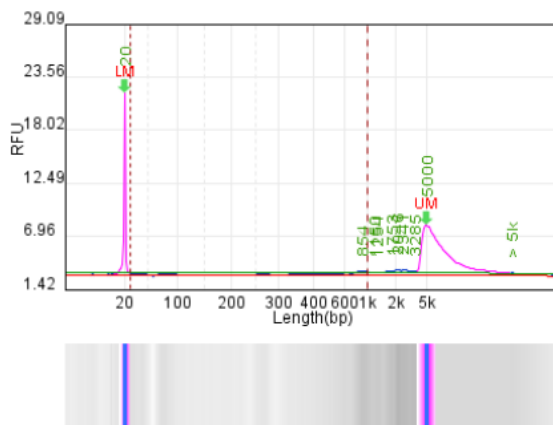
**Figura complementaria 5.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 33 de *Rhinella horribilis* colectada en Allende.



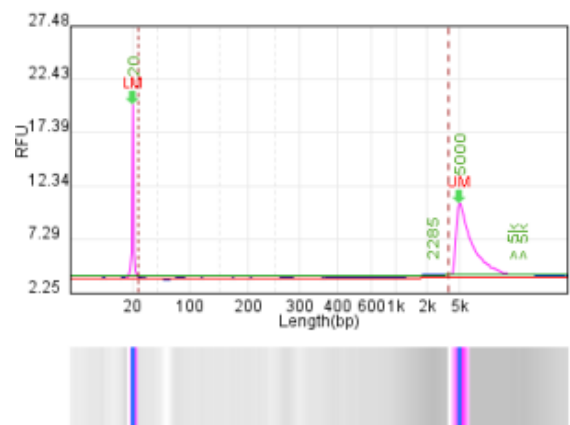
**Figura complementaria 6.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 34 de *Rhinella horribilis* colectada en Allende.



**Figura complementaria 7.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 35 de *Anaxyrus punctatus* colectada en Galeana.

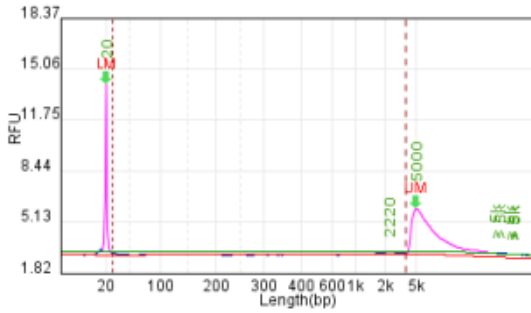


**Figura complementaria 8.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 36 de *Anaxyrus punctatus* colectada en Galeana.

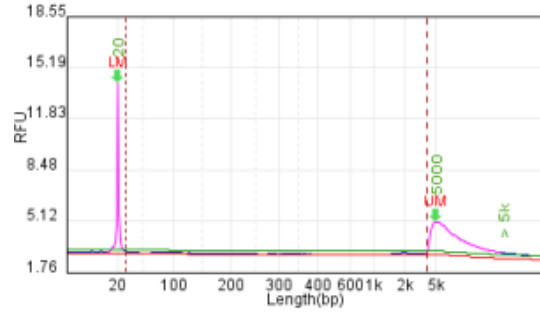


**Figura complementaria 9.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 37 de *Anaxyrus punctatus* colectada en Galeana.

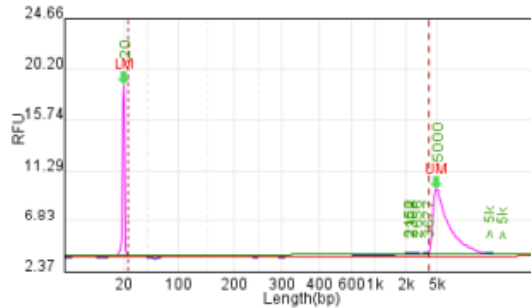




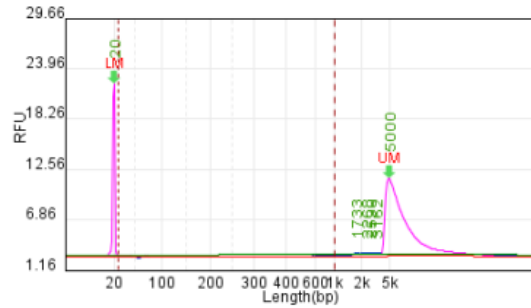
**Figura complementaria 10.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 38 de *Anaxyrus punctatus* colectada en Galeana.



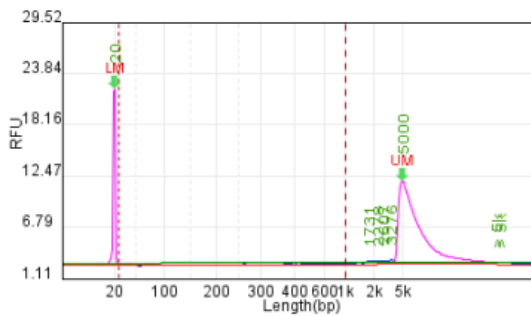
**Figura complementaria 11.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 39 de *Anaxyrus punctatus* colectada en Galeana.



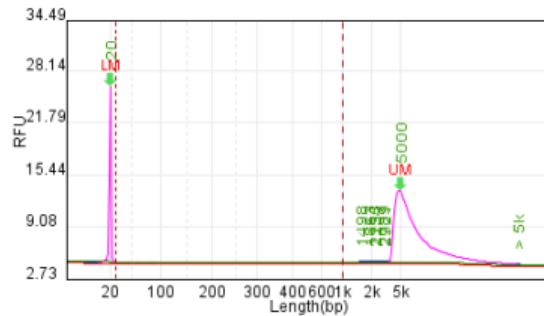
**Figura complementaria 12.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 40 de *Anaxyrus punctatus* colectada en Galeana.



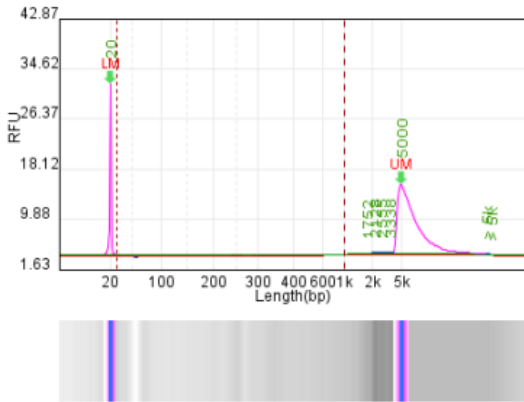
**Figura complementaria 13.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 41 de *Anaxyrus punctatus* colectada en Galeana.



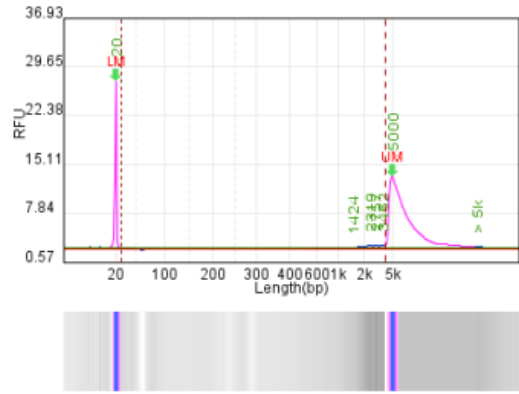
**Figura complementaria 14.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 42 de *Anaxyrus punctatus* colectada en Galeana.



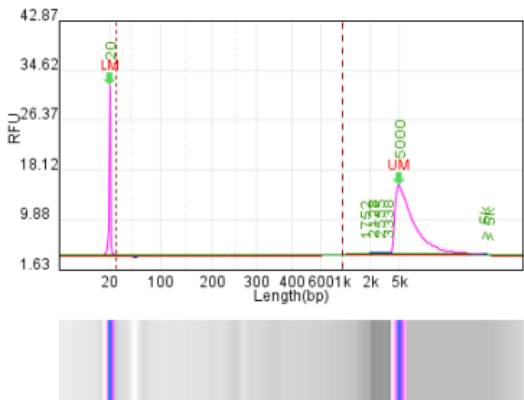
**Figura complementaria 15.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 43 de *Anaxyrus punctatus* colectada en Galeana.



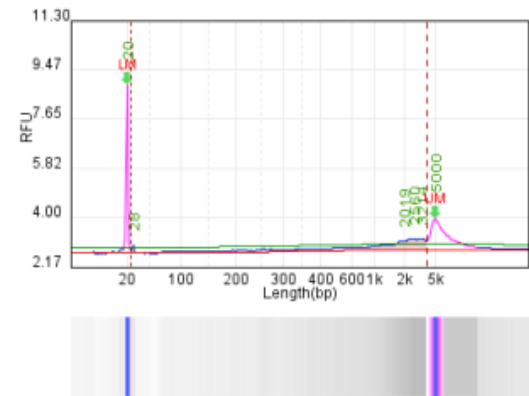
**Figura complementaria 16.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 44 de *Anaxyrus punctatus* colectada en Galeana.



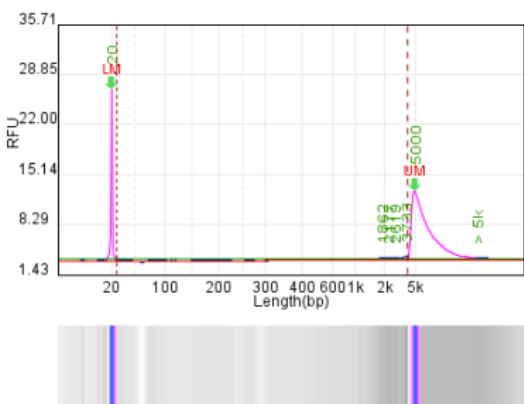
**Figura complementaria 17.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 45 de *Aquiloerycea galeanae* colectada en Galeana.



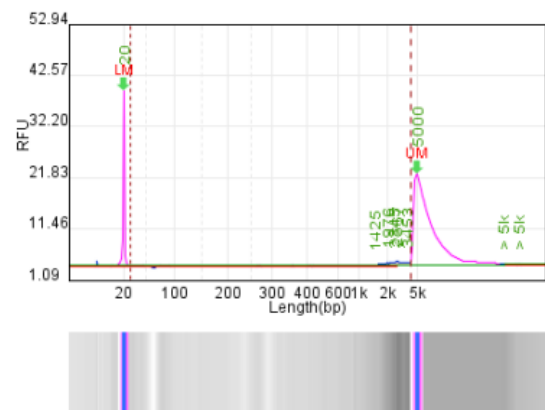
**Figura complementaria 18.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 46 de *Aquiloerycea galeanae* colectada en Galeana.



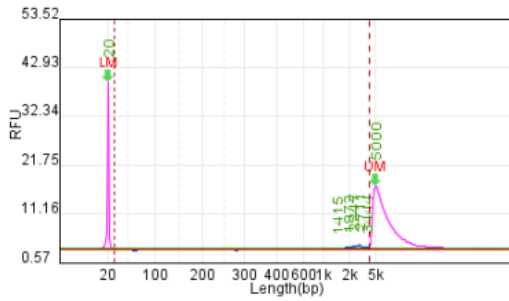
**Figura complementaria 19.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 47 de *Aquiloerycea galeanae* colectada en Galeana.



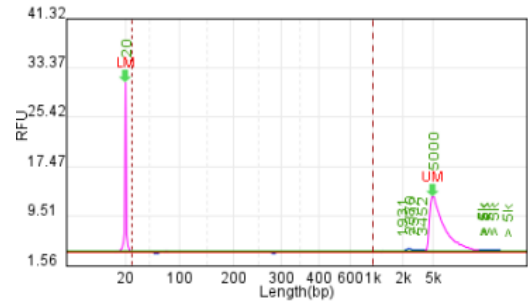
**Figura complementaria 20.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 48 de *Lithobates berlandieri* colectada en Galeana.



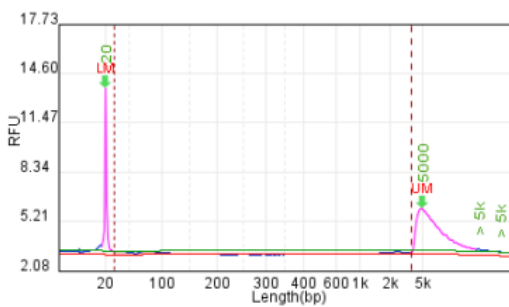
**Figura complementaria 21.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 49 de *Lithobates berlandieri* colectada en Galeana.



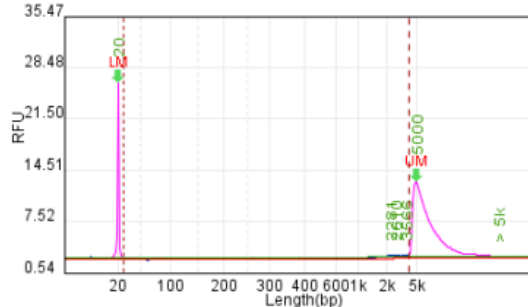
**Figura complementaria 22.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 50 de



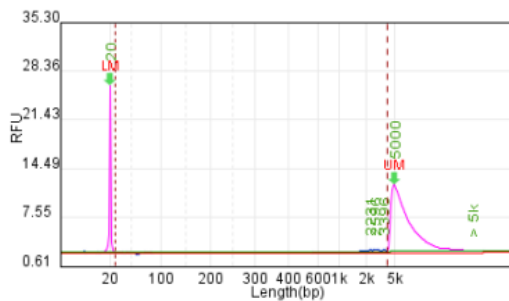
**Figura complementaria 23.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 51 de



**Figura complementaria 24.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 52 de *Incilius nebulifer* colectada en Cadereyta.



**Figura complementaria 25.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 53 de *Rheohyla miotympanum* colectada en Cascadas del Cerro de la Silla (Guadalupe).



**Figura complementaria 26.** Producto de electroforesis capilar: Muestra 54 de *Rheohyla miotympanum* colectada en Cascadas del Cerro de la Silla (Guadalupe).

## 11. REFERENCIAS

- Acevedo, A., Lampo, M. & Cipriani R. 2016. The cane or marine toad, *Rhinella marina* (Anura, Bufonidae): two genetically and morphologically distinct species. *Zootaxa* 4103(6): 574-586. <http://doi.org/10.11646/zootaxa.4103.6.7>
- Aceves-Hernández, C.A., Monroy-Dosta, M.D.C., Partida, A.H., Ramírez-Torres, J.A., Mejía, G.C. & Andrade, R.D.L. 2014. Amphibian chytridiomycosis: a threat to global biodiversity. *Int J. of Aquatic Science*, 5(1): 94-109.
- Adams, A., Peralta-García, A., Flores-López, C.A., Valdez-Villavicencio, J.H. & Briggs CJ. 2022. High fungal pathogen loads and prevalence in Baja California amphibian communities: The importance of species, elevation, and historical context. *Global Ecology and Conservation* 33. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2021.e01968>
- Aguillón-Gutiérrez D.A. 2018. Mecanismos de adaptación ecofisiológica de anfibios anuros a zonas áridas. *ÁridoCiencia*, 3(2): 3-11.
- Aguirre-Muñoz A, Mendoza-Alfaro R, *et al.* 2009. Especies exóticas invasoras: impactos sobre las poblaciones de flora y fauna, los procesos ecológicos y la economía, en *Capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio*. CONABIO, México, pp. 277-318.
- Amphibia Web. 2024a. University of California, Berkeley, CA, USA. <https://amphibiaweb.org/>
- Amphibia Web. 2024b. Amphibians of Mexico. University of California, Berkeley, CA, USA. [https://amphibiaweb.org/cgi/amphib\\_query?rel-isocc=like&orderbyaw=Order&where-isocc=Mexico](https://amphibiaweb.org/cgi/amphib_query?rel-isocc=like&orderbyaw=Order&where-isocc=Mexico)
- Ankley, G.T., Degitz, S.J., Diamond, S.A. & Tietge, J.E. 2004. Assessment of environmental stressors potentially responsible for malformations in North American anuran amphibians. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58(1). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.01.004>

- Annis, S.L., Dastoor, F.P., Ziel, H., Daszak, P. & Longcore, J.E. 2004. A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases* 40(3).
- Basanta, M.D., Byrne, A.Q., Rosenblum, E.B., Piovra-Scott J. & Parra-Olea G. 2021. Early presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Mexico with a contemporary dominance of the global panzootic lineage. *Mol Ecol* 30(2): 424-437.
- Basanta, M.D., Rebollar, E.A. & Parra-Olea G. 2019. Potential risk of *Batrachochytrium salamandrivorans* in Mexico. *PLoS ONE* 14(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211960>
- Basanta, M.D. 2019. Ecología y evolución de enfermedades emergentes: una revisión de ranavirus y quitridiomycosis. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 2(1): 9-25.
- Becerra-López, J.L., Esparza-Estrada, C.E., Romero-Méndez, U., *et al.* 2017. Evidence of niche shift and invasion potential of *Lithobates catesbeianus* in the habitat of Mexican endemic frogs. *PLoS ONE* 12(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185086>
- Blaustein, A.R. & Johnson, P. 2003. Explaining Frog Deformities. *Scientific American*, 288(2). pp 60-65.
- Boelter, R. A., & Cechin, S. Z. (2007). Impact of the Bullfrog diet (*Lithobates catesbeianus*-Anura, Kanidae) on native fauna: case study from the region of Agudo-RS-Brazil. *Natureza & Conservação*, 5(2): 115-123
- Bolom-Huet, R., Pineda, E., Díaz-Fleischer, F., *et al.* 2019. Known and estimated distribution in Mexico of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a pathogenic fungus of amphibians. *Biotropica*. <https://doi.org/10.1111/btp.12697>
- Bonita, R., Beaglehole, R. & Kjellstrom, T. 2008. *Epidemiología básica* (2da ed) Organización Panamericana de la Salud.
- Bosch, J. 2003. Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. *MUNIBE* 16: 56-73.

Boyle, D.G., Boyle, D.B., Olsen, V., Morgan, J.A.T. & Hyatt AD. 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis Aquat Org*, 60: 141-148.

Brannelly, L. A., Martin, G., Llewelyn, J. *et al.* 2018a. Age- and size-dependent resistance to chytridiomycosis in the invasive cane toad *Rhinella marina*. *Dis Aquat Org*, 131. <https://doi.org/10.3354/dao03278>

Brannelly, L. A., Webb, R. J., Hunter, D. A. *et al.* 2018b. Non-declining amphibians can be important reservoirs hosts for amphibian chytrid fungus. *Animal Conservation*, 21.

Bravo, J. & Moreno, G. 2020. Chytridiomycosis en anfibios. *Bol. Soc. Micol. Madrid*, 44: 27-49.

Burns, T. J., Scheele, B. C., Brannelly, L. A. *et al.* 2020. Indirect terrestrial transmission of amphibian chytrid fungus from reservoir to susceptible host species leads to fatal chytridiomycosis. *Animal Conservation*, 24(4). pp 602-612. <https://doi.org/10.1111/acv.12665>

Buttimer, S., Moura-Campos, D., Greenspan, S. E., Neely, W. J., Ferrante, L., Tolero, L. F. & Guilherme-Becher, C. 2024. Skin microbiome disturbance linked to drought-associated amphibian disease. *Ecology Letters*, 24(1). <https://doi.org/10.1111/ele.14372>

Castro-Monzon, F., Rodel, M. O. & Jeschke, J. M. 2020. Tracking *Batrachochytrium dendrobatidis* infection across the globe. *EcoHealth*, 17. pp 270-279. <https://doi.org/10.1007/s10040-020-02000-0>

Chunxia, X.U., Gao X., Crossland, M.R. *et al.* 2017. Foraging Responses of the Larvae of Invasive Bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*): Possible Implications for Bullfrog Control and Ecological Impact in China. *Asian Herpetological Research* 8(4): 253-261.

CONANP. 2014. Programa de Manejo Monumento Natural El Cerro de la Silla. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas.

CONANP. 2020. Parque Nacional Cumbres de Monterrey. Borrador Programa de Manejo. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas.

Contreras-Delgado, C. 2007. Geografía de Nuevo León. Fondo Editorial de Nuevo León.

Cortés-Suárez, J. E. 2018. Caso de anomalía registrado para el sapo gigante *Rhinella horribilis* (Wiegmann, 1833) en el territorio indígena Ngäbe de Osa, Costa Rica. *Ambientico*, 267(11). pp 59-61

Cruz-Cordovez C, Herrera I, Espinoza F, *et al.* 2020. New record of a feral population of *Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802 in a protected area (Santay Island) in the Ecuadorian coast. *BioInvasions Records*, 9(2): 421–433, <https://doi.org/10.3391/bir.2020.9.2.28>

Cuervo- Robayo, A.P., Escobar, L.E., Osorio Olvera, L.A., Nori, J., Varela, S., Martinez Meyer, E., Velasquez Tibata, J., Rodriguez Soto, C., Munguia, M., Castaneda Alvarez, N.P. & Lira Noriega, A., 2017. Introducción a los análisis espaciales con énfasis en modelos de nicho ecológico. *Biodiversity Informatics*. <https://doi.org/10.17161/bi.v12i0.6507>.

Daly, J. W. 1995. The chemistry of poisons in amphibian skin. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 92: 9-13.

Demori, I., El Rashed, Z., Corradino, V., *et al.* 2019. Peptides for Skin Protection and Healing in Amphibians. *Molecules*, 24(2). <https://doi.org/10.3390/molecules24020347>

Duellman, W. E. & L. Trueb. 1994. *Biology of amphibians*. Johns Hopkins University Press, Baltimore. 670 p

Duque-Amado, C.D. & Megía-Palma, R. 2024. The Mesoamerican giant toad (*Rhinella horribilis*) as bioindicator of vegetation degradation in a tropical forest. *Basic and Applied Herpetology*. <https://doi.org/10.11160/bah.273>

Elith, J., and Leathwick, J. R. 2009. Species distribution models: Ecological explanation and prediction across space and time. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 677–697.

Elmassry, M. M., Dowd, S., Carey, C. & San Francisco, M. J. 2020. Evaluation of the bacterial and fungal microbiome on the skin of *Anaxyrus boreas*, *Rhinella marina*, and *Xenopus laevis* and implications related to *Batrachochytrium dendrobatidis* susceptibility. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.07.19.211102>

- Fisher, M. C., Pasmans, F. & Martel, A. 2021. Virulence and Pathogenicity of Chytrid Fungus Causing Amphibian Extinctions. *Annual Review of Microbiology*, 75. pp 673-693. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-052621-124212>
- Galindo-Bustos, M. A., Brousset, D., Cheng, T. *et al.* 2014. Presence and prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in commercial amphibians in Mexico City. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 45(4): 830-835. <https://doi.org/10.1638/2014-0023.1>
- Galoyan, E., Vassilieva, A.B. & Poyarkov, N. 2017. Seasonal activity of terrestrial amphibians in the monsoon lowland forest of southern Vietnam. *Herpetological Journal*, 27(2).
- García, N. & Schalk, C. M. 2020. *Incilius nebulifer* (Gulf Coast Toad). *Polymelia*. *Herpetological Review*, 51(1).
- García-Feria, L. M., Brousset, D. M. & Cervantes-Olivares, R. A. 2019. Factores abióticos y bióticos determinantes para la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios mexicanos. *Acta Zoológica Mexicana*, 35: 1-18. <https://doi.org/10.21829/azm.2019.3502066>
- García-Feria, L. M., Brousset-Hernández, D. M., Vallejo-Bravo, D. & Cervantes-Olivares, R. A. 2017. El comercio de anfibios y la presencia de "*Batrachochytrium dendrobatidis*" en vida libre: ¿Dispersión en círculo vicioso? *Neotropical Biology and Conservation*, 12(1).
- García-Hernández, J. & Jurado, E. 2008. Caracterización del matorral con condiciones prístinas en Linares, N. L., México. *Ra Ximhai*, 4(1). pp 1-21.
- Garín, C. F. & Lobos, G. A. 2008. Generalidades sobre anfibios y reptiles. En: *Herpetología de Chile*. Minera Escondida, Instituto de Ecología y Biodiversidad, Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y Universidad de Concepción. pp 55-75.
- Garmyn, A., Van Rooji, P., Pasmans, F., Hollebuyck, T., Van Den Broeck, W., Haesebrouck, F. & Martel, A. 2012. Waterfowl: Potential environmental reservoirs of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*, *PLoS ONE*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035038>



GBIF. 2024a. *Batrachochytrium dendrobatidis* (Longcore, Pessier & Nichols, 1999). <https://doi.org/10.15468/dl.vjz7yx>

GBIF. 2024b. *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). <https://doi.org/10.15468/dl.3mp3pv>

GBIF. 2024c. *Rhinella horribilis* (Wiegmann, 1833). <https://doi.org/10.15468/dl.hcjk24>

Gibble, R.E., Rollins-Smith, L. & Baer KN. 2007. Development of an assay for testing the antimicrobial activity of skin peptides against the amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) using *Xenopus laevis*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 71(2): 506-513. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.10.016>

González-Hernández, A. J. X., Garza-Castro, J. M. & Balderas-Valdivia, C. J. 2021. Manal de identificación de la Herpetofauna de México. Dirección General de Divulgación de la Ciencia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. pp 60.

Greenspan, S. E., Calhoun, A. J. K., Longcore, J. E. & Levy, M. G. 2012. Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* to wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) via bullfrog (*L. catesbeianus*) vector. *Journal of Wildlife Diseases*, 48(3). pp 575-582.

Grogan, L. F., Humphries, J. E., Robert, J. *et al.* 2020. Immunological Aspects of Chytridiomycosis. *Journal of Fungi*, 6(4). <https://doi.org/10.3390/jof6040234>

Hanken, J. 1989. Development and Evolution in Amphibians. *American Scientist*, 77(4). pp 336-343.

Hernández-Martínez, L. A., Romero-Méndez, U., González-Barrios, J. L., García-De la Peña, M. C. & Amézquita-Torres, A. 2019. Nuevos registros y prevalencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anuros de la cuenca Nazas-Aguanaval en la región norte-centro de México. *Rev Mexicana de Biodiversidad*. 90. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2934>.

Hernández-Martínez, L. A., Romero-Méndez, U., González-Barrios, J. L. *et al.* 2019. Nuevos registros y prevalencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anuros de la cuenca Nazas-Aguanaval en la región norte-centro de México. *Rev Mex Biodiv*, 90. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2934>

Hijmans, R. J., Phillips, S., Leathwick, J. & Elith, J. 2023. Package “dismo”. Species Distribution Model. <https://github.com/rspsatial/dismo/issues/>

Hyatt, A. D., Boyle, D. G., Olsen, D. B., Berger, L., Obendorf, D., Dalton, A., Kriger, K., Hero, M., Hines, H., Phillot, R., Campbell, R., Marantelli, G., Gleason, F. & Colling, A. 2007. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis Aquat Org*, 73. pp 175-192.

INEGI. 2017. Guía para la interpretación de cartografía. Uso del Suelo y Vegetación. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México.

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. 2014. Guía Técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. Gobierno de España.

Jacinto-Maldonado, M., González-Salazar, C., Basanta, M. D. *et al.* 2023. Water pollution increases the risk of chytridiomycosis in Mexican Amphibians. *EcoHealth*, 20. <https://doi.org/10.1007/s10393-023-01631-0>

Kilburn, V. L., Ibáñez, R. & Green, D. M. 2011. Reptiles as potential vectors and hosts of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Panama. *Dis Aquat Org*, 97. pp 127-134. <https://doi.org/10.3354/dao02409>

Kolby, J. E. & Daszak, P. 2016. The Emerging Amphibian Fungal Disease, Chytridiomycosis: A Key Example of the Global Phenomenon of Wildlife Emerging Infectious Diseases. *Microbiol Spectr.* 4(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ei10-0004-2015>

Kruger, K.M., Hero, J.M. & Ashton KJ. 2006. Cost efficiency in the detection of chytridiomycosis using PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 71: 149-154.

Kruger A. 2020. Frog Skin Microbiota Vary with Host Species and Environment but Not Chytrid Infection. *Front Microbiol* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01330>

Lambertini, C., Becker, C. G., Belasen, A. *et al.* 2021. Biotic and abiotic determinants of *Batrachochytrium dendrobatidis* infections in amphibians of the Brazilian Atlantic Forest. *Fungal Ecology*, 49. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2020.100995>

Lamos, M. 2021. Las invasiones biológicas a través de dos casos: El sapo común (*Rhinella marina*) y el hongo causante de la quitridiomycosis cutánea (*Batrachochytrium dendrobatidis*). Boletín de la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales, 1. pp 1-24.

Le Sage EH, LaBumbard BC, Reinert LK *et al.* 2020. Preparatory immunity: Seasonality of mucosal skin defences and *Batrachochytrium* infections in Southern leopard frogs. *Journal of Animal Ecology* 90(2): 542-554. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13386>

Lemos-Espinal, J. A., Smith, G. R. & Cruz, A. 2016. Amphibians and Reptiles of the state of Nuevo León, Mexico. *ZooKeys*, 594. pp 123-141.

Llewelyn, J., Phillips, B.L., Alford, R.A., Schwarzkopf, L. & Shine R. 2010. Locomotor performance in an invasive species: cane toads from the invasion front have greater endurance, but not speed, compared to conspecifics from a long-colonised area. *Oecologia*, 162(2): 343-348. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1471-1>

Lovich, R., Ryan, M. J., Pessier, A. P. & Claypool, B. (2008). Infection with the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in a non-native *Lithobates berlandieri* below sea level in the Coachella Valley, California, USA. *Herp Rev*, 39, 315-317.

Luedtke, J. A., Chanson, J., Neam, K. *et al.* 2023. Ongoing declines for the world's amphibians in the face of emerging threats. *Nature*, 622. pp 308-314.

Luja, V. H., Rodríguez-Estrella, R., Ratzlaff, K. *et al.* 2012. The Chytrid Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Isolated Populations of the Baja California Treefrog *Pseudacris hypochondriaca curta* in Baja California Sur, México. *The Southwestern Naturalist*, 57(3): 323-327. <https://doi.org/10.1894/0038-4909-57.3.323>

Marco, A. 2003. Impacto de radiación ultravioleta y contaminación en anfibios. *Munibe*, 16: 44-55.

Marmolejo-Vargas, A. L., Solano, L., Baleta-Osorio, Y. *et al.* 2023. Una revisión de la biología de *Batrachochytrium dendrobatidis*. En: *Prácticas investigativas de jóvenes investigadores en Sucre, Colombia*. <https://doi.org/10.21892/9786287515383.10>

Mendoza-Almeralla, C., Burrowes, P. & Parra-Olea, G. 2015. La quitridiomycosis en los anfibios de México: una revisión. *Rev. Mex. Biodiv.* 86(1).

Mendoza-Almeralla, C., López-Velázquez, A., Longo, A. V. & Parra-Olea, G. 2016. Temperature treatments boost subclinical infections of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Mexican salamander (*Pseudoeurycea leprosa*)

Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16.

Morrone, J. J., Escalante, T. & Rodríguez-Tapia, G. 2017. Mexican biogeographic province: Map and shapefiles. *Zootaxa*, 4277(2). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4277.2.8>

Mota-Vargas, C., Encarnación-Luévano, A., Ortega-Andrade, H. M., Prieto-Torres, D. A., Peña-Peniche, A. & Rojas-Soto, O. R. 2019. Una breve introducción a los modelos de nicho ecológico. En: *La biodiversidad en un mundo cambiante: Fundamentos teóricos y metodológicos para su estudio*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Libermex, Ciudad de México. pp 39-63.

Muñoz-Alonso, L. A., López-León, N. Horváth, A. & Luna-Reyes, R. 2013. Los anfibios. En: *La biodiversidad en Chiapas: Estudio de Estado*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) y Gobierno del Estado de Chiapas, México. pp 305-319.

Murrieta-Galindo, R., Parra-Olea, G., González-Romero, A., López-Barrera, F. & Vredenburg, V. T. 2014. Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians inhabiting cloud forests and coffee agroecosystems in central Veracruz, Mexico. *Eur J Wildl Res*, 60: 431-439. <https://doi.org/10.1007/s10344-014-0800-9>

Mutnale, M.C., Reddy, G.S. & Vasudevan, K. 2021. Bacterial Community in the Skin Microbiome of Frogs in a Coldspot of Chytridiomycosis Infection. *Microb Ecol* 82: 554-558. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01669-5>

Nava-González, B. A., Suazo-Ortuño, I., Parra-Olea, G. *et al.* 2019. *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in amphibians from a high elevation habitat in the trans-Mexican volcanic belt. *Auat Ecol*, 54. pp 75-87. <https://doi.org/10.1007/s10452-019-09727-y>

Navarro-Salcedo, P., Navarro-Morales, A. & Vargas-Salinas, F. 2020. *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758). Catálogo de Anfibios y Reptiles de Colombia. Asociación Colombiana de Herpetología, 6(1). pp 63-72.

Nevárez-De Los Reyes, M., Lazcano, D., García-Padilla, E., Mata-Silva, V., Johnson, J. D. & Wilson, L. D. 2016. The herpetofauna of Nuevo Leon, Mexico: composition, distribution, and conservation. *Mesoamerican Herpetology*, 3(3).

OIE. 2019. Infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*. En Organización Mundial de Sanidad Animal (ed). Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos. [https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/aahm/current/chapitre\\_batrachochytrium\\_dendrobatidis.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/aahm/current/chapitre_batrachochytrium_dendrobatidis.pdf).

[org/10.1007/s10393-020-01504-w](https://doi.org/10.1007/s10393-020-01504-w)

Parra-Olea, G., Flores-Villela, O. & Mendoza-Almeralla. 2014. Biodiversidad de anfibios en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: S460-466.

Parra-Olea, G., García-París, M. & Wake, D. B. 1999. Status of some populations of Mexican salamanders (Amphibia: Plethodontidae). *Rev. Biol. Trop.*, 47(1-2): 217-223.

Peralta-Garcia, A., Adams, A. J., Briggs, C. J., Galina-Tessaro, P., Valdez-Villavicencio, J. H., Hollingsworth, B., Shaffer, H. B. & Fisher, R. N. 2018. Occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in anurans of the Mediterranean region of Baja California, México. *Dis Aquat Org* 127:193-200. <https://doi.org/10.3354/dao03202>.

Peterson, A. T. 2006. Ecologic niche modeling and spatial patterns of disease transmission. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 1822–1826

Peterson, A. T. & Soberón, J. 2012. Species Distribution Modeling and Ecological Niche Modeling: getting the concepts right. *Natureza & Conservação*, 10(2): 102-107. <http://dx.doi.org/10.4322/natcon.2012.019>

- Phillips, B. L., Brown, G. P., Webb, J. K., & Shine, R. 2006. Invasion and the evolution of speed in toads. *Nature*, 439(7078), 803-803.
- Phillips, S. J., Anderson, R. P. & Schapire, R. E. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 190(3-4). Pp 231-259.
- Phillot, A. D., Speare, R., Hines, H. B. *et al.* 2010. Minimising exposure of amphibians to pathogens during field studies. *Dis Aquat Org*, 92: 175-185.
- Pineda-Vázquez, M., Villegas, A., Pacheco-Coronel, N. *et al.* 2022. Herpetofauna como animales ornamentales y de compañía en tres mercados de la Ciudad de México. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 5(4). <https://doi.org/10.22201/fc.25942158e.2022.4.518>
- Piotrowski, J. S., Annis, S.L. & Longcore, J. E. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*. 96, 9-15.
- Prahl, J., Wilson, T. P., Giles, D. & Craddock, J. H. 2020. An overview of research regarding reservoirs, vectors and predators of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Acta Herpetologica*, 15(1). [https://doi.org/10.13128/a\\_h-8744](https://doi.org/10.13128/a_h-8744)
- Rebollar, E. A., Martínez-Ugalde, E. & Orta, A. H. 2020. The amphibian skin microbiome and its protective role against chytridiomycosis. *Herpetologica*, 76(2): 167-177.
- Reinhold, J. M., Halbert, E., Roark, M. *et al.* 2023. The role of *Culex territans* mosquitoes in the transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* to amphibian hosts. *Parasites & Vectors*, 16(424). <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05992-x>
- Rico-Sánchez, A. E., Haubrock, P. J., Cuthbert, R. N. *et al.* 2021. Economic costs of invasive alien species in Mexico. *NeoBiota*, 67: 459-483. <https://doi.org/10.3897/neobiota.67.63846>
- Ríos-Muñoz, C. A. & Espinosa-Martínez, D. V. 2019. ¿Qué es necesario considerar para utilizar de manera adecuado los modelos de nicho ecológico o modelos de distribución de especies?: cómo no caer en la tentación. *Revista latinoamericana de herpetología*, 2(1): 5-8.

- Rivera, C. G., Funes-Hernández, K. T., Merino-Villalta, J. F. & Beltrán-Sánchez, A. V. 2021. Guía para el modelo de distribución de especies por Máxima Entropía, estudio de caso de la “lora nuca amarilla” *Amazona auropalliata* en El Salvador. *Revista Minerva*, 4(2). pp 125-142.
- Rodder, D., Schulte, U. & Toledo, L. F. 2013. High environmental niche overlap between the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* and invasive bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) enhance the potential of disease transmission in the Americas. *North-Western Journal of Zoology*, 9(1): 178-184.
- Ron, S. R. 2005. Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica*, 37(2): 209-221. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2005.00028>
- Rosa, G. M., Perez, R., Richards, L. A., Richards-Zawacki, C. L. *et al.* 2022. Seasonality of host immunity in a tropical disease system. *Ecosphere*, 13(7). <https://doi.org/10.1002/ecs2.4158>
- Roth, S.A., Griffis-Kyle, K.L. & Barnes, M.A. 2023. *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Arid and Thermally Extreme Sonoran Desert. *EcoHealth* 20: 370-380. <https://doi.org/10.1007/s10393-023-01668-1>
- Roth, S.A., Griffis-Kyle, K.L. & Barnes, M.A. 2023. *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Arid and Thermally Extreme Sonoran Desert. *EcoHealth* 20, 370–380. <https://doi.org/10.1007/s10393-023-01668-1>
- Ruggeri, J., Da Silva Martins, A. G., Rosa-Domingos, A. H. *et al.* 2020. Seasonal prevalence of the amphibian chytrid in a tropical pond-dwelling tadpole species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 142: 171-176. <https://doi.org/10.3354/dao03539>
- Ruthsatz, K., Lyra, M. L., Lambertini, C. *et al.* 2020. Skin microbiome correlates with bioclimate and *Batrachochytrium dendrobatidis* infection intensity in Brazil’s Atlantic Forest treefrogs. *Scientific Reports*, 10(1), 22311. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79130-3>

Sales, L., Rebouças, R. & Toledo, L. F. 2021. Native range climate is insufficient to predict anuran invasive potential. *Biol Invasions*, 23: 2635-2647. <https://doi.org/10.1007/s10530-021-02528-1>

San Mauro, D. 2012. Anfibios. En: *El árbol de la vida: sistemática y evolución de los seres vivos*. Impulso Global Solutions, S.A., pp 400-407.

Sánchez, K., Grayson, K.L., Sutherland, C., Thompson, L.M. & Hernández-Pacheco R. 2020. Environmental Drivers of Surface Activity in a Population of the Eastern Red-backed Salamander (*Plethodon cinereus*). *Herpetological Conservation and Biology*, 15(3): 642-651.

Santos-Barrera, G. 2004. Enfermedades infecciosas y su papel en la declinación mundial de las poblaciones de anfibios. *CONABIO. Biodiversitas*. 56, 1-6.

Sessions, S. K. & Ballengée, B. 2010. Developmental deformities in amphibians. In: *The Occurrence of Deformities in Amphibians*. Arts Catalyst, London and Yorkshire Sculpture Park, Wakefield, England.

Sewell, T. R., Longcore, J. & Fisher, M. C. 2021. *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Trends in Parasitology*, 37(10). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.04.014>

Sonn, J. M., Utz, R. M. & Richards-Zawacki, C. L. 2019. Effects of latitudinal, seasonal, and daily temperature variations on chytrid fungal infections in a North American frog. *Ecosphere*, 10(11). <https://doi.org/10.1002/ecs2.2892>

Sun, D., Ellepola, G., Herath, J. & Meegaskumbura M. 2023. Ecological Barriers for an Amphibian Pathogen: A Narrow Ecological Niche for *Batrachochytrium salamandrivorans* in an Asian Chytrid Hotspot. *J Fungi* 9(9). <https://doi.org/10.3390/jof9090911>

Turner, A., Wassens, S., Heard, G. & Peters A. 2021. Temperature as a driver of the pathogenicity and virulence of amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*: a systematic review. *Journal of Wildlife Diseases*, 57(3). pp 477-494.



Turner, A., Wassens, S. & Heard G. 2021. Chytrid infection dynamics in frog populations from climatically disparate regions. *Biological Conservation* 264. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2021.109391>

Varga, J. F. A., Bui-Marinos, M. P. & Katzenback, B. A. 2019. Frog skin innate immune defences: Sensing and surviving pathogens. *Frontiers in Immunology*, 9: 1-21. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03128>

Viáfara-Vega, R. A. 2020. Detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* (Chytridiomycota) en localidades del Valle del Cauca por técnica de PCR. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 3(1).

Vidal-Maldonado, M. A. & Labra-Lillo, A. 2008. *Herpetología de Chile*. Minera Escondida, Instituto de Ecología y Biodiversidad, Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y Universidad de Concepción.

Villamizar-Gómez, A., Farr, W., Hahn, D., Dixon, J. R., Lazcano, D. & Forstner, M. R. J. 2015. Absence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in eighteen species of amphibians from a variety of habitats in Tamaulipas, Mexico. *Herpetological review*, 46(1): 34-37.

Woodham, D.C., Vredenburg, V.T., Simon, M.A. *et al.* 2007. Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*. *Biological Conservation* 138(3-4): 390-398. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2007.05.004>

Xie, G.Y., Olson, D.H. & Blaustein, A.R. (2016) Projecting the Global Distribution of the Emerging Amphibian Fungal Pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*, Based on IPCC Climate Futures. *PLoS ONE* 11(8): e0160746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160746>

Zumbado-Ulate, H., García-Rodríguez, A., Vredenburg, V.T. & Searle, C. 2019. Infection with *Batrachochytrium dendrobatidis* is common in tropical lowland habitats: Implications for amphibian conservation. *Ecology and evolution*, 9(8): 4917-4930. <https://doi.org/10.1002/ece3.5098>