



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



Tesis doctoral

**Susceptibilidad y sensibilidad de algunas especies de
anuros a la infección por el hongo *Batrachochytrium*
*dendrobatidis***

Doctoranda: María Luz Arellano

Directora: Mónica M. Steciow

Co-Director: Esteban O. Lavilla

2012

A Pablo, Abril, Camila y Lautaro.



Agradecimientos

Esta tesis fue realizada con mucho esfuerzo y gracias a la ayuda de mucha gente...

Gracias a mis Directores, Mónica M. Steciow y Esteban O. Lavilla, por brindarme su apoyo, tiempo y paciencia en esta investigación.

Gracias al CONICET y a la Universidad Nacional de La Plata, por las becas otorgadas, gracias a las cuales pude realizar mi tesis.

Gracias a mi familia, Pablo Grilli, mi amor, mi compañero, mi consejero; gracias por las largas noches de ayuda y compañía en estos últimos meses; gracias por escucharme, apoyarme y abrazarme siempre en este camino y en todos los demás. A mis hijos, Abril, Camila y Lautaro, por hacer que cada día sea un día con risas y amor, gracias por venir a mi vida.

A mi mamá Susana y a mi papá Guillermo, por enseñarme que el camino de la verdad y el esfuerzo son los únicos para lograr lo que uno desea. Por enseñarme a ser libre y por amarme tanto.

A mi hermano Fede, que aunque a muchos kilómetros de distancia, compartimos momentos y pasajes de nuestras vidas, te extraño hermano. A mi hermana Sofi, mi compinche, gracias por escucharme, por tenerme paciencia y por ser un ser humano tan hermoso y dulce.

A mis amigas y amigos del laboratorio: Agostina Marano, por su gran amistad y por todas sus enseñanzas, por su compañía incondicional. A Natalia Allegrucci, por tantos momentos compartidos, tardes de mates y arenero... y muchas charlas. A Silvana Velázquez, por estar siempre, por ser el oído, el hombro y la palabra justa. A Lorena Elíades, por tanta ternura y delicadeza humana. A Suani Pacheco, por su incondicional ayuda y cariño. A Ana Bucszinsky, por sus eternas enseñanzas, su paciencia, su compañerismo y cariño. A Mario Saparrat, por su alegría, su positivismo y su gran ayuda. A mis compañeros Ana Clara Scorsetti, Cecilia Tranchida y Sebastián Pelliza por su compañerismo diario y por tantas charlas.

A Guillermo Natale, por permitirme iniciarme en el estudio de las ranitas, por sus consejos, enseñanzas, su cariño y por su gran generosidad.

A mi amigo Juan Pablo Pilili, por compartir conmigo las dificultades de este camino y por brindarme tantas veces su ayuda.

A Joyce E. Longcore, por su eterna generosidad, por confiar en mí y por tanta dulzura.

A Angélica Arambarri, por su apoyo, por brindarme los medios necesarios para muchos de mis trabajos y por su buena predisposición.

A Marta Cabello, por su confianza en mí, por su desinteresada ayuda y por darme el empujón que necesité, para terminar la tesis.

A mi compañera Andrea Colusi por “bancarme” tanto en Histología.

A Alejandra Rumi, por prestarme un lugar de trabajo y brindarme siempre su ayuda.

A Jorge Ronderos, por abrirme las puertas de su laboratorio, por el micrótomo, las cuchillas y la confianza.

A Jorge Williams, por el reconocimiento del esfuerzo que este trabajo implicó.

A Luis “Fajardo” Pagano, gracias por acordarte de mí en cada viaje y molestarte en traer ranitas.

A Federico Kacoliris, por su gran ayuda y compañerismo.

A Emilio Topa, por su buena predisposición, y su gran simpatía.

A mis pasantes: Laura Ramírez Barrios, M. Celeste Scattolini, Emiliano Guerrero y Facundo Garnis por formar parte de este comienzo.

A mis amigas Paula Frijerio, Michelle Arnal, Verónica Orellano, Silvana Ojeda, Melina Brivido, Anahí Formoso, Silvina Horsinka, Mariana León, Laura Raposo, Erica Baumann, Maqui Perez, Valeria Tami, por formar parte de mi vida.

A todos los que formaron parte de este gran paso: Romina Ghirardi, Gabriela Agostini, Diego Barrasso, Diego Baldo, Daiana Ferraro, Raúl Herrera, Romina Gutiérrez, Mariano Lucía.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	1
Abstract	6
Introducción	
Declinación global de anfibios	11
Las enfermedades emergentes como causas de la declinación	13
Origen de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en el mundo	17
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	19
Los anfibios como bioindicadores	20
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en Argentina	23
Objetivos	27
Hipótesis	27
Metodología	
Área de estudio	28
Análisis de la presencia de <i>Bd</i> en anuros	
Anuros del área de estudio	30
Muestreo por transectas y trampas de pozo (captura viva)	30
Muestreo temporal por trampas de pozo (captura muerta)	33
Anuros de otras regiones	34
Aislamiento de la primera cepa de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en Argentina	36

Secuenciación y genoma de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	38
Bioensayos de laboratorio	
Metodología general	38
Bioensayos	43
Cálculo de la concentración infectiva de zoosporas/ml y tiempo de exposición	43
Estudio de la sensibilidad de las distintas especies	45
Incidencia topográfica de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en distintos parches ventrales de <i>L. latrans</i>	48
Resultados	
Análisis de la presencia de <i>Bd</i> en anuros	
Anuros del Área de estudio	50
Muestreo por transectas y trampas de pozo (captura viva)	50
Muestreo temporal por trampas de pozo (captura muerta)	52
Anuros de otras regiones	54
Aislamiento de la primera cepa de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en Argentina	60
Secuenciación y genoma de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	66
Bioensayos de laboratorio	
Bioensayos	70
Cálculo de la concentración infectiva de zoosporas/ml y tiempo de exposición	70
Estudio de la sensibilidad de las distintas especies	73

Incidencia topográfica de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en distintos parches ventrales de <i>L. latrans</i>	89
Discusión	92
Conclusiones	126
Bibliografía	128
ANEXO I	149
ANEXO II	154

Resumen

La declinación de los anfibios a nivel mundial, e incluso la desaparición de algunas especies, ha sido un fenómeno de especial importancia para muchos científicos en los últimos años. Del total de las especies de anfibios que se conocen en el mundo hasta el momento, un tercio se encuentra amenazada y 165 especies, parecen haberse extinguido a partir de 1980. Los factores que influyen en esta declinación son muchos, y hasta el momento se siguen discutiendo; pero las enfermedades, han sido reconocidas como uno de los factores que más han contribuido a esta declinación. La quitridiomycosis es una **enfermedad infecciosa emergente** que, en los últimos años, ha sido vinculada a la muerte masiva de algunas especies de anuros. Esta enfermedad es causada por el hongo acuático zoospórico *Batrachochytrium dendrobatidis*- *Bd*- (Orden Rhyzophydiales) que se encuentra actualmente distribuido en todos los continentes con excepción de la Antártida. *Bd* infecta la epidermis estratificada de la piel de los anfibios anuros y urodelos y sus talos se desarrollan dentro de las células epidérmicas principalmente en los dedos y la parte ventral del cuerpo y en el disco oral queratinizado de las larvas. La infección afecta muchas funciones de la piel de los anfibios, como la osmoregulación y la respiración a través de este órgano. Entre las poblaciones de anfibios es posible encontrar un gran rango de susceptibilidades a la infección por *Bd*. Las larvas y algunos estadios post-larvales de anuros y urodelos parecen desarrollar una infección subclínica por lo que actúan como reservorios de *Bd* y esparcen el hongo por diferentes ambientes y especies.

En Sudamérica, *Bd* se ha citado en 13 países hasta el momento, y los casos reportados siguen incrementándose constantemente. En Argentina, el primer reporte de *Bd* en una especie endémica, fue registrado en el año 2002 en la rana criolla (*Leptodactylus latrans*) en la provincia de Buenos Aires. Actualmente su presencia se ha registrado en 11 provincias de la Argentina que abarcan los cuatro puntos cardinales y latitudes de 7 a casi los 3900 msnm.

En Argentina, el conocimiento de las disminuciones de anfibios es escaso, y resulta importante generar información que permita un mejor manejo y conservación de las

especie. El estudio de las susceptibilidades y sensibilidades de los anfibios anuros, representa una aproximación al conocimiento del efecto de este hongo quitridial sobre las poblaciones de anfibios en Argentina.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, en este trabajo de tesis se plantearon los siguientes objetivos:

- ✚ Analizar la presencia de *Bd* en distintas especies de anuros nativas en el área de estudio seleccionada y en anuros provenientes de otras áreas.
- ✚ Aislar la cepa nativa de *Bd* a partir de especies de anuros autóctonos de Argentina.
- ✚ Analizar genéticamente la cepa autóctona y evaluar su similitud con cepas de *Bd* de otros países.
- ✚ Analizar la susceptibilidad y sensibilidad de las distintas especies de anuros a la infección por *Bd* en bioensayos de laboratorio.

Para cumplir con los objetivos propuestos, se llevaron a cabo las siguientes actividades:

Se realizaron muestreos por transectas y trampas de pozo (captura viva y captura muerta), en el Área de estudio (situada en las afueras de la ciudad de La Plata, provincia de Buenos Aires, cerca del arrollo El Pescado). Se colectaron los individuos muertos, moribundos o aletargados (con posibles signos de la enfermedad) y los capturados mediante las trampas. Para los análisis histológicos se cortaron muestras de piel del parche pélvico y de la superficie ventral de los muslos en los adultos, y del disco oral en las larvas, y se procedió con el protocolo de rutina que utiliza la tinción de Hematoxilina y Eosina.

Para realizar el aislamiento de *Bd* se analizaron los discos orales de las larvas de dos especies, *Hypsiboas cordobae* y *Odontophrynus occidentalis*, provenientes de la provincia de San Luis, a partir de las cuales se identificó la infección a través de la observación en microscopio estereoscópico, al microscopio óptico y mediante el examen histológico. Posteriormente se realizó la limpieza de las piezas bucales en cajas de Petri con medio agarizado y antibiótico y su incubación a 23°C. Una vez aislada la cepa, se realizó una caracterización morfométrica de la misma (MLA 1) y de una cepa foránea (JEL 423), y se realizó la comparación a través de una prueba de *t* de Student.

La cepa de *Bd* aislada, fue estudiada genéticamente para realizar la secuenciación y el genoma completo de la misma y ésta fue enviada al Dr. Tim James (Laboratorio de Genética Evolutiva de hongos en la Universidad de Michigan y a la Dra. Erica Bree Rosenblum (Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Idaho; EEUU).

Para evaluar la susceptibilidad y sensibilidad de las distintas especies a la infección por *Bd* se realizaron cinco bioensayos de laboratorio. La infección se realizó a través de la inoculación de una suspensión de zoosporas de *Bd*, en los recipientes de los individuos durante el “tiempo de exposición”. El primer bioensayo fue realizado para calcular la concentración infectiva de zoosporas/ml y el tiempo de exposición al hongo *Bd* que resultasen efectivos en los subsiguientes bioensayos. Los siguientes bioensayos se realizaron con el objetivo de evaluar la sensibilidad de las distintas especies a la infección por *Bd*, utilizando la máxima concentración y el mayor tiempo de exposición efectivos, obtenidos en el primer bioensayo. Por último se realizó un análisis de la incidencia topográfica de *Bd* en la piel de *Leptodactylus latrans*, a través de examen de los puntos de infección en los distintos parches ventrales del cuerpo.

Durante los muestreos por transectas y trampas de pozo por captura viva en el área de estudio se recogieron en total 13 individuos, registrándose la presencia de *Bd* en 4 individuos (3 adultos y una larva), pertenecientes a las especies *Pseudis minutus*, *Hypsiboas pulchellus* y *Leptodactylus latrans*. Mediante el uso de trampas de pozo (captura muerta), se analizaron 51 ejemplares de los cuales solo uno resultó positivo para *Bd*. Finalmente en el análisis de anuros de otras regiones, se examinaron un total de 18 individuos registrándose la presencia de *Bd* en 10 individuos (8 adultos, un juvenil y una larva) pertenecientes a las especies *Elachistocleis bicolor*, *Hypsiboas aff. riojanus*, *Rhinella sp.* y *L. latrans* distribuidos en las provincias de Salta, Jujuy, Misiones y Buenos Aires.

En cuanto al aislamiento de la cepa argentina de *Bd*, se observaron las estructuras del disco oral de las larvas. Se registró falta de pigmentación en mandíbulas superior e inferior, erosión del borde y pérdida del aserrado, y algunas veces pérdida de algún queratodonte, y una gran cantidad de zoosporangios tanto en el examen al microscopio óptico como en los preparados histológicos. Durante el aislamiento de *Bd*, (a partir de las muestras de los discos orales) se observaron zoosporas nadando sobre el medio de cultivo,

en las cajas de Petri, alrededor de las muestras, y se visualizaron zoosporangios sobre el borde de las estructuras queratinizadas. Las colonias formadas, fueron transferidas al medio de cultivo líquido 1% Tripona. La caracterización morfométrica de las dos cepas analizadas (MLA1 y JEL 423), mostró diferencias significativas en el diámetro promedio de los zoosporangios de las cepas y se observó que el número de tubos de descarga fue diferente para cada cepa.

El resultado de la secuenciación de la cepa MLA1 resultó en un árbol filogenético con cepas provenientes de muchos países, en donde se pudieron diferenciar 2 grandes grupos, además del linaje único: un grupo que contenía aislamientos provenientes de individuos del Norte, Centro y Suamérica, África y Australia; y otro en el que todas las cepas pertenecían a aislamientos de individuos de Estados Unidos a excepción de nuestra cepa MLA1; lo que es interesante pues en este análisis MLA1 es la única cepa con “genotipo Norteamericano” aislada fuera de Norte América. En el análisis del genoma completo, también se realizó un árbol filogenético con cepas provenientes de distintos países, en donde se visualizó que *Bd* no muestra especificidad geográfica o de hospedante. Cabe subrayar que en este análisis la cepa autóctona MLA1 también se encuentra dentro de un grupo con “genotipo norteamericano”.

Los resultados del primer bioensayo, mostraron mortalidad solamente en un individuo que formaba parte del tratamiento que combinaba la mayor concentración y el mayor tiempo de exposición. En referencia a los ensayos para el análisis de susceptibilidad y sensibilidad entre especies se registraron mortalidades en los tratamientos de los adultos de las especies *H. pulchellus*, *Pseudopaludicola falcipes*, *P. minutus* y *Scinax squalirostris*, mientras que no se registraron en *R. fernandezae*, *O. americanus*, *L. latrans* y *L. latinasus*. Las larvas de las especies *Rhinella fernandezae*, *S. squalirostris*, *L. latrans* y *H. pulchellus*, experimentaron mortalidades en sus grupos tratamiento. En el análisis de los puntos de infección de las diferentes regiones del cuerpo se encontraron diferencias significativas entre las distintas regiones analizadas.

Por lo tanto concluimos: que se confirma la presencia de *Bd* en las especies *P. minutus*, *H. pulchellus* y *L. latrans* en el área de muestreo, aunque sin registro de mortalidades evidentes. El análisis de la presencia de *Bd* en anuros de otras regiones,

confirma su presencia en las siguientes especies: *Elachistocleis bicolor* (Misiones) *Hypsiboas aff. riojanus* (Jujuy), *Rhinella sp.* (Salta) y *Leptodactylus latrans* (Buenos Aires). Se aisló la primera cepa de *Bd* Argentina, MLA1 y, mediante un análisis de la secuencia y el genoma, se la sitúa dentro de un clado norteamericano. Los bioensayos de laboratorio confirmaron que: los individuos adultos de *R. fernandezae*, *O. americanus*, *L. latinasus* y *L. latrans* son especie poco sensibles o resistentes a la infección por *Bd*, en laboratorio; que las especie más sensible resultaron los individuos adultos de *S. squalirrostris* (familia Hylidae), luego *P. falcipes* (familia Leiuperidae) y por último *H. pulchellus* (familia Hylidae); que todas las especies de adultos ensayadas, excepto *S. squalirrostris*, son susceptibles a la infección por *Bd*; que las larvas de todas las especies evaluadas son sensibles a la infección por *Bd* y que la sensibilidad fue (en orden decreciente) desde *R. fernandezae*, *S. squalirrostris*, *Physalaemus fernandezae*, *L. latrans* hasta *H. pulchellus*; y que las larvas de las especies *H. pulchellus* y *R. fernandezae* resultaron susceptibles a la infección por *Bd*, mientras que *L. latrans* y *S. squalirrostris* no lo fueron; que la cepa MLA1 (Argentina) resultó ser más virulenta que la cepa JEL 423 Panameña; que las regiones corporales ventrales con mayor incidencia de *Bd*, fueron los muslos (MI1 y MI2).

Es evidente que las poblaciones de algunas especies de anfibios alrededor del mundo han sufrido declinaciones y extinciones en las últimas décadas. Muchos son los factores que intervienen en esta declinación, pero el hongo quitridio parece haber acelerado estos procesos. La información existente sobre la respuesta de las distintas especies a la infección de este patógeno es escasa y es de suma importancia generar conocimientos que permitan acciones de conservación efectivas.

Abstract

The declining number of Amphibians around the world, and even the extinction of some species, has been a phenomenon of particular interest for many scientists in last few years. Of all known amphibian species, a third is threatened and 165 species seem to have become extinct since 1980. The factors influencing this decline are many, its possible causes are still a matter of discussion but diseases have been recognized as one of the factors that have greatly contributed to this decline. Chytridiomycosis is an emerging infectious disease which, in the last years, has been linked to the mass death of some species of frogs. This disease is caused by the aquatic zoospóric fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* –*Bd*- (Order Rhizophydiales) that is currently found in all continents except for Antartida. *Bd* infects the stratified epidermis of the skin of anurans and urodeles amphibians, and its thalli develop within the epidermal cells mainly in the fingers, the body's ventral parts, and the keratinized oral discs of larvae. The infection affects many functions of the skin of amphibians, such as osmoregulation and breathing through this organ. Among amphibian populations is possible to find a wide range of susceptibilities to infection by *Bd*. Larvae and post-larval stages of some anuran and urodeles seem to develop a subclinical infection thus acting as *Bd* reservoirs and spreading the fungus through different environments and species .

In South America, *Bd* has been cited in 13 countries so far, and the reported cases continue to increase steadily. In Argentina, the first report of *Bd* in an endemic species was registered in 2002 in the ocellated frog (*Leptodactylus latrans*) from Province of Buenos Aires. Currently its presence has been registered in 11 provinces of Argentina which cover the four cardinal points and from 7 to almost 3900 masl latitudes.

In Argentina, the knowledge of amphibian's decline is limited, therefore it is important to generate information to improve the management and species conservation. The study of the sensitivity and susceptibility of anuran amphibians is an approach to the knowledge of the effects of this quitridial fungus on amphibian populations in Argentina.

Based on the information presented above, the goals of the present thesis were defined as follows:

- ✚ Analyze the presence of *Bd* in different species of native frogs in the selected study area, and other areas anurans.
- ✚ Isolate the native strain of *Bd* from native anurans of Argentina.
- ✚ Genetically analyze the native strain, and evaluate its similarity to strains of *Bd* from other countries.
- ✚ Analyze the susceptibility and sensitivity of different species of frogs to *Bd* infection in laboratory bioassays.

In order to accomplish the proposed goals, the following methodology was adopted:

Transects and pitfall traps (live capture and dead capture) were sampled, in the study area (located on the outskirts of La Plata city, Buenos Aires Province, near El Pescado creek). Dead, dying and dormant individuals (with possible signs of the disease) were collected and also those captured by the traps. For histological examination, we took samples of skin of the pelvic patch and the ventral surface of thighs in adults, and the oral disc in larvae; and proceeded with the histological routine protocol using Hematoxylin and Eosin staining.

For *Bd* isolation we analyzed the oral discs of larvae of two species, *Hypsiboas cordobae* and *Odontophrynus occidentalis*, from the province of San Luis, for which the infection was identified through stereomicroscope observation, optical microscope observation and by histological examination. Later we cleaned the mouthparts in Petri dishes in agar and antibiotic medium, and incubated them at 23 °C. Once the strain was isolated, we performed a morphometric characterization of this strain (MLA 1) and a foreign strain (JEL 423), and compared them through a Student *t* test.

Bd isolated strain, was genetically analyzed to perform the whole genome sequencing of the strain and it was sent to Dr. Tim James (Laboratory of Evolutionary Genetics of Fungi in the University of Michigan) and Dr. Erica Bree Rosenblum (Department of Biological Sciences, University of Idaho, USA)..

To evaluate the sensitivity and susceptibility of different species to *Bd* infection, we carried out five laboratory bioassays. The infection was performed by inoculating a

suspension of *Bd* zoospores to individual's containers during the "exposure time". The first bioassay was conducted to deduce the zoospores/ml infective concentration and the exposure time to *Bd* fungus that were effective in subsequent bioassays. The following bioassays were conducted with the objective of assessing the sensitivity of different species to *Bd* infection, using the maximum effective concentration and highest exposure time obtained in the first bioassay. Finally, we performed an analysis of the topography incidence of *Bd* on *L. latrans* skin, through an examination of the infected areas of different patches of the ventral body.

During the surveys by transects and pitfall traps (live capture) in the study area, we collected a total of 13 individuals, recording the presence of *Bd* in 4 of them (three adults and one larva), belonging to the species *Pseudis minutus*, *Hypsiboas pulchellus* and *Leptodactylus latrans*. By using pitfall traps (dead capture), we analyzed 51 specimens of which only one was positive for *Bd*. Finally in the analysis of Anurans of other Regions, we examined a total of 18 individuals detecting the presence of *Bd* in 10 specimens (8 adults, one juvenile and one larva) belonging to the species *Elachistocleis bicolor*, *Hypsiboas aff. riojanus*, *Rhinella sp.* and *Leptodactylus latrans*, distributed in the provinces of Salta, Jujuy, Misiones and Buenos Aires.

Regarding to the isolation of Argentinean *Bd* strain, oral disks structures of the larvae were observed. We recorded lack of pigmentation in upper and lower jaws, edge erosion and loss of sawing, and sometimes loss of queratodontes, and a large amount of zoosporangia both in the optical microscopic examination as in histological slide. During the isolation of *Bd* (from oral disks samples) swimming zoospores were observed on the culture medium in the Petri dishes surrounding the samples, and zoosporangia were visualized on the edge of keratinized structures. The formed colonies were transferred to liquid culture medium 1% Tripona. The morphometric characterization of the two strains tested (MLA1 and JEL 423), showed significant differences in the average diameter of the sporangia of the strains and it was also observed that the number of discharge tubes was different for each strain.

The result of MLA1 strain genome sequencing derived in a phylogenetic tree with strains from many countries where we could differentiate 2 groups, besides from the single

lineage: a group containing several isolation from North, Central and Southamerica, Africa and Australia, and another group in which all strains had been isolated from U.S except for our strain MLA1; this is interesting because in this analysis MLA1 is the only strain with "North American" genotype isolated outside North America. In the analysis of the whole genome, a phylogenetic tree was also performed with strains from different countries, in which we could visualize that *Bd* shows no geographical or host specificity. It should be emphasized that in this analysis native strain MLA1 is also in a group with "North American" genotypes.

The results of the first bioassay, showed mortality in a single individual, which took part of the treatment that combined the maximum concentration and the longest exposure time. Regarding to susceptibility and sensitivity analysis, mortality was registered in *H. pulchellus*, *P. falcipes*, *P. minutus* and *S. squalirostris* species treatment, whereas in *R. fernandezae*, *O. americanus*, *L. latrans* and *L. latinasus* was not. Mortality was registered in treatment group of *R. fernandezae*, *S. squalirostris*, *L. latrans* and *H. pulchellus* larvae. Analysis of topography incidence of *Bd* in *L. latrans* in different ventral patches, showed a significant prevalence of infection points in: MI1, MI2 V1 and V2 (Thigh: MI1, MI2, Belly: V1, V2) for L10, while for L7 were MI1, MI2 and MD2. The analysis of infection points in different regions of the body exhibit significant differences ($p = 0.000$) between the different regions analyzed.

We therefore conclude: that the presence of *Bd* in species *Pseudis minutus*, *Hypsiboas pulchellus* and *Leptodactylus latrans* in the study area is confirmed, although with no apparent mortality. The analysis of *Bd* in anurans from other regions, confirms its presence in the following species: *Elachistocleis bicolor* (Misiones) *Hypsiboas aff. riojanus* (Jujuy), *Rhinella sp.* (Salta) and *Leptodactylus latrans* (Buenos Aires). The first *Bd* Argentinean strain MLA1 was isolated and, by analyzing sequence the and full genome, it has been located within a North American clade. Laboratory bioassays confirmed that: the adults of *R. fernandezae*, *O. americanus*, *L. latinasus* and *L. latrans* have low sensitivity or are resistant species to *Bd* infection in the laboratory, that the most sensitive species were adult individuals of *S. squalirrostris* (family Hylidae), then *P. falcipes* (Leiuperidae family) and finally *H. pulchellus* (family Hylidae); that all evaluated adults species, except *S.*

squalirrostris, are susceptible to infection by *Bd*; that larvae of all species tested are susceptible to infection by *Bd* and that the sensitivity was (in descending order) from *R. fernandezae*, *S. squalirrostris*, *P. fernandezae*, *L. latrans* to *H. pulchellus*, and that the larvae of the species *H. pulchellus* and *R. fernandezae* were susceptible to infection by *Bd*, while *L. latrans* and *S. squalirrostris* were not; that strain MLA1 (Argentina) was more virulent than the Panama strain JEL 423; that the ventral body regions with the highest incidence of *Bd* were the thighs (MI1 and MI2).

It is clear that some species amphibian's populations around the world have suffered declines and extinctions in recent decades. There are many factors involved in this decline, but the chytrid fungus appears to have accelerated these processes. The available information on the response of different species to infection by this pathogen is scarce and it is extremely important to generate knowledge for effective conservation action.

1. Introducción

Declinación global de anfibios

Las poblaciones de anfibios comenzaron a declinar y a desaparecer en muchos países alrededor del mundo, aproximadamente por el año 1950 (Houlahan *et al.* 2000). Sin embargo no fue hasta 1989, en el Congreso Mundial de Herpetología realizado en Inglaterra, en que numerosos relatos de declinaciones de anfibios convencieron a los herpetólogos reunidos, que este fenómeno era real, y que aquello que se percibía como local tenía escala planetaria. Desde 1970, los científicos han observado declinaciones precipitadas de poblaciones y la desaparición completa de especies de anfibios. La extensión de estas declinaciones y extinciones no tiene precedentes en cualquier otro grupo de especies en los últimos milenios, y ha sido cada vez más, foco de investigaciones científicas. Estas declinaciones se han extendido geográficamente y han incrementado el número de especies involucradas (ACAP 2005).

El resultado del informe de la Evaluación Global de Anfibios (GAA, Global Amphibian Assessment), que evalúa la situación en que se encuentra este grupo de vertebrados, publicado en el año 2004, muestra que del total de las especies de anfibios (anuros, urodelos y cecilias) que se conocen en el mundo hasta el momento, un tercio (cerca de 1856 especies) se encuentra amenazada, mientras que en comparación solo el 12% de las especies de aves y el 23% de las especies de mamíferos está amenazada. Sumado a esto, 165 especies, tal vez más, parecen haberse extinguido a partir de 1980; existe otro centenar, o más, que no se han registrado en años recientes y los estudios fenológicos disponibles señalan que la mitad de las poblaciones de anfibios en el mundo están declinando (Lavilla 2008).

Los factores que influyen en esta declinación son muchos (Fig. 1.1) y hasta el momento se siguen discutiendo. Entre los más importantes merecen mencionarse: a) modificación y fragmentación del hábitat, que impacta a más del 90% de las especies amenazadas, (Fellers & Drost 1993; Lips 1998; Davidson *et al.* 2002; Dodd & Smith 2003); b) el cambio climático (Alexander & Eischeid 2001; Pounds & Crump 1994; Pounds *et al.* 1999; Stewart 1995); c) la contaminación del aire, herbicidas y pesticidas, que

pueden causar mortalidad directa de los huevos y adultos, alteración hormonal y reducir la cantidad de presas disponibles (LeNoir *et al.* 1999; Stallard 2001); d) la introducción de especies exóticas, que depredan o compiten con las especies nativas (Bradford *et al.* 1993; Gillespsie 2001; Lawler *et al.* 1999); y e) las enfermedades, que generalmente causan la muerte de los anfibios (Carey *et al.* 1999; Muths *et al.* 2003).

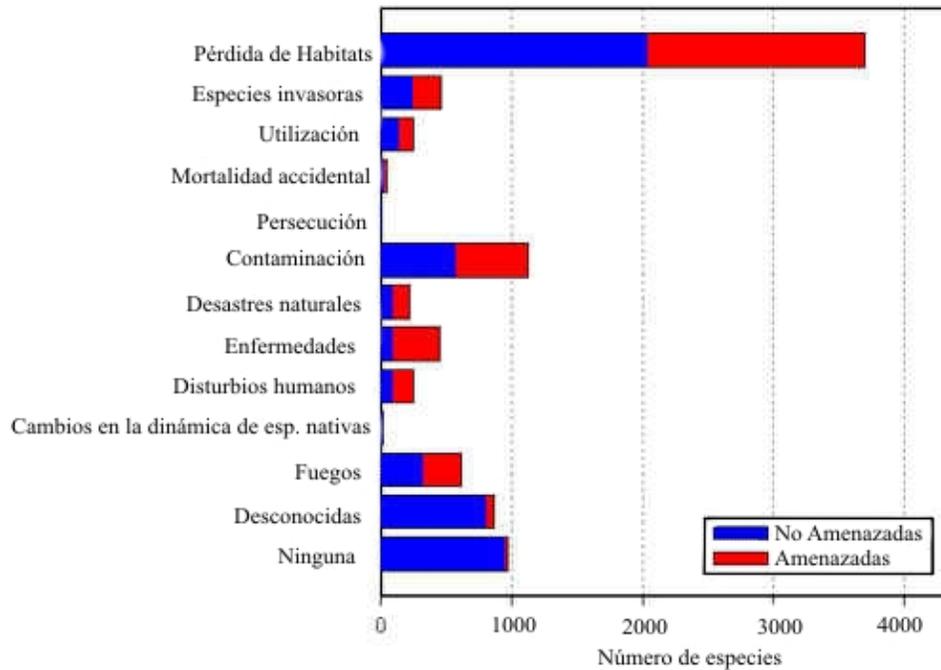


Figura 1.1. Factores causantes de la declinación de anfibios y su incidencia en el número de especies (Fuente: Global Amphibian Assesment) disponible en: http://www.pacificbio.org/initiatives/ESIN/News/global_amphibian_assessment.htm.

En América Latina por lo menos 13 países han registrado declinaciones o extinciones de poblaciones de anfibios en los últimos 30 años (Young *et al.* 2001). Diversas evaluaciones sobre el estado de muchas especies de anfibios en esta región brindaron evidencias sobre las causas potenciales de su declinación (Merino-Vitteri 2001; Puschendorf 2003; Burrowes *et al.* 2004; Lips *et al.* 2004), entre las que se encuentran también la pérdida del hábitat, los cambios climáticos como la sequía y las altas temperaturas y la infección con *Bd* (Lips *et al.* 2003; Berger *et al.* 1998; Lips 1999; Ron *et al.* 2003).

En Argentina también se han reconocido numerosas causas dentro de la problemática de la biodiversidad en general y de la declinación de anfibios en particular (e.g. Peltzer *et al.* 2003). Según Lavilla (2003), la información con que se cuenta hasta el momento indica que varias especies de anfibios se encuentran en situación delicada en cuanto a su estatus de conservación, resultando los factores más relacionados a dicha problemática, la alteración de los ambientes boscosos, la reconversión de los espacios naturales en áreas agrícola-ganaderas, las alteraciones de humedales y otros cuerpos de agua, el crecimiento urbano, la contaminación por metales pesados, agroquímicos y desechos orgánicos y la introducción y translocación de especies. En un trabajo más reciente, Lavilla (2009) enumera las siguientes causas reconocidas como más importantes en relación a la declinación global de anfibios:

- *la expansión de la frontera agropecuaria,
- *la aparición de enfermedades emergentes,
- *el auge de los desarrollos mineros,
- *las actividades petroleras,
- *diversos factores relacionados con el contexto social,
- *factores relacionados con el cambio climático global.

Las enfermedades emergentes como causas de la declinación

Durante las últimas tres décadas, han aparecido un alarmante número de brotes de nuevos virus y otros agentes patógenos de los seres humanos, muchos de ellos salen de la naturaleza y se propagan a nivel mundial. Las enfermedades como el SARS, la gripe aviar, el VIH/SIDA y otras, destacan a las enfermedades emergentes como posiblemente la principal amenaza para la salud futura de las personas en todo el mundo (Daszak *et al.* 2007).

Para los anfibios este fenómeno no es una excepción. Como destacan numerosos autores (e.g. Bosch 2003; Lips *et al.* 2008; Pedersen *et al.* 2007; Beldomenico & Begon 2009; Lavilla 2009; Smith *et al.* 2009), las enfermedades han sido reconocidas como uno de los factores que más han contribuido a la declinación global de anfibios alrededor del mundo. Algunos reportes de declinaciones masivas, fueron de especies de anfibios que

habitaban en las tierras altas neotropicales, hábitats ribereños o paleotrópicos, a menudo en las áreas protegidas. Estas declinaciones se han catalogado como "enigmáticos", debido a la falta de una causa obvia (por ejemplo, la deforestación o la introducción de predadores).

En 1997, un equipo internacional formado por científicos de los EE.UU, Reino Unido y Australia se reunió para comparar los hallazgos patológicos similares en anfibios muertos o moribundos colectados en Panamá y Australia (sitios de disminuciones enigmáticas graves). El resultado fue la descripción de una nueva enfermedad fúngica en anfibios llamada “**quitridiomicosis**” asociada con eventos de mortandades simultáneas en estos dos continentes (Berger *et al.* 1998).

El agente causal, un hongo quitridial, se aisló a partir de una población cautiva de *Dendrobates azureus* de la United States National Zoological Park y fue descrito formalmente como un nuevo género y especie *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) (Longcore *et al.* 1999).

La quitridiomicosis ha sido nombrada como una **enfermedad infecciosa emergente**, debido a su reciente propagación en nuevas poblaciones (Daszak *et al.* 1999; Daszak *et al.* 2003), además es señalada como la principal causa de la declinación de algunas poblaciones de anfibios (Skerratt *et al.* 2007) y está asociada con 43 especies de anfibios en declive en siete países de América Latina, y al menos 93 especies en todo el mundo (Berger *et al.* 1998; Lips 1999; Ron *et al.* 2003, citado por Daszak *et al.* 2007). Algunos de los casos más dramáticos de disminución de los anfibios se han producido en América Latina. La Marca *et al.* (2005) cita que por lo menos nueve especies de *Atelopus* en disminución en América Latina, estaban infectadas con el hongo *Bd*. Por otro lado, Lips *et al.* (2003) hipotetizaron la vinculación de *Bd* al declinio de anuros en Las Tablas, Costa Rica. Más tarde, Lips *et al.* (2004) sugieren que *Bd* participó probablemente en la disminución de poblaciones de anuros en Guerrero, Oaxaca y Chiapas en México. En Ecuador el hongo quitridio se encontró en *Telmatobius niger* en 1990, cuatro años antes de que se registrara el último ejemplar (Merino-Viteri *et al.* 2005). En el Perú, Seimon *et al.* (2005) correlacionan la existencia de graves infecciones *Bd* en anfibios en la Cordillera Vilcanota en 2003, con la consiguiente mortandad observada allí en 2004, y la aparente desaparición de dos poblaciones post-metamórficas y pre-metamórficas de *T. marmoratus* en marzo de 2005. En Argentina, en la provincia de Tucumán, Barrionuevo & Mangione

(2006) y Barrionuevo & Ponssa (2008), en un muestreo exhaustivo entre 2001 y 2005 asociaron la presencia de *Bd* a declinaciones y probables extinciones de *T. pisanoi*, *T. latices* y *T. ceiorum*.

Bd se encuentra actualmente distribuido en todos los continentes con excepción de la Antártida (Fig. 1.2) (Rachowicz *et al.* 2005), ya que su hospedante está ausente en ese continente. Teniendo en cuenta el impacto sobre las poblaciones de anfibios de todo el mundo, ha sido considerada “la peor enfermedad infecciosa alguna vez registrada entre los vertebrados en términos del número de especies afectadas, y su propensión a conducirlos a la extinción” (ACAP 2005).

Se han planteado dos hipótesis para explicar el carácter emergente de la enfermedad causada por *Bd*:

La “hipótesis del patógeno incipiente” (NPH) que establece que *Bd* se ha esparcido o extendido recientemente hacia áreas geográficas y especies hospedantes nuevas, como resultado de la dispersión de *Bd* mediada por el hombre.

Por otra parte la “hipótesis del patógeno endémico” (EPH), que establece que *Bd* ha estado presente en el ambiente, pero que ha incrementado el rango de huéspedes o de su patogenicidad (Rachowicz *et al.* 2005).

Muchos estudios recientes están apoyando la NPH como patógeno incipiente, y que está siendo dispersado mundialmente a través de distintos vectores (Kilpatrick *et al.* 2010; Vredenburg *et al.* 2010; Walker *et al.* 2010; Skerratt *et al.* 2007; Moorehouse *et al.* 2003).

Teniendo en cuenta descubrimientos recientes (Garmin *et al.* 2012) a cerca de la capacidad de supervivencia y proliferación de *Bd* en las escamas de los miembros posteriores de las aves acuática, una tercera hipótesis podría plantarse a partir de la NPH, en donde el patógeno pudo haberse dispersado por el mundo a través del movimiento de estos vertebrados.

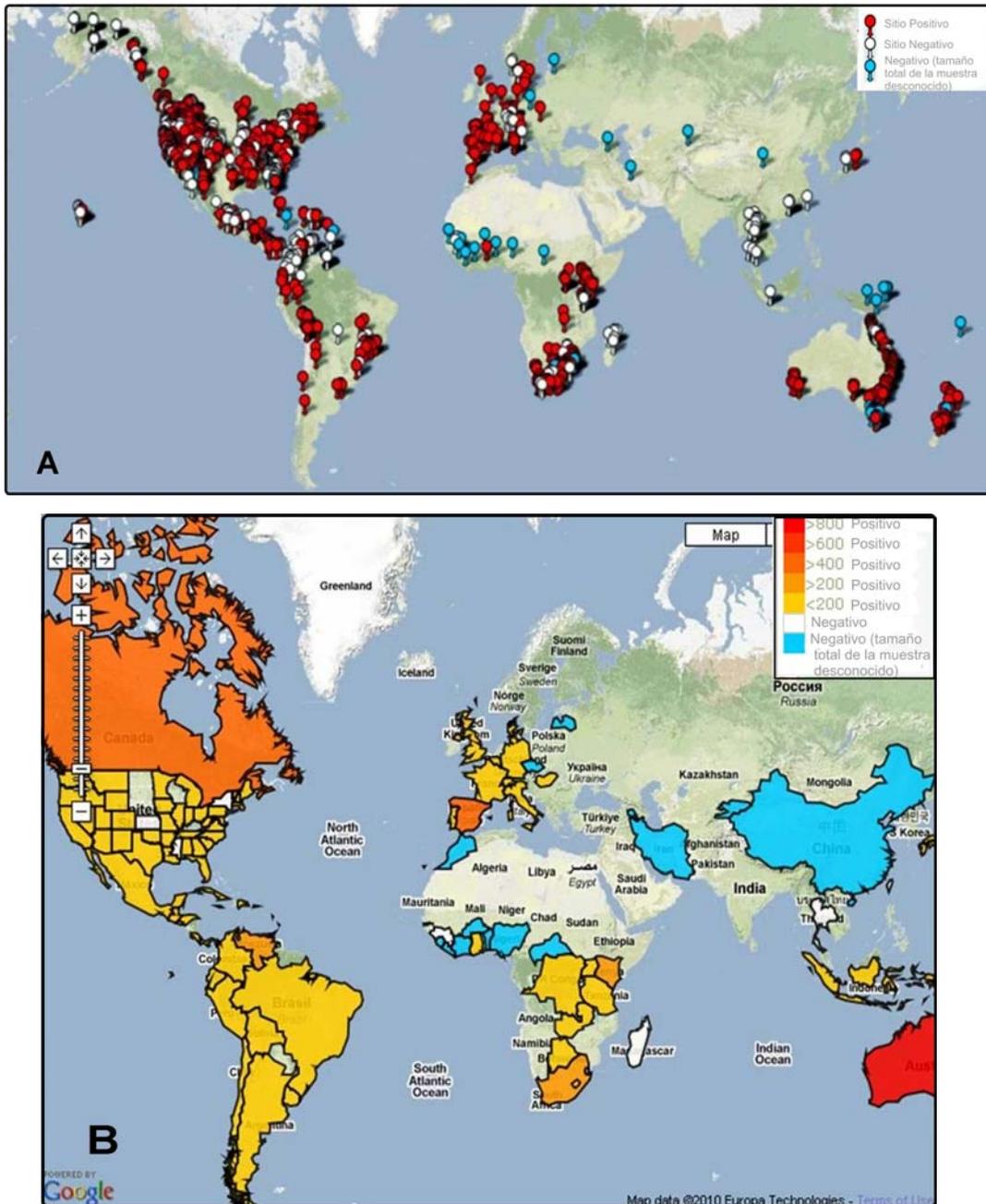


Fig 1.2. Mapa mundo con los registros del hongo A) Puntos analizados. B) Dato por país. Fuente: Olson, D., Ronnenberg, K. & Fisher, M. 2010, comunicación personal (disponible en www.spatalepidemiology.net/Bd-maps).

El origen de *Batrachochytrium dendrobatidis*

Las evidencias muestran que *Bd* se originó en África, registrándose el primer caso de infección en el año 1938, en la rana de uñas africana, *Xenopus laevis*. Esta especie es una de las llamadas “especies reservorio” pues presenta resistencia a la enfermedad quitridiomycosis causada por el hongo *Bd* (Weldon 2002; Parker *et al.* 2002). Esta condición la ubica como una especie ideal para la transmisión de *Bd* a través del tráfico internacional. Se cree que la enfermedad salió de África y se diseminó gracias a que en 1934 se descubrió la prueba de embarazo para humanos, que utilizaba esta especie y en donde enormes cantidades de individuos fueron sacados de la naturaleza y exportados a todo el mundo. Luego de esto se volvió un importante modelo para estudios científicos de inmunidad, embriología y biología molecular (Weldon *et al.* 2004). El siguiente registro positivo para *Bd* se encontró en Canadá en 1961 (Ouellet *et al.* 2003), posteriormente en Australia en 1978 (Speare 2001; Berger *et al.* 1999a), América Central en 1983 (Rollins-Smith *et al.* 2002), Sudamérica en 1986 (Bonaccorso *et al.* 2003), Europa en 1997 (Bosch *et al.* 2001), Oceanía en 1999 (Waldman *et al.* 2001) y por último Asia en 2006 (Yumi *et al.* 2008). A pesar de lo expuesto, la hipótesis de que *Bd* se dispersó por el mundo a través del tráfico de *Xenopus*, carece de fundamento lógico ya que existen muchísimos lugares en donde estas ranas no llegaron, es más, lugares en donde nunca habían llegado científicos. Este es el caso de los ejemplares de *Pleurodema marmorata* y *Telmatobius marmoratus* infectados con *Bd* en la Cordillera Vilcanota en Perú (Seimon *et al.* 2007), en lugares totalmente inhóspitos, el más alto a 5348 msnm.

En América Latina, Lips (1999) y Lips *et al.* (2004) han registrado y caracterizado la expansión del patógeno a manera de una ‘ola’ (“wave”) e hipotetizan que el patógeno se movió desde América del Norte a través de América Central (entre las décadas de 1970 y 1990), causando declinaciones en numerosas familias y especies de anuros. Lips (1999) sugiere que tanto los peces exóticos, los humanos y otros animales podrían haber introducido este patógeno. Esto podría haber sucedido luego de que el patógeno invadió América Central en 1983. Esta última hipótesis aún está en discusión.

La magnitud del movimiento internacional de anfibios por razones comerciales o institucionales es significativa y constante. Las actividades comerciales se centran en el

comercio de animales de compañía, alimentos y laboratorio (como es el caso de *Lithobates catesbeiana*) y también para abastecer los estanques ornamentales (como la rana de uñas Africana *Hymenochirus curtipes*). Estas operaciones son una preocupación particular por la introducción de enfermedades, ya que los recintos al aire libre permiten el contacto entre especies exóticas y nativas y porque a menudo son liberados en áreas inapropiadas accidental o deliberadamente. Debido a estas operaciones se han observado una cantidad creciente de evidencias de que la quitridiomycosis está presente en muchas de estas formas de translocación de anfibios (Daszak *et al.* 2001)!!

Los mecanismos que se sospechaban hasta ahora acerca de la dispersión natural de *Bd*, incluyen movimientos a través de cuerpos de agua y a través del agua superficial durante las precipitaciones, el movimiento de anfibios infectados y la translocación en fómites y vectores, tales como el sustrato húmedo y posiblemente las aves (Speare *et al.* 2001; Johnson & Speare 2003, 2005). Pero trabajos recientes ponen en evidencia dos vectores de *Bd* en la naturaleza: por un lado Shapard *et al.* (2011) demostró que *Bd* puede infectar experimentalmente nematodos (*Caenorhaditis elegans*) causando además mortalidades en estos individuos; por otro lado Garmin *et al.* (2012) evidenció la capacidad de *Bd* de colonizar y reproducirse como saprótrofo en las escamas de los dedos de las patas de aves acuáticas. Teniendo en cuenta que *Bd* puede sobrevivir períodos de desecación de 30 minutos, el patógeno adherido a los pies de la aves acuáticas podría sobrevivir cuando éstas se mueven a charcas cercanas (Garmin *et al.* 2012).

La genética de poblaciones puede ayudar a discriminar entre los posibles orígenes de una enfermedad emergente. Una predicción de la hipótesis del patógeno incipiente es que los genotipos de las cepas virulentas de *Bd* de las regiones en donde se lo considera exótico, deberían mostrar reducida variabilidad en sus alelos y una relación importante cuando se compara con el genotipo del hongo en la población originaria (Rachowich *et al.* 2005)

La escasa variabilidad genética del hongo y la baja correlación entre los genotipos del hongo y las distintas regiones geográficas en poblaciones alrededor del mundo apoyarían esta hipótesis (Morehouse *et al.* 2003; Morgan *et al.* 2007).

Batrachochytrium dendrobatidis

Bd es un hongo unicelular perteneciente al Phylum Chytridiomycota, Orden Rhizophydiales (Letcher *et al.* 2006). Presenta talos monocéntricos o coloniales y uno a varios ejes rizodiales filiformes. Cada segmento del talo colonial forma un zoosporangio (=zoosporangio), con una o más papilas de descarga inoperculadas. De estas emergen zoosporas móviles esféricas o levemente ovaladas con un único flagelo liso posterior.

Se desarrolla con zoosporangios monocéntricos o coloniales en la epidermis de los anfibios (Longcore *et al.* 1999).

Bd es el único miembro del Phylum Chytridiomycota capaz de parasitar y causar una enfermedad en vertebrados (Berger *et al.* 1998, 1999a). El ciclo de vida de *Bd* tiene dos etapas principales: la etapa móvil, que se dispersa por el agua (mediante las zoosporas flageladas) y la estática, representada por el talo monocéntrico que se desarrolla en un zoosporangio para completar el ciclo asexual. *Bd* está adaptado para vivir en la epidermis estratificada de la piel de los anfibios anuros y urodelos. Los talos se desarrollan dentro de las células epidérmicas; inicialmente parasitan células de las capas profundas y tienen una tasa de desarrollo coincidente con la maduración de las células de la epidermis a medida que se desplazan hacia fuera y se queratinizan. Allí completan su desarrollo como zoosporangios dentro de las células muertas superficiales queratinizadas (que carecen de organelas) y desarrollan sus tubos de descarga que se abren a la superficie (MDT for Aquatic Animals 2012). No se han encontrado esporas de resistencia en preparados histológicos de pieles infectadas o durante el examen en fresco de pieles durante el proceso de aislamiento del hongo, en más de 80 individuos (Longcore pers.comm. citado por Morehouse *et al.* 2003). Aunque Morgan *et al.* (2007) sugiere la existencia de una estructura de reposo que lo disperse espacialmente y le permita persistir aún en ausencia de hospedantes.

En laboratorio *Bd* puede ser cultivado usando medio de cultivo con base de agar o en caldo nutritivo (Longcore *et al.* 1999). Experimentos en cultivo sugieren que *Bd* tiene la tasa más alta de crecimiento entre los 17 y 25 °C, con un período de 4 a 5 días de crecimiento, pero puede crecer y reproducirse a temperaturas que rondan entre los 4 a 25 °C (Johnson & Speare 2003; Piotrowski *et al.* 2004).

En conclusión, en los anfibios metamorfoseados, *Bd* puede encontrarse en el estrato granuloso o córneo de la epidermis del cuerpo, principalmente en los dedos y la parte ventral del cuerpo, en especial el parche pélvico hipervascularizado. En las larvas, *Bd* se aloja en las regiones queratinizadas, pico córneo y dientes, del disco oral de las mismas (Berguer *et al.* 1998; Pessier *et al.* 1999). La distribución de los zoosporangios en larvas acompaña los cambios en la distribución de la epidermis queratinizada durante la metamorfosis (Marantelli *et al.* 2004).

Los cambios epidérmicos asociados con esta parasitosis consisten en la pérdida irregular de células de la piel, erosión, y segmentos de marcado engrosamiento del estrato córneo (hiperqueratosis). Cambios más profundos consisten en moderada hiperplasia del estrato espinoso (acantosis), (Pessier *et al.* 1999; Berger *et al.* 1998). Los individuos infectados pueden presentar cambios en el comportamiento como aletargamiento, aumento del desprendimiento de la piel del cuerpo (muda), aumento de la inapetencia y posturas anormales (Berger *et al.* 2005b).

Los anfibios como bioindicadores

Aunque generalmente no son foco de todas las miradas, los anfibios pueden comprender una proporción sorprendentemente grande de la abundancia y la biomasa de los vertebrados en algunos humedales templados y sistemas forestales (e.g. Burton & Likens 1975; Stewart & Woolbright 1996), y son los vertebrados terrestres más abundantes en algunas partes de los trópicos húmedos (Stebbins & Cohen 1995). Además, los anfibios pueden contribuir considerablemente al flujo energético porque, como ectotermos, la energía ingerida es convertida eficientemente en biomasa, que luego se vuelve disponible para niveles tróficos superiores (Pough 1980). Muchos anfibios también tienen ciclos de vida complejos en los cuales diferentes estadios de desarrollo ocupan diferentes hábitats, usualmente acuáticos y terrestres, y se alimentan de diferentes recursos nutricios (Whiles *et al.* 2006).

La distribución actual de anfibios y reptiles reflejan estrechamente patrones de lluvia y temperatura, y, debido a lo anteriormente mencionado, el cambio climático tiene y tendrá impactos significativos sobre la biodiversidad de anfibios y reptiles. Todos los

grandes parámetros del cambio climático (e.g. temperatura del mar y del aire, radiación solar, UV, humedad, cobertura de nubes, precipitaciones, la frecuencia de eventos de condiciones extremas y la elevación del nivel del mar) tienen implicancias sobre la biodiversidad (Bickford *et al.* 2010).

Las enfermedades infecciosas son reconocidas cada vez más como amenazas clave para las poblaciones de animales, pero es relativamente poco lo que se entiende sobre su ecología en comparación con los patógenos humanos (Daszak *et al.* 2000).

La disminución de los anfibios es actualmente uno de los problemas de conservación más urgentes y la presencia de *Bd*, identificado hace aproximadamente una década, parece haber tenido un papel importante (Kilpatrick *et al.* 2010). En los últimos años se han desarrollado muchos estudios de campo (Kriger & Hero 2006; 2008) y de laboratorio (Blaustein *et al.* 2005), para averiguar y dilucidar la ecología del hongo *Bd* en los distintos ambientes y bajo diversas condiciones. Entre las poblaciones de anfibios es posible encontrar un gran rango de susceptibilidades a la infección por *Bd*; la tasa de mortalidad y el tiempo de muerte varía entre las especies, clases de edad, condiciones de temperatura, la cepa del hongo, la concentración de zoosporas, la exposición a contaminantes del agua y el cambio climático (Andre *et al.* 2008; Ardipradja, 2001; Bosch *et al.* 2007; Lamirande & Nichols 2002; Woodhams *et al.* 2003; Davidson *et al.* 2003; Parris & Baud 2004; Pounds *et al.* 2006; Retallick & Miera 2007). Algunas de estas variaciones parecen ser causadas por diferencias en los péptidos de la piel del anfibio (Rollins-Smith *et al.* 2003; Woodhams *et al.* 2007b) o la tasa de desprendimiento de mudas de piel infectadas por parte del hospedante (Davidson *et al.* 2003; Woodhams *et al.* 2007a). Las larvas parecen desarrollar una infección subclínica (Berger *et al.* 1998; Bradley *et al.* 2002; Rachowicz & Vredenburg 2004; Blaustein *et al.* 2005) actuando como reservorios de *Bd* y esparciendo el hongo por diferentes ambientes y especies (Daszak *et al.* 1999, 2003). Sin embargo *Bd* parece afectar la tasa de crecimiento y otros aspectos del desarrollo de las larvas (Parris & Baud 2004). Además de estas últimas, algunos estadios post-larvales de anuros y urodelos (e.g. *Lithobates catesbeianus*, *Ambystoma tigrinum*, *Hyla regilla*, *Limnodynastes tasmaniensis*), demostraron también resistencia a la enfermedad (Davison *et al.* 2003; Hanselmann *et al.* 2004; Garcia *et al.* 2006; Woodhams *et al.* 2007a).

La introducción de *Bd* en poblaciones naive susceptibles ha causado epidemias de elevada mortalidad. Si las poblaciones sobreviven, los patógenos persisten y se vuelven endémicos, con tasas de mortalidad reducida y, en algunos casos, la recuperación de las mismas (McDonald *et al.* 2005). Esto sugiere que hay una selección para la resistencia del hospedante contra la enfermedad (Young 2007).

La presencia de un parásito o patógeno no causa necesariamente una enfermedad o las declinaciones de poblaciones de anfibios. Hay muchos ejemplos de patógenos graves que son “oportunistas” y están normalmente en individuos saludables (Woodhams *et al.* 2011). Por lo tanto cabe distinguir la **infección** de los anfibios por el hongo patógeno *Bd*, de la manifestación de la **enfermedad** que éste produce en los individuos, a la que llamamos **quitridiomicosis**.

Desde hace unos años se ha centrado la atención en la relación sinérgica que existe entre el clima, las enfermedades emergentes y su contribución a la declinación de poblaciones de anfibios, conocida como la “hipótesis de la epidemia relacionada al clima” (“the climate-linked epidemic hypothesis”) (Harvell *et al.* 2002; Pounds *et al.* 2006).

Las condiciones ambientales pueden tener un gran impacto sobre la dinámica huésped-patógeno y la variación ambiental se ha propuesto como un conductor principal subyacente a la aparición de la quitridiomicosis en anfibios (Pounds *et al.* 2006). Frecuentemente, los factores específicos que están implicados en la modulación de la dinámica hospedante/patógenos no se conocen, sin embargo, se manifiestan claramente como cambios en la incidencia estacional de la enfermedad. Los anfibios son ectotermos, y como tal, su fisiología está determinada únicamente por su medio externo. Específicamente, la temperatura ambiental tiene un fuerte efecto sobre el sistema inmunológico de los anfibios y los componentes de este sistema son altamente dependientes de la temperatura (Raffel *et al.* 2006). En este caso, es razonable esperar que la interacción entre las enfermedades infecciosas, específicamente *Bd*, y sus hospedantes anfibios, depende de la temperatura (Fisher 2007). Muchos estudios han apoyado esta hipótesis:

Pounds *et al.* (2006) demuestra que el calentamiento a gran escala es un factor clave en la disminución de los anfibios, y que éste puede acelerar el desarrollo de la enfermedad mediante la traducción en cambios de temperatura local o a microescala (aumentos y disminuciones) favorables para *Bd*.

Por otro lado, Kriger & Hero (2007) encontraron una relación significativa entre los años de epidemia de *Bd* y las variables ambientales, principalmente la temperatura y la humedad.

En otros estudios, Bosch *et al.* (2007) mostraron una relación entre el aumento de la temperatura y la aparición de enfermedades relacionadas con *Bd*, lo cual también es consistente con la hipótesis de la epidemia relacionada al clima.

Contrariamente, otros autores (Walker *et al.* 2010) no encontraron evidencias de relación entre las variables ambientales y la presencia de *Bd*, pero sí hallaron una fuerte asociación entre la variable altitud y la quitridiomycosis.

La presencia de *Bd* en Argentina

El continente americano cuenta con el registro de *Bd* más antiguo fuera de África (Ouellet *et al.* 2003) y este hongo patógeno ya ha sido citado a lo largo de todo el continente, habiendo sido reportado en: Canadá (Ouellet *et al.* 2003), Estados Unidos (Steiner & Lehtinen 2008; Zellmer *et al.* 2008), México (Rollins-Smith *et al.* 2002; Lips *et al.* 2004), Puerto Rico (Burrowes *et al.* 2004), Costa Rica (Lips *et al.* 2003, Puschendorf 2003), Panamá (Lips 1999), Venezuela (Bonaccorso *et al.* 2003), Ecuador (Ron & Merino-Viteri 2000), Perú (Seimon *et al.* 2005), Bolivia (Barrionuevo *et al.* 2008), Brasil (Toledo *et al.* 2006), Uruguay (Borteiro *et al.* 2009; Bardier *et al.* 2011) y Argentina (Herrera *et al.* 2005).

En Argentina, la evidencia más temprana de la presencia de este hongo data del año 2002, donde se lo encontró en un ejemplar de la rana criolla (*Leptodactylus latrans*) en la provincia de Buenos Aires (Herrera *et al.* 2005). El individuo fue hallado muerto en la margen del arroyo El Pescado (35° 01' S, 57° 51' O; 11msnm) (Tabla 1).

En el año 2006, Barrionuevo & Mangione (2006) reportan la presencia de *Bd* en dos especies del género *Telmatobius*, *T. atacamensis* y *T. pisanoi*, colectados en el año 2003 en la Provincia de Salta y la Provincia de Tucumán, respectivamente. Los ejemplares infectados fueron encontrados muertos. Cabe destacar que ambas especies se encuentran bajo alguna categoría de amenaza [*T. atacamensis*: En Peligro Crítico de Extinción (Lavilla 2004a) y en el caso de *T. pisanoi*: En Peligro de Extinción (Lavilla 2004b)].

Posteriormente Fox *et al.* (2006) registraron la presencia de *Bd* en una población de *Atelognathus patagonicus* que habita la Laguna Molle en el Parque Nacional Laguna Blanca (PNLB, Provincia de Neuquén). En este caso también se trata de una especie que se encuentra en una categoría de protección [*A.patagonicus*: En Peligro de Extinción (Úbeda *et al.* 2010)] y es el primero registrado en una población que reside dentro de un área natural protegida (Tabla 1.1).

En el año 2005, se produjo un nuevo registro de *Bd*, esta vez en el sapito panza amarilla (*Elachistocleis bicolor*) que fue encontrado muerto en las márgenes de la Ruta Nacional N° 12, camino a Posadas (Arellano *et al.* 2009). El hallazgo representa uno de los registros más sureños de *Bd* en la ecorregión de la Selva Paranaense, región de elevada diversidad tanto de América del Sur como del mundo (Mittermeier *et al.* 1998; Brooks *et al.* 2006) (Tabla 1.1).

En el año 2005, fue hallado un ejemplar de *L. latrans* en la región de Chaco Serrano de la Provincia de Córdoba, sobre el riachuelo Toro Muerto (Ghirardi *et al.* 2009); otro registro de *Bd* posterior en esta misma especie fue hallado en la Provincia de Buenos Aires en el año 2006 (uno hallado en la Reserva Natural Integral Punta Lara y el otro en el Camino a Isla Santiago) (Arellano *et al.* 2006). Ese mismo año se encontró un individuo muerto de *L. gracilis*, también perteneciente a la provincia de Córdoba (Ghirardi *et al.* 2009). El siguiente registro de *Bd* se produjo en larvas de *Hypsiboas cordobae* y *Odontophrynus occidentalis* colectadas el mismo año en la Reserva Natural Estricta “Quebrada de las Higueritas” (Provincia de San Luis), representando el segundo encuentro de *Bd* en un área natural protegida (Gutierrez *et al.* 2010).

Agostini *et al.* (2010), por su parte realizaron una búsqueda sistemática de *Bd* en diversos agroecosistemas ubicados en los alrededores de la ciudad de La Plata, y como consecuencia de esta intensa búsqueda, registraron *Bd* en *L. latrans*, *Pseudis minutus*, *H. pulchellus* y *Rhinella fernandezae* entre septiembre de 2009 y abril de 2010 (Tabla 1.1).

Por otro lado, Delgado *et al.* (2010) registraron *Bd* en ejemplares de *Physalaemus fernandezae* de una población que se reproduce en invierno en los pastizales inundados de la Reserva Natural Punta Lara, Partido de Ensenada (34° 48' 11.93" S, 58° 0' 35.70" O; 1msnm). Recientemente, en la Provincia de Córdoba se reportó nuevamente la presencia de *Bd* en 5 especies (*H. cordobae*, *O. achalensis*, *Pleurodema kriegi*, *R. achalensis* y *R.*

arenarum) halladas muertas o moribundas entre agosto de 2009 y abril de 2010 (Longo *et al.* 2010) (Tabla 1.1).

Finalmente Ghirardi (2011) reportó, mediante un muestreo sistemático en las regiones del Litoral, Cuyo y Patagonia, siete nuevas especies infectadas con *Bd*: *Physalaemus sp.* en la provincia de Misiones; *L. chaquensis* en la provincia de Santa Fe; *R. spinulosa spinulosa* en la provincia de Jujuy; *R. spinulosa papillosa* en la provincia de San Juan; *A. pehuenche* en la provincia de Mendoza; *A. patagonicus* en Neuquén; y *Pleurodema thaul* y *P. bufoninum* en Río Negro (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Registros de presencia de *Bd* en anfibios de Argentina.

Provincia	Especie	Referencia
Salta	<i>Telmatobius atacamensis</i>	Barrionuevo & Mangione 2006
Tucumán	<i>T. pisanoi</i>	Barrionuevo & Mangione 2006
Misiones	<i>Elachistocleis bicolor</i> <i>Physalaemus sp.</i>	Arellano <i>et al.</i> 2009 Ghirardi 2011
San Luis	<i>Hypsiboas cordobae</i> <i>Odontophrynus occidentalis</i>	Gutiérrez <i>et al.</i> 2010 Gutiérrez <i>et al.</i> 2010
Jujuy	<i>Rhinella spinulosa spinulosa</i> <i>T. marmoratus</i>	Ghirardi 2011 Ghirardi 2011
Santa Fe	<i>H. pulchellus</i> <i>Leptodactylus chaquensis</i>	Ghirardi 2011 Ghirardi 2011
La Rioja	<i>R. spinulosa spinulosa</i>	Ghirardi 2011
San Juan	<i>L. latrans</i> <i>O. occidentalis</i> <i>R. spinulosa papillosa</i>	Ghirardi 2011 Ghirardi 2011 Ghirardi 2011
Córdoba	<i>L. gracilis</i> <i>L. latrans</i> <i>H. cordobae</i> <i>L. latrans</i> <i>O. achalensis</i>	Ghirardi <i>et al.</i> 2009 Ghirardi <i>et al.</i> 2009 Longo <i>et al.</i> 2010 Longo <i>et al.</i> 2010 Longo <i>et al.</i> 2010

	<i>Pleurodema kriegi</i>	Longo <i>et al.</i> 2010
	<i>R. achalensis</i>	Longo <i>et al.</i> 2010
	<i>R. arenarum</i>	Longo <i>et al.</i> 2010
Buenos Aires	<i>L. latrans</i>	Herrera <i>et al.</i> 2005
	<i>L. latrans</i>	Arellano <i>et al.</i> 2006
	<i>L. latrans</i>	Agostini <i>et al.</i> 2010
	<i>H. pulchellus</i>	Agostini <i>et al.</i> 2010
	<i>Pseudis minutus</i>	Agostini <i>et al.</i> 2010
	<i>R. fernandezae</i>	Agostini <i>et al.</i> 2010
	<i>P. fernandezae</i>	Delgado <i>et al.</i> 2010
Neuquén	<i>Atelognathus patagonicus</i>	Fox <i>et al.</i> 2006
	<i>A. patagonicus</i>	Ghirardi 2011
Mendoza	<i>Alsodes pehuenche</i>	Ghirardi 2011
Río Negro	<i>P. thaul</i>	Ghirardi 2011
Chubut	<i>P. bufoninum</i>	Ghirardi 2011

En Argentina, el conocimiento de las disminuciones de anfibios es escaso, y resulta importante generar información que permita un mejor manejo y conservación de especies. El estudio de las susceptibilidades y sensibilidades de anfibios anuros representa una aproximación al conocimiento del efecto de este hongo quitridial sobre las poblaciones de anfibios en Argentina.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar los efectos de *Bd* sobre distintas especies de anuros autóctonos.

Objetivos particulares

- ✚ Analizar la presencia de *Bd* en distintas especies de anuros nativas en el área de estudio seleccionada, y en anuros provenientes de otras áreas.
- ✚ Aislar la cepa nativa de *Bd* a partir de especies de anuros autóctonos de Argentina.
- ✚ Estudiar genéticamente la cepa autóctona y analizar su similitud con cepas de *Bd* de otros países.
- ✚ Analizar la susceptibilidad y sensibilidad de las distintas especies de anuros a la infección por *Bd* en bioensayos de laboratorio.

Hipótesis

1. El hongo *Bd* infecta distintas especies de anuros autóctonos en el área de estudio.
2. Todas las especies de anuros analizadas son susceptibles a la infección por *Bd* en bioensayos de laboratorio.
3. Todas las especies de anuros analizadas responden con diferentes susceptibilidades a la infección por *Bd* en bioensayos de laboratorio.

4. La cepa autóctona presenta alta similitud genética con cepas latinoamericanas.

2. Metodología

Área de estudio

El área de estudio se sitúa en las afueras de la ciudad de La Plata (provincia de Buenos Aires) y se ubica dentro del valle de inundación del arroyo “El Pescado” (Fig. 2.1), enmarcada en la provincia Fitogeográfica denominada “Provincia Pampeana” (Cabrera & Willink 1973). El Arroyo El Pescado se encuentra al este de la ciudad de La Plata. Es típico de la región, corre de oeste a este, con un desarrollo de tipo dendrítico y un recorrido subcircular y desemboca finalmente en el Río de la Plata (Ronco *et al.* 2001; Camilión *et al.* 2003). El pastizal del campo estudiado se encuentra dominado por gramíneas del género *Agropyron* y *Stipa*. Dentro de este pastizal artificial se ubica el área de estudio que comprende un rectángulo de 300 x 620 m aproximadamente (una superficie total aproximada de 19 ha) y donde están situadas dos charcas temporarias, la Charca A (35° 1'5.13"S; 57°51'27.19"O), con un tamaño aproximado de 50 m en su diámetro mayor y 30 m en el menor, y la Charca B (35° 1'15.63"S; 57°51'25.32"O) de 65 m (diam. mayor) x 50 m (diam. menor). Estas charcas son el sitio reproductivo de numerosas especies de anfibios que habitan el lugar. La Charca A se encuentra vegetada por juncos (*Schoenoplectus californicus*), colas de zorro (*Ceratophyllum aquaticum*), duraznillos blancos (*Solanum glaucophyllum*) y distintas especies acuáticas como lentejas de agua (*Spirodela intermedia*, *Lemna gibba* y *Wolffiella oblonga*), *Azolla filiculoides*, *Ludwigia peploides* e *Hydrocotyle ranunculoides*. La Charca B (Fig.2.2) se caracteriza por la presencia de juncos (*Schoenoplectus californicus*) y totoras (*Typha latifolia*). También se encuentran cola de zorro, *Lemna* o lentejas de agua, *Sagittaria* o saetas y helechitos de agua (*Azolla*). Existe también una charca de reducido tamaño, la charca 0 (cero), que se forma cuando abundan las lluvias y está situada entre las dos charcas mencionadas (charca A y charca B). Esta pequeña charca tiene un tamaño aproximado de 25 m (diam. mayor) x 20 m (diam. menor).

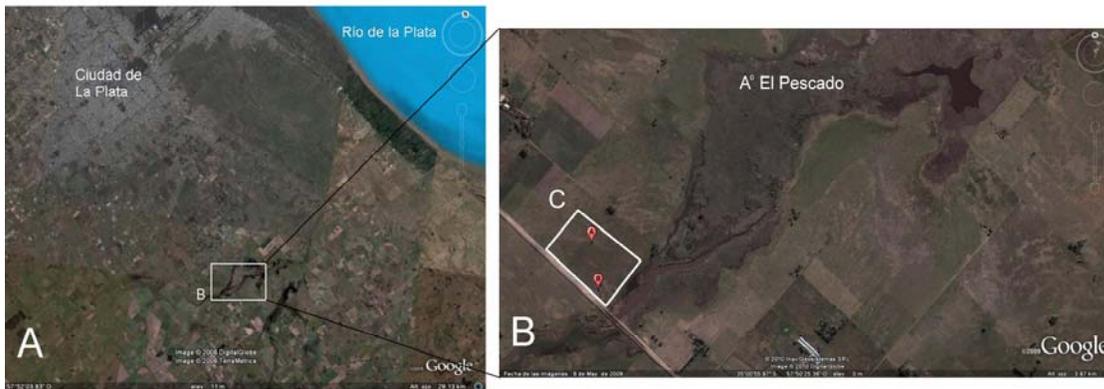


Figura 2.1. Localización del área de Muestreo (A). En B, **área de muestreo** (C) con las charcas A y B dentro de ella.

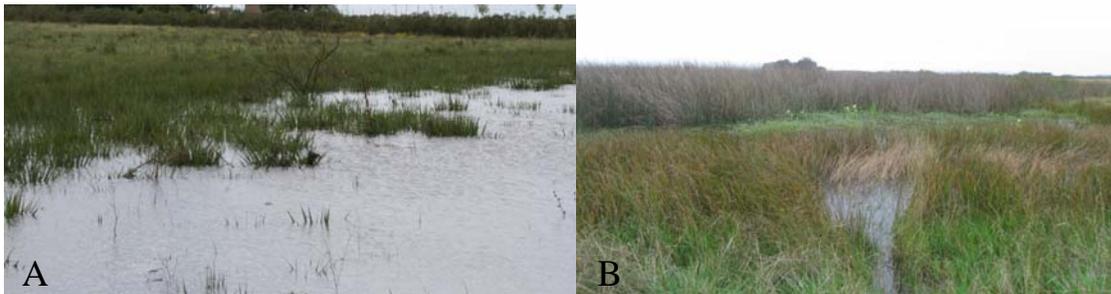


Figura 2.2. Charca A y B. Área de Muestreo.

Especies de anfibios del área de estudio

En el lugar habitan y se reproducen 14 especies de anfibios anuros pertenecientes a seis familias: *Hypsiboas pulchellus*, *Dendropsophus nanus*, *Dendropsophus sanborni*, *Scinax squalirostris*, *Scinax granulatus* y *Pseudis minuta* (Hylidae); *Odontophrynus americanus* (Cycloramphidae); *Ceratophrys ornata* (Ceratophryidae); *Leptodactylus latrans*, *Leptodactylus latinasus* y *Leptodactylus gracilis* (Leptodactylidae); *Pseudopaludicola falcipes* (Leiuperidae); *Rhinella arenarum* y *Rhinella fernandezae* (Bufonidae) (Natale 2006). Por lo tanto se consideró una zona propicia para la búsqueda de distintas especies de anuros que pudiesen estar infectadas con *Bd*.

Selección del Área de muestreo

El área de muestreo viene siendo estudiada desde el año 1998, por un grupo de investigadores que han realizado diversos estudios sobre la biología de las especies de anuros del lugar y de las características de los cuerpos de agua como sitios reproductivos (Natale 2006). La elección del área de estudio tuvo su fundamento en el hallazgo previo del hongo *Bd* (primer hallazgo para la Argentina) en el mismo lugar en el año 2002 (Herrera *et al.* 2005). En el momento en que se iniciaron los muestreos (año 2006) solamente se contaba con el registro de Herrera *et al.* (2005) para la provincia de Buenos Aires; los otros hallazgos para la provincia y para el país se sucedieron posteriormente en el tiempo. Por ello y con la objetivo de aislar la cepa de *Bd* en Argentina se decidió tomar ese sitio como área de muestreo.

Análisis de la presencia de *Bd* en anuros

Anuros del Área de estudio

Muestreo por transectas y trampas de pozo (captura viva)

Transectas

Para los muestreos a campo en el área de estudio, se siguió la metodología de transectas para muestreos de áreas pequeñas (Jaeger 2001), dado a que nuestro objetivo fue encontrar los anuros que deambularan, moribundos o que se encontraran muertos debido a la enfermedad, las transectas no se realizaron con subsecciones dentro de las cuales se buscara minuciosamente los anfibios del lugar. Durante los muestreos se trazaron 100 transectas de 600 m de longitud y 2 m de ancho separadas por 3 m cada una (Fig. 2.3). Los muestreos se realizaron durante 2 años consecutivos, de 3-4 veces por semana (4 horas diarias de 5:30 a.m. a 9:30 a.m.) con 5 personas a campo; el horario elegido intentó localizar a los individuos que deambulaban en horarios en los que no estuvieran activos naturalmente. Los muestreos fueron realizados durante los meses de bajas temperaturas (de Marzo a Octubre), meses en los que la enfermedad predomina (Woodhams & Alford, 2005; Daszak *et al.* 1999; Retallick *et al.* 2004) y continuaron esporádicamente durante todo el

resto del año, para la colecta de larvas y adultos para los bioensayos.

Durante la realización de las transectas se recolectaron los individuos muertos, moribundos o aletargados (con posibles signos de la enfermedad) utilizando guantes de látex, se depositaron en bolsas de polietileno y se transportaron al laboratorio hasta su procesamiento. La colecta de ejemplares se realizó con el permiso de la Dirección de Control y Uso de los Recursos Naturales y Pesqueros del Ministerio de Asuntos Agrarios (Expediente N° 22228-30/06; ANEXO II).

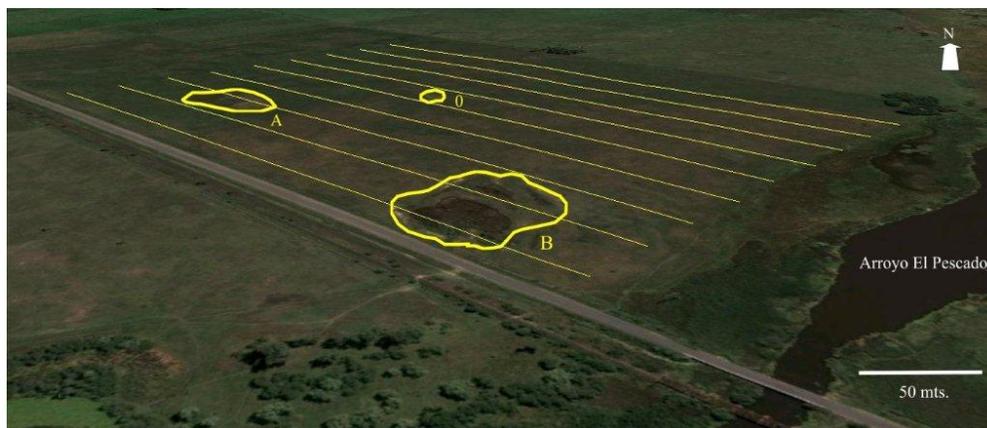


Figura 2.3. Esquema de las transectas realizadas durante el muestreo en el área de estudio. A, B y 0: charcas.

Trampas de pozo

Como metodología adicional se utilizaron trampas de pozo (de captura viva) dispuestas en baterías. Cada trampa consistió en un balde plástico de 10 lts de capacidad, enterrado con la abertura superior al ras de la superficie (Fig. 2.4), y un embudo plástico en la parte superior para evitar la salida de los individuos. Las trampas estaban provistas de una tapa de madera en la superficie con espacio para el ingreso del animal (Corn 2001). Las trampas fueron revisadas periódicamente extrayendo los ejemplares capturados. Los dispositivos utilizados fueron modificaciones de trampas anteriormente usadas para muestreos anuales en el mismo sitio (Agostini *et al.* 2005). Siempre que fue posible, se

determinó en el campo el estadio de los ejemplares colectados (A: adulto, J: juvenil, L: larva).

Durante los muestreos se siguieron los protocolos de bioseguridad “Hygiene protocols for the control of disease in frogs (Haering & Wellington 2000) y aquellos detallados en Speare *et al.* (2004) para evitar posible contaminación cruzada de patógenos entre cuerpos de agua y ejemplares.

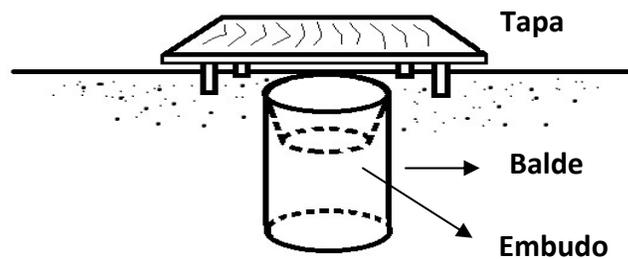


Figura 2.4. Esquema de las trampas de pozo (de captura viva).

Análisis de las muestras

Los individuos colectados se trasladaron al laboratorio. Los ejemplares moribundos o vivos fueron sacrificados sumergiéndolos en una suspensión del anestésico MS222 (Tricaína metano sulfonato) hasta 10 minutos después del cese de la respiración.

Se tomaron muestras de piel del parche pélvico y de la superficie ventral de los muslos para la realización de cortes histológicos. Las muestras se tomaron teniendo en cuenta la distribución desigual del hongo en la superficie del cuerpo de las ranas, con una mayor frecuencia en las partes ventrales del cuerpo y en los dedos, y menor en las regiones dorsales (Berger *et al.* 2005c). Se tomaron 2 parches de piel de cada ejemplar, de 5 mm² a 10 mm² (dependiendo del tamaño del individuo); se fijaron en una solución de Formaldehído al 10% y se conservaron en alcohol al 70%. Las muestras fueron procesadas siguiendo el protocolo histológico clásico que utiliza la tinción de Hematoxilina y Eosina (H y E). Para ello las muestras se deshidrataron en graduaciones crecientes de alcohol, se sumergieron en un solvente orgánico puente (miscible en alcohol y parafina):

“aclaramiento”, y se incluyeron en parafina líquida (a 60°C). Luego se formó el taco, el cual se seccionó en porciones de 5 µm de espesor en un micrótopo (Microm GmbH HM 400 R). Las porciones montadas en un portaobjetos se rehidrataron mediante el proceso inverso, se colorearon con H y E y por último se deshidrataron nuevamente para su montaje definitivo con Bálsamo de Canadá sintético. Cada muestra se cortó aproximadamente 80 veces (equivalente a 20 cortes seriados en 4 portaobjetos). Los cortes obtenidos fueron examinados al microscopio óptico (Olympus BX 40 Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan) con un aumento de 400X, para la búsqueda de zoosporangios de *Bd*. La identificación de *Bd* en la piel se realizó siguiendo la diagnosis de Berger (1999b). Siempre que fue posible se obtuvieron muestras de mudas de piel de los individuos para ser observadas bajo microscopio óptico en busca de zoosporangios de *Bd*.

En las larvas se realizaron cortes histológicos para la detección de *Bd*. En estos casos se utilizó una sección de la región bucal que incluyó la zona queratinizada de los queratodontes (dientes) y el rostradonte (pico córneo).

Muestreo temporal por trampas de pozo (captura muerta)

Se analizó la presencia de *Bd* en muestras provenientes de una serie de muestreos realizados en el área de estudio (individuos cedidos por G. Agostini y G. Natale). El período de estudio comprendió los meses de Noviembre de 2004 a Julio de 2005, realizándose 18 muestreos quincenales. La metodología de este muestreo consistió en la utilización de trampas de caída, en las cuales se colocó 1l de solución de formaldehído al 10% (formol al 10%), medio renovado en cada muestreo. Se contabilizó el número de individuos caídos por trampa y cada uno fue determinado a nivel de especie. La trampa de caída consistió en un balde de 10 l de capacidad (enterrado con la abertura superior al ras del suelo). Las trampas fueron dispuestas en baterías constituidas por cuatro dispositivos alineados a un metro de distancia (unidad muestreal). En cada sitio se colocaron tres baterías. Se seleccionaron tres sitios: dos de ellos cercanos a charcas (A y B) y el tercero en el pastizal.

Del total de los individuos se hizo un muestreo estadístico para determinar un número de individuos representativo para realizar cortes histológicos. Este submuestreo se

realizó de la siguiente manera: Se contabilizaron los machos, hembras y juveniles capturados en el período de 1 mes, por cada especie. Se utilizó el **número mínimo** de individuos hembra de cada especie en un mes, y se seleccionó ese mismo número de individuos hembra de esa especie para todos los meses en que estaba presente. Y del mismo modo se procedió con los machos y los juveniles. A modo de ejemplo: si se contaba con 5 hembras en agosto, 10 en septiembre y 12 en octubre de la especie *Leptodactylus latrans*; se seleccionaron 5 de cada mes para extraer las muestras de piel.

El número total de individuos obtenidos fue de 51 ejemplares, pertenecientes a nueve especies: *Hypsiboas pulchellus*, *Leptodactylus gracilis*, *L. latrans*, *L. latinasus*, *Odontophrynus americanus*, *Pseudis minutus*, *Pseudopaludicola falcipes*, *Rhinella arenarum* y *R. fernandezae*.

Análisis de las muestras

A cada individuo se le extrajo una sección de piel del parche pélvico y una de la superficie ventral del muslo y se analizaron siguiendo el protocolo histológico clásico que utiliza la tinción de Hematoxilina y Eosina (H y E). Todas las muestras fueron revisadas bajo microscopio óptico (Olympus BX 40 Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan) con un aumento de 400X.

Anuros de otras regiones

Se analizaron muestras de piel provenientes de ejemplares colectados por otros herpetólogos quienes colaboraron con su material de estudio (Gabriela Agostini, Guillermo Natale, Raúl Herrera, Diego Baldo, Daiana Ferraro, Agostina Marano y Diego Barrasso; para mayores detalles ver Anexo: Tabla 1). Debido a que la mayoría de los especímenes fueron colectados por muchas personas para diferentes proyectos y objetivos, se puede observar variabilidad en el número de ejemplares pertenecientes a diferentes regiones.

Análisis de las muestras

Con los ejemplares se procedió de igual manera que con los individuos provenientes de los muestreos por transectas y trampas de pozo: a cada individuo, juvenil o adulto, se le extrajo una sección de piel del parche pélvico y una de la superficie ventral del muslo y se analizaron siguiendo el protocolo histológico clásico que utiliza la tinción de Hematoxilina y Eosina (H y E). Las larvas fueron analizadas mediante cortes histológicos del disco oral o mediante visualización directa del mismo en el microscopio óptico, mediante los siguientes pasos: disección del disco oral; disposición en portaobjetos y posterior recubrimiento con cubreobjetos y adición de una gota de agua; finalmente visualización al microscopio óptico (Fig. 2.5). Todas las muestras fueron revisadas bajo microscopio óptico (Olympus BX 40 Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan) con un aumento de 400X. Siempre que fue posible se obtuvieron muestras de mudas de piel de los individuos para ser observadas bajo microscopio óptico en busca de zoosporangios de *Bd*.

Se solicitaron los datos de temperaturas (máximas y mínimas) y datos de precipitaciones (mm de lluvia caída) mensuales durante el período de los muestreos y coincidentes con los hallazgos de *Bd* en los ejemplares.



Figura 2.5. Visualización directa del disco oral de las larvas. Disección del disco oral (A y B); disposición en portaobjetos y recubrimiento con cubreobjetos (C); Observación al microscopio óptico (D).

Aislamiento de la primera cepa de *Batrachochytrium dendrobatidis* en Argentina

El aislamiento de la cepa de *Batrachochytrium dendrobatidis* se realizó a partir de muestras de discos orales de las larvas de dos especies, *Hypsiboas cordobae* (7 individuos) y *Odontophrynus occidentalis* (3 individuos), provenientes de la reserva natural estricta “Quebarada de las Higueritas” (32° 24,218’S, 65°55,677’O), en la provincia de San Luis (estos individuos fueron gentilmente cedidos por R. Gutiérrez).

Identificación de *Bd*

Una vez en el laboratorio, los individuos fueron sacrificados mediante el uso del anestésico MS222.

La identificación de la presencia del hongo se realizó de 3 maneras:

Observación en microscopio estereoscópico: Debido a los registros de anomalías en la pigmentación de las estructuras orales de larvas infectadas con *Bd* (Vredenburg & Summers 2001), se observaron las estructuras orales (pico córneo y “dientes”) de las larvas para observar, si presentaban despigmentación.

Observación en microscopio óptico: El pico córneo y los dientes del disco oral se extrajeron de las larvas y se colocaron en fresco sobre un porta objeto con una gota de agua y usando un cubre objetos (visualización directa). Se buscaron de esta forma los zoosporangios de *Bd* en estas estructuras, usando un microscopio óptico (Olympus BX 40 Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan).

Examen histológico: Se realizaron cortes histológicos de las estructuras orales y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina. Para la identificación de *Bd* en los preparados se siguieron los procedimientos de Berger *et al.* (1999b) y Pessier *et al.* (1999).

Aislamiento de *Bd*

El aislamiento se realizó siguiendo el protocolo de Longcore *et al.* (2000) adaptado a nuestro estudio. Para el aislamiento de *Bd* se extrajeron las estructuras orales de cinco de los 10 individuos (tres *H. cordobae* y dos *O. occidentalis*). En la cámara de flujo laminar y mediante el uso de pinzas de punta fina, cada una de las piezas se limpió de 20 a 25 veces sobre medio de cultivo agarizado (16 g de Triptona, 4 g de Lactosa, 10 g Agar agar /1000 ml de agua) con antibiótico (Penicilina-G 200mg/l, Estreptomina sulfato 300 mg/l de cultivo) en cajas de Petri. Una vez libres de bacterias, se dispusieron en nuevas cajas de Petri con el mismo medio de cultivo con antibiótico. Se sellaron las cajas con parafilm®, se rotularon y se dejaron incubar en posición invertida durante 2 a 3 días en la cámara de cultivo a 23°C (temperatura óptima para el crecimiento del hongo), período durante el cual se verificó la existencia de colonias de zoosporangios y/o zoosporas de *Bd* sobre el medio. Esto se realizó a través de la observación de las cajas de Petri de manera invertida en un microscopio óptico (Olympus BX 40 Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan). Al cabo de 5 días las colonias fueron transferidas a nuevas cajas de Petri con el mismo medio de cultivo. Durante los restantes 3 días se observó el crecimiento de las colonias y finalmente se las transfirió a medio de cultivo líquido conteniendo 1% Triptona. Se dejó incubar durante 15 días a 23°C. Luego de este período los cultivos se colocaron a 4°C, donde se mantienen debiéndose repicar cada 3 meses (Longcore 2000).

Caracterización Morfométrica de MLA1

Se examinaron 3 muestras de cultivo líquido de *Bd* de la cepa MLA1 (LPSC n° 1164) y se realizaron mediciones de 50 zoosporangios por muestra (un total de 150 zoosporangios). Se registró el diámetro y el n° de tubos de descarga presentes en cada uno.

Paralelamente se examinaron 3 muestras de cultivo líquido de *Bd* de la cepa JEL 423 (aislada por la Dra. J. E. Longcore y utilizada para bioensayos propios) y se realizaron mediciones de 50 zoosporangios por muestra (un total de 150 zoosporangios). Se registraron del mismo modo, el diámetro y el número de tubos de descarga por zoosporangio.

Luego se obtuvo la media del diámetro de las 50 mediciones entre las tres muestras del cultivo de cada cepa. Se realizó una prueba de *t* de Student para comparar las medias entre las 2 cepas.

Secuenciación y genoma de la cepa Argentina de *Batrachochytrium dendrobatidis*

La cepa obtenida del aislamiento de *Bd* fue enviada al Dr. Tim James (Laboratorio de Genética Evolutiva de hongos en la Universidad de Michigan, EEUU). La **secuenciación** se realizó como parte del proyecto “Genómica evolutiva y genética de poblaciones de la enfermedad fúngica de anfibios (quitridiomycosis)” que se lleva a cabo en dicho laboratorio.

De la misma manera se realizó el análisis del **genoma completo** de la cepa, llevado a cabo por la Dra. Erica Bree Rosenblum del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Idaho (EEUU).

Bioensayos de Laboratorio

Metodología general

Colecta de individuos

Los individuos fueron colectados en charcas temporarias del área de muestreo durante la época reproductiva de la mayoría de las especies (septiembre a marzo). Para la manipulación de los ejemplares se utilizaron guantes de látex y se depositaron en bolsas de polietileno para ser transportados al laboratorio hasta su procesamiento (Fig.2.6).

Los individuos se recolectaron a campo siguiendo los protocolos de bioseguridad “Hygiene protocols for the control of disease in frogs (Haering & Wellington 2000) y aquéllos detallados en Speare *et al.* (2004) (para mayor detalle, ver ANEXO II). Todos los recipientes usados en el campo y en laboratorio se desinfectaron luego de su uso con

hipoclorito de sodio al 1% (Speare *et al.* 2004).



Figura 2.6. Muestreo a campo, búsqueda de ejemplares para bioensayos.

Eliminación de *Bd*

En laboratorio todos los individuos se sometieron a un tratamiento para la eliminación total del hongo quitridio de la piel, en caso que lo tuvieran presuntamente. Se siguió la metodología de Woodhams *et al.* (2003), exponiendo a los individuos a una temperatura ambiente de 37°C durante 2 períodos de 8 hs, más 1 hora y media adicional para los calentamientos y enfriamientos graduales (mediante el uso de dispositivos eléctricos). Luego de este proceso se sometieron a un período de aclimatación durante 5 días bajo condiciones controladas de temperatura (17°C) y fotoperiodo (8:16 hs L/O), condiciones que se consideraron óptimas para la infección de los individuos (Andre *et al.* 2008; Berger *et al.* 2004) y que continuaron durante el desarrollo de los bioensayos.

Obtención de la suspensión madre

El primer paso fue la obtención de una suspensión de zoosporas de *Bd* (suspensión

madre) a partir de la cual se pudiesen hacer diluciones. Para esto se siguió el protocolo de Rachowicz & Vredenburg (2004) adaptado a nuestros ensayos. La suspensión madre se preparó a partir de los cultivos líquidos con 1% Tryptona de *Bd* (cepa JEL 423 cedida por la Dra. Joyce E. Longcore, Maine Chytrid Laboratory) siguiendo el protocolo de Longcore *et al.* (1999). Utilizando una cámara de flujo laminar, se colocó 1 ml de cultivo líquido sobre el medio de cultivo agarizado con 1% Tryptona en cajas de Petri plásticas (inoculación). Se realizaron 3 inoculaciones en días consecutivos, utilizando siempre nuevas cajas de Petri (Fig. 2.7); se las dejó luego secar dentro de la cámara y se incubaron de manera invertida a 23°C durante 3 días. Al cabo de dicho período de tiempo, las cajas fueron bañadas con 4 ml de agua destilada para estimular la liberación de las zoosporas por los zoosporangios, se dejó reposar 1 hora y se absorbió el líquido de las cajas. De esta manera se obtuvo la suspensión madre. Paralelamente se realizó el mismo procedimiento con cajas plaqueadas con medio de cultivo pero libres de *Bd*. Se les agregó la misma cantidad de agua destilada y se absorbió luego de 1 hora; de esta manera se obtuvo la suspensión control que se utilizó en los grupos control. La concentración de zoosporas/ml de la suspensión madre se calculó utilizando una cámara de Neubauer.



Figura 2.7. Inoculación del cultivo líquido de *Bd* en cajas de Petri.

Exposición a *Bd*

Los ejemplares se colocaron individualmente en recipientes de polipropileno de 500 ml de capacidad con tapa plástica perforada. Se agregó 56 ml de agua declorinada (agua de mesa potabilizada; para detalles sobre la composición y el análisis del agua, ver Anexo II). Se los dividió en grupo Tratamiento (expuestos al hongo) y grupo Control (no expuestos al hongo). La exposición al quitridio se basó en inocular los recipientes (conteniendo los 56 ml de agua) con 4 ml de suspensión madre, con una concentración por ml de 4×10^6 zoosporas. Se obtuvo de este modo una concentración final por recipiente de 6×10^4 zoosporas/ml (Fig.2.8). Para el grupo control se colocaron los mismos mililitros de “suspensión control” sobre el agua de los recipientes¹. El “**tiempo de exposición**” fue el tiempo durante el cual se colocó suspensión madre (una vez al día) sobre el agua de los recipientes y fue de tres días. Luego de este tiempo se removió a los individuos de la exposición a *Bd*, dejándolos en agua libre del hongo, la cual se recambió día por medio durante los restantes días del bioensayo, para permitir la debida reinfección de los anuros.

La alimentación de las larvas se basó en lechuga licuada *ad libitum*, mientras que los individuos adultos no se alimentaron.

Se define REINFECCIÓN como la infección repetida del epitelio de un individuo, que se produce continuamente debido al ciclo corto y sencillo del hongo *Bd*.

¹ La concentración utilizada para las infecciones fue seleccionada de acuerdo: 1) a la cantidad de zoosporas obtenidas durante consecutivos conteos (en la cámara de Neubauer) de las suspensiones obtenidas de las cajas de Petri y 2) de acuerdo a concentraciones similares citadas por diferentes autores (Retallick & Miera 2007; Carey et al 2006) que registraron mortalidades y/o infecciones en los individuos infectados.



Figura 2.8. Exposición de los individuos a los tratamientos, durante el bioensayo. Medición del agua para cada recipiente (A); Suspensión madre (B).

Se monitorearon diariamente los individuos y se recolectaron mudas de piel de los recipientes de los grupos tratamiento y control, las cuales fueron fijadas en formol 10%, para ser examinadas al microscopio óptico. Teniendo en cuenta los cambios comportamentales registrados en algunos individuos infectados con *Bd* (aletargamiento, inapetencia etc.; Berger *et al.* 2005b) se registraron los cambios en el comportamiento de los individuos de los grupos tratamiento.

Los bioensayos se dieron por finalizados cuando se registraron mortalidades significativas en el grupo control. A partir de allí, los individuos se sacrificaron con el uso del anestésico MS222 (Tricaine methanesulfonate). Luego de 10 minutos luego del cese de la respiración, se extrajeron trozos de piel del vientre, de los muslos y de los metatarsos para ser analizados mediante histología básica que utiliza la tinción de Hematoxilina y Eosina. Los individuos fueron fijados en formol 10%, y luego de 2 días fueron traspasados a alcohol 70% para su conservación.

El diagnóstico de la presencia de *Bd* en las pieles se hizo siguiendo la metodología de Berger *et al.* (1999b), buscando zoosporangios en sus distintos grados de desarrollo en el epitelio córneo y granuloso del hospedante.

Se definieron a priori dos conceptos para la evaluación de los resultados de los bioensayos (Blaustein *et al.* 2005):

- SUSCEPTIBILIDAD, como la capacidad de las especies de anuros analizadas de infectarse con el hongo *Bd* en bioensayos de laboratorio.
- SENSIBILIDAD, como el tiempo de supervivencia de las distintas especies analizadas a la infección por el hongo *Bd*.

Todos los bioensayos se realizaron siguiendo los protocolos de bioseguridad para trabajar con *Bd* (Johnson 2003). Todas las superficies (mesadas y cámara de flujo laminar) fueron desinfectadas con alcohol 70% o lavandina 1 % antes y después de manipular el hongo. Los residuos líquidos fueron tratados añadiéndoles un volumen de lavandina que según el volumen a descartar asegurara una concentración final de por lo menos 2% de hipoclorito de sodio. Los residuos sólidos (cajas de Petri, pipetas, vasos de precipitado) fueron autoclavados en bolsas para autoclave.

El número de repiques *in vitro* de la cepa utilizada en los diferentes ensayos varió entre 0 y 4 repiques.

Bioensayos

Cálculo de la concentración infectiva de zoosporas/ml y tiempo de exposición

Dado que este bioensayo tuvo como objetivo encontrar la concentración de zoosporas/ml y tiempo de exposición al hongo *Bd* que resultasen efectivos en los subsiguientes bioensayos, fue el único en el que se usaron 3 concentraciones y 3 tiempos de exposición. Para realizar este bioensayo se utilizaron 60 individuos adultos de *Rhinella fernandezae* (Fig. 2.9) dispuestos en recipientes de vidrio con tapa de tela red. El experimento se llevó a cabo con un diseño de 3x3 factorial, donde un factor fue la concentración de zoosporas por ml de suspensión final (60, 6×10^2 y 6×10^4 zoosporas/ml) y el otro el tiempo de exposición al quitridio (1 hora, 1 día y 3 días) resultando en 9 grupos experimentales con 1 individuo cada uno, con 5 réplicas y tres grupos control (cada uno con

5 réplicas), un total de 45 individuos en el grupo tratamiento y 15 en el grupo control.

Los individuos fueron sometidos a las distintas concentraciones durante los tiempos preestablecidos. Dado que este ensayo fue planteado como la base para la realización del resto de los bioensayos (encontrando la concentración de zoosp./ml y el tiempo de exposición), el ensayo fue de larga duración. Por este motivo y debido a que se trataba de una sola especie, los individuos fueron alimentados cada cuatro días con gusanos tenebrios (*Tenebrio molitor*), criados en el laboratorio. El experimento terminó a los 42 días.

Se examinó la distribución de las mudas infectadas en las réplicas de los tratamientos y se analizaron las diferencias significativas mediante el Análisis de la Varianza (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95%.



Figura 2.9. Bioensayo de laboratorio con *R. fernandezae*.

El ensayo se realizó con *R. fernandezae* ya que esta es una especie con una distribución amplia desde el norte de Paraguay hasta el norte de la provincia de Buenos Aires (Gallardo 1957), y por tanto representativa de la región. Además resultó una especie fácil de mantener en cautiverio.

Estudio de la sensibilidad de las distintas especies

Bioensayo con adultos

Bioensayo 1

Para este bioensayo se recolectaron seis adultos de *Rhinella fernandezae*, *Hypsiboas pulchellus*, *Odontophrynus americanus*, *Pseudopaludicola falcipes*, *Scinax squalirostris* y *Leptodactylus latinasus* (Fig. 2.10). Los seis adultos de cada especie se dividieron en grupo tratamiento y control.



Figura 2.10. Individuos de *R. fernandezae* y *O. americanus* en sus recipientes durante la realización del bioensayo.

Teniendo en cuenta que los individuos *H. pulchellus* y *S. squalirostris* tienen la capacidad de trepar por las superficies verticales, se les colocó por encima del individuo (y entre este y el recipiente que los contenía) un envase perforado en la base para evitar que ascendieran por las paredes y así asegurar el contacto con la suspensión (Fig. 2.11), ambos recipientes se mantuvieron adheridos mediante la colocación de una goma elástica entre estos.

A pesar de que las especies de este bioensayo fueron infectadas con *Bd* en el mismo momento y bajo las mismas condiciones de laboratorio, cada una se identificó como un tratamiento diferente.



Figura 2.11. Esquema del envase utilizado con *S. squalirostris* e *H. pulchellus* durante el bioensayo.

Se analizó la supervivencia de cada especie a través del Análisis de Supervivencia de Kaplan Meier (XLSTAT, versión 2012.5.01, copyright Addinsoft) para identificar la existencia de diferencias significativas entre el grupo tratamiento y el control de cada especie. También se analizó la supervivencia entre las distintas especies de los grupos tratamiento mediante el mismo test estadístico.

Bioensayo 2

Se dispusieron 20 individuos de las especies *Hypsiboas pulchellus*, *Pseudis minutus* y *Leptodactylus latrans*, 10 individuos para cada grupo (tratamiento y control). Con los individuos de *H. pulchellus* se procedió colocándoles por encima de los individuos (y entre estos y el recipiente que los contenía) un envase perforado en la base (para asegurar el contacto con el agua; ver Fig.2, Bioensayo 1). Cada especie fue considerada como un bioensayo individual.

Los datos de supervivencia de cada especie fueron analizados mediante el Análisis de supervivencia de Kaplan Meier. Se realizó posteriormente un Análisis de la Varianza (ANOVA) para examinar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos

de las diferentes especies y se utilizó en este mismo análisis un test a posteriori (test de Tukey) para identificar entre que especies existían diferencias

Bioensayo con larvas

Bioensayo 3

Se utilizaron 22 individuos de las especies *Hypsiboas pulchellus*, *Pseudopaludicola falcipes*, *Scinax squalirostris*, *Rhinella arenarum* y *Leptodactylus latrans* repartidos en los grupos tratamiento (11 individuos) y control (11 individuos). Los datos de supervivencia entre los dos grupos fueron analizados mediante el análisis de supervivencia de Kaplan Meier. Finalmente se realizó un Análisis de la Varianza (ANOVA) para examinar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos de las diferentes especies y se utilizó en este mismo análisis un test a posteriori (test de Tukey) para identificar entre que especies existían diferencias.

Bioensayo 4

Para este bioensayo fueron utilizadas 60 larvas de la especie *Physalaemus fernandezae* provenientes de dos sitios diferentes: La Balandra (34°57'56.35"S-57°45'29.90"O), (grupos Ph y PhE) y Pinamar (grupo PhA) (37° 6'54.50"S- 56°57'48.75"O) cada una con 20 ejemplares, que a su vez se repartieron en grupos tratamiento (10 individuos) y control (10 individuos).

Debido a que durante el transcurso de la tesis se obtuvo el aislamiento de la primera cepa de Argentina, las larvas del grupo PhE fueron inoculadas con la cepa del hongo JEL 423 (utilizada en los anteriores bioensayos) mientras que las de los grupos Ph y PhA fueron inoculadas con MLA1 (cepa autóctona).

Se analizó la supervivencia entre grupo tratamiento y control de cada bioensayo utilizando el análisis de Kaplan Meier.

Así mismo se realizó la comparación de la supervivencia entre los grupos tratamiento de los tres bioensayos mediante el mismo análisis (análisis de Kaplan Meier)

para identificar si existían diferencias significativas entre los grupos tratamientos evaluados (los individuos utilizados en este ensayo fueron gentileza de Diego Barrasso).

Incidencia topográfica de Batrachochytrium dendrobatidis en distintos parches ventrales de L. latrans

Para evaluar la incidencia topográfica de Bd en las distintas partes del cuerpo, se eligieron al azar dos ejemplares de la especie *L. latrans* (L7 y L10, tomadas del bioensayo 2). De cada individuo se tomaron 10 parches de piel, de aproximadamente 10 x 7 mm, repartidos en la parte ventral del cuerpo (Fig. 2.12) los cuales se procesaron mediante histología básica (la metodología utilizada fue expuesta en la sección “Análisis de las muestras de la pagina 32). Se analizaron aproximadamente 120 cortes de piel de 7 mm de ancho y 5 µm de espesor para cada parche examinado. Por lo tanto se examinaron un total de 1200 cortes de piel por individuo. La **incidencia de Bd** en *L. latrans* fue medido por puntos de infección en las pieles analizadas. Se define **Punto de infección** a un zoosporangio o conjunto de zoosporangios que aparecen en los distintos cortes de piel analizados.

Se realizó entonces la comparación, mediante la prueba de Kruskal Wallis (comparación de k muestras independientes) con un nivel de significación de 0,05, de los puntos de infección en los distintos parches de piel. También se analizó la existencia de diferencias significativas entre los dos individuos analizados mediante la prueba de Mann-Whitney (comparación de 2 muestras independientes).

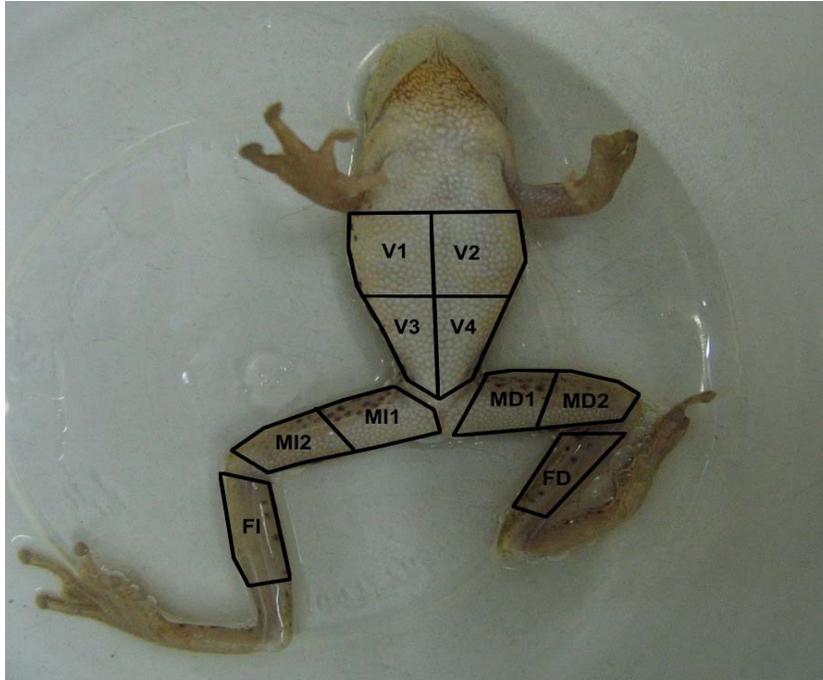


Figura 2.12. Esquema de cortes en la parte ventral de los individuos. V: vientre; MI: muslo izquierdo; MD: muslo derecho; FI: fíbula izquierda; FD: fíbula derecha.

3. Resultados

Análisis de la presencia de *Bd* en anuros

Anuros del Área de estudio

Muestreo por transectas y trampas de de pozo (captura viva)

Durante los muestreos por transectas y trampas de caída por captura viva en el área de estudio se recogieron en total 13 individuos (6 de ellos colectados en el año 2002, gentileza G. Natale), pertenecientes a 5 especies. Todos los individuos fueron analizados mediante la realización de cortes histológicos (ver detalles en “Análisis de las muestras”) registrándose la presencia de *Bd* en 4 individuos (31%), 3 adultos y una larva, pertenecientes a las especies *Pseudis minutus*, *Hypsiboas pulchellus* y *Leptodactylus latrans* (Tabla 3.1; Fig. 3.1).

Tabla 3.1. Ejemplares de anfibios analizados en el área de muestreo para la presencia de *Bd*. Est: estado; A: adulto; L: larva; AM: área de muestreo; MT: muestreo por transectas; TP: trampas de caída; C. Hist: corte histológico; Inf: infección; n° ind: número de individuo (para mayor información y detalle ver Anexo I, Tabla 1).

Especies	Est.	Fecha	Lugar	Estado	Muestreo	<i>Bd</i>	Técnica	Inf.	n° ind.
<i>Hypsiboas pulchellus</i>	A	26/08/2002	AM charca B	vivo	MT	-	C Hist.	—	303
<i>Pseudis minutus</i>	A	26/08/2002	AM charca B	vivo	MT	+	C Hist.	leve	304
<i>Scinax squalirrostris</i>	A	26/08/2002	AM charca B	vivo	MT	-	C Hist.	—	305
<i>Hypsiboas pulchellus</i>	L	22/10/2002	AM charca O	vivo	MT	+	C Hist.	grave	306
<i>Pseudis minutus</i>	L	04/11/2002	AM charca B	vivo	MT	-	C Hist.	—	307
<i>Pseudis minutus</i>	L	04/11/2002	AM charca B	vivo	MT	-	C Hist.	—	308
<i>Pseudis minutus</i>	A	15/10/2006	AM charca B	vivo	MT	-	C Hist.	—	170
<i>Pseudis minutus</i>	A	15/10/2006	AM charca B	vivo	MT	-	C Hist.	—	171
<i>Pseudis minutus</i>	A	15/10/2006	AM charca B	vivo	MT	-	C Hist.	—	172
<i>Leptodactylus latrans</i>	J	26/06/2007	AM Pastizal	vivo	TP	+	C Hist.	leve	197
<i>Leptodactylus latrans</i>	J	04/07/2007	AM Pastizal	muerto	TP	-	C Hist.	—	198
<i>Leptodactylus latrans</i>	J	04/07/2007	AM Pastizal	muerto	TP	-	C Hist.	—	199
<i>Leptodactylus latrans</i>	A	11/07/2007	AM Pastizal	muerto	TP	+	C Hist.	mod.	200

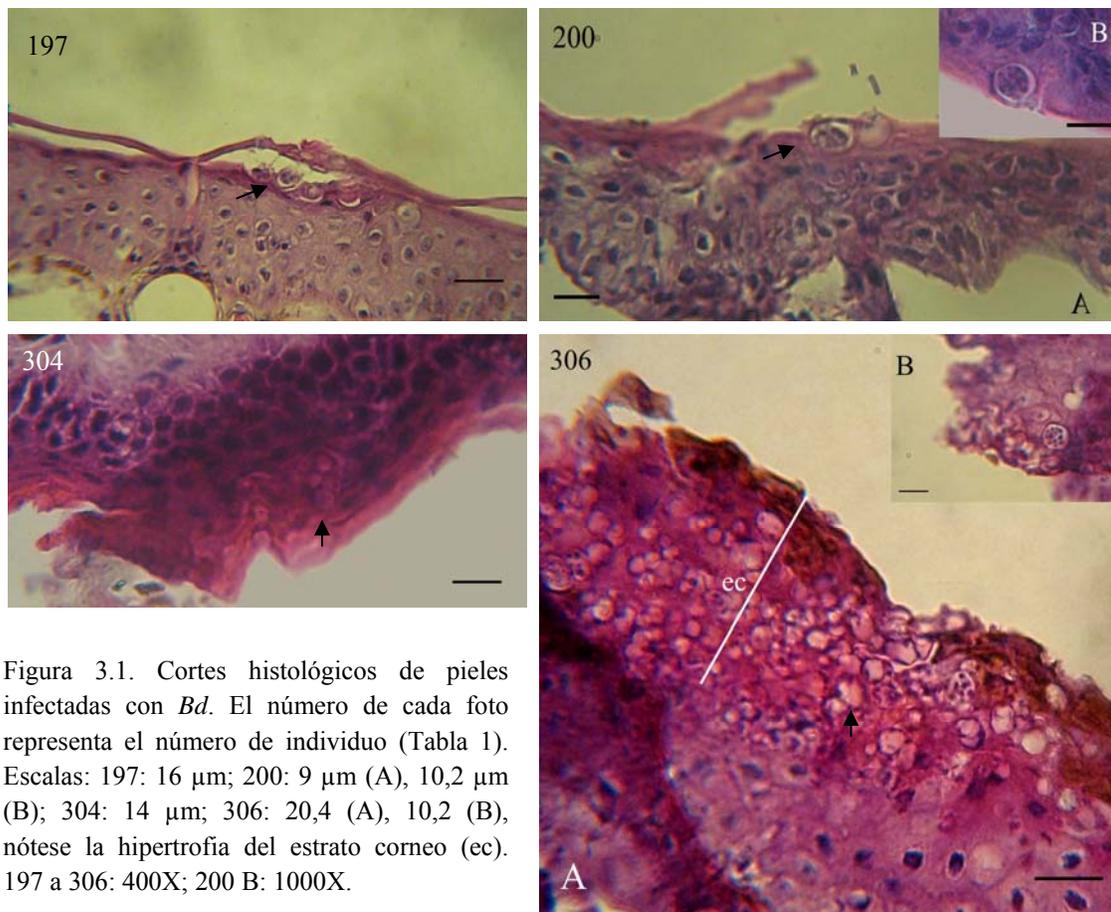


Figura 3.1. Cortes histológicos de pieles infectadas con *Bd*. El número de cada foto representa el número de individuo (Tabla 1). Escalas: 197: 16 μm ; 200: 9 μm (A), 10,2 μm (B); 304: 14 μm ; 306: 20,4 (A), 10,2 (B), nótese la hipertrofia del estrato corneo (ec). 197 a 306: 400X; 200 B: 1000X.

Los datos de las temperaturas máximas y mínimas y mm de precipitación diarios coincidentes con los registros de *Bd* en los individuos figuran en el Anexo I, Tabla 3.

Entre Agosto y Noviembre de 2002 se colectaron 6 individuos, 3 larvas y 3 adultos, pertenecientes a las especies *H. pulchellus*, *P. minutus* y *S. squalirrostris*. El análisis de los ejemplares evidenció la presencia de *Bd* en un individuo adulto de *P. minutus* (individuo n° 304) y una larva de *H. pulchellus* (ind. n° 306). Los individuos fueron hallados durante un muestreo por transectas y se encontraron vivos en las márgenes de la charca B y en el interior de la charca 0 respectivamente. Cabe destacar que mientras *P. minutus* fue encontrada en el mes de Agosto con una infección leve en la charca B, *H. pulchellus* fue hallada 2 meses más tarde con una infección grave en una charca que se encuentra a solamente 300 metros de la anterior.

Posteriormente en los muestreos por transectas realizados entre Marzo y Octubre de 2006 y 2007, se colectaron solo 3 individuos pertenecientes a la especie *P. minutus* en las márgenes de la charca B en Octubre de 2006. Los restantes 4 individuos, pertenecientes a la especie *L. latrans*, fueron capturados mediante trampas de pozo, en los meses de junio de 2006 y julio de 2007. Se evidenciaron zoosporangios de *Bd* en 2 individuos de *L. latrans*. Uno de ellos (ind. n° 197) se encontró vivo en la batería de trampas situadas en las márgenes de la charca A (en el pastizal del área de muestreo) y presentó una infección leve, mientras que el otro (ind. n° 200) se halló muerto en las trampas situadas en el pastizal con una infección moderada.

Muestreo temporal por trampas de pozo (captura muerta)

De los individuos que fueron recolectados durante el muestreo, se extrajeron un total de 2 muestras de piel por individuo, una del vientre y una del muslo. Mediante cortes histológicos, de cada muestra se obtuvieron 4 portaobjetos y en cada uno se dispusieron un promedio de 30 cortes de piel (cortes seriados), lo que resultó en aproximadamente 240 muestras de piel por individuo. Todos los individuos suman un total de 12240 muestras de piel analizadas.

De los 51 ejemplares analizados solo 1 resultó positivo para *Bd* en una muestra de muslo con solo 2 zoosporangios en 2 muestras de piel diferentes (Tabla 3.2; Fig. 3.2), presentando una infección leve. El ejemplar fue colectado el día 19 de Abril del año 2005.

Tabla 3.2. Individuos pertenecientes al muestreo temporal (trampas de pozo, captura muerta) analizados para el registro de la presencia de *Bd*. MRF: *Rhinella fernandezae*; MLG: *Leptodactylus gracilis*; MPF: *Pseudopaludicola falcipes*; MLL: *L. latrans*; MRA: *R. arenarum*; MHP: *Hypsiboas pulchellus*; MLLt: *L. latinasus*; MPM: *Pseudis minutus*; MOA: *Odontophrynus americanus*.

Ejemplar	Fecha	<i>Bd</i>	Ejemplar	Fecha	<i>Bd</i>	Ejemplar	Fecha	<i>Bd</i>
MRF 1	15/11/2004	-	MPF 3	14/01/2005	-	MLG 20	05/04/2005	-
MLG 0	15/11/2004	-	MPF 4	14/01/2005	-	MLLt 1	19/04/2005	-
MLG 1	06/12/2004	-	MLL 2	01/02/2005	-	MLL 5	19/04/2005	+
MPF 1	06/12/2004	-	MRF 5	01/02/2005	-	MLL 6	19/04/2005	-
MRF 3	20/12/2004	-	MRA 1	06/02/2005	-	MRF 22	19/04/2005	-
MLG 2	20/12/2004	-	MRF 9	23/02/2005	-	MLG 18	22/05/2005	-
MLG 3	20/12/2004	-	MRF 11	23/02/2005	-	MLL 8	22/05/2005	-
MLG 4	20/12/2004	-	MRF 15	23/02/2005	-	MLL 9	22/05/2005	-
MLG 5	20/12/2004	-	MHP 4	23/02/2005	-	MRF 23	22/05/2005	-
MLG 6	20/12/2004	-	MPF 5	23/02/2005	-	MLL 10	22/05/2005	-
MLL 1	20/12/2004	-	MLG 22	23/02/2005	-	MHP 1	18/06/2005	-
MPF 2	20/12/2004	-	MRF 17	17/03/2005	-	MLL 11	18/06/2005	-
MLG 7	14/01/2005	-	MRF 18	17/03/2005	-	MRF 24	08/07/2005	-
MLG 8	14/01/2005	-	MLL 3	17/03/2005	-	MHP 2	08/07/2005	-
MLG 9	14/01/2005	-	MLL 4	17/03/2005	-	MPM 1	08/07/2005	-
MLG 10	14/01/2005	-	MRF 20	05/04/2005	-	MHP 3	22/07/2005	-
MLG 21	14/01/2005	-	MLL 12	05/04/2005	-	MOA 1	22/07/2005	-



Figura 3.2. Zoosporangio de *Bd* maduro (flecha) en la piel de un individuo de *L. latrans* (individuo MLL 5). Escala: 9 μ m.

Anuros de otras regiones

En los ejemplares analizados pertenecientes a otras regiones se analizaron un total de 18 individuos pertenecientes a 8 especies. Todos los individuos, adultos, juveniles o larvas, fueron analizados mediante la realización de cortes histológicos, el examen de mudas de piel o visualización directa al microscopio óptico del disco oral (ver detalles en “Análisis de las muestras”). Se registró la presencia de *Bd* en 10 individuos (62%), 8 adultos, un juvenil y una larva, pertenecientes a las especies *Elachistocleis bicolor*, *Hypsiboas aff. riojanus*, *Rhinella sp.* y *Leptodactylus latrans*. (Tabla 3.3; Fig. 3.3 y 3.4).

Tabla 3.3. Ejemplares de anuros de distintas regiones analizados para la presencia de *Bd*. A: adulto; J: juvenil; L: larva; RNI: Reserva Natural Integral; Po: Posadas; Ens: Ensenada; Ca. I. Santiago: camino a la Isla Santiago; S. M.: San Martín; al/d.epi: aletargado con descamación del epitelio; C. Hist: corte histológico; M: muda; Mic: visualización directa al M. óptico; mod: moderada (para mayor información y detalle ver Anexo I, Tabla 2).

Especies	Est.	Fecha	Lugar	Localidad	Estado	<i>Bd</i>	Técnica	Inf.	n° ind.
<i>Elachistocleis bicolor</i>	A	26/11/2005	RN12-Posadas	Po.Misiones	muerto	+	C Hist.	grave	169
<i>Telmatobius marmoratus</i>	A	06/01/2006	Sta.Catalina	Jujuy	muerto	-	C Hist.	—	166
<i>Hypsiboas aff. riojanus</i>	J	06/01/2006	Sta.Catalina	Jujuy	muerto	-	C Hist.	—	167
<i>Hypsiboas aff.riojanus</i>	J	07/01/2006	Sta.Catalina	Jujuy	muerto	+	C Hist.	leve	168
<i>Leptodactylus latrans</i>	A	12/05/2006	RNI.Punta Lara	Ens.BsAs.	al/d.epi	+	C Hist.	mod.	161
<i>Leptodactylus latrans</i>	A	12/05/2006	Ca. I.Santiago	Ens.BsAs.	al/d.epi	+	C Hist.	mod.	162
<i>Pseudopaludicola falcipes</i>	A	15/10/2006	Frente al AM	LP.BsAs.	vivo	-	C Hist.	—	173
<i>Hypsiboas pulchellus</i>	A	02/03/2007	Charca Frizon	LP.BsAs.	vivo	-	C Hist.	—	174
<i>Rhinella fernandezae</i>	A	30/09/2007	Los Hornos	LP. BsAs	muerto	-	C Hist.	—	201
<i>Scinax fuscovarius</i>	A	15/10/2007	RN12,Km 1329	Po.Misiones	muerto	-	C Hist.	—	203
<i>Melanophryniscus atroluteus</i>	A	16/10/2007	RN12,Km 1330	Po.Misiones	muerto	-	C Hist.	—	202
<i>Physalaemus sp.</i>	L	13/12/09	Campo Cauzuti	S. M. Salta	vivo	-	Mic.	Mod.	321
<i>Rhinella sp.</i>	L	13/12/09	Río Caraparí	S. M. Salta	vivo	+	Mic.	Mod.	322
<i>Leptodactylus latrans</i>	A	28/05/2010	La Balandra	Beriso.BsAs.	al/d.epi	+	C Hist y M	grave	309
<i>Leptodactylus latrans</i>	A	28/05/2010	RNI.Punta Lara	Ens.BsAs.	al/d.epi	+	C Hist./M	—	312
<i>Leptodactylus latrans</i>	A	08/07/2010	RNI.Punta Lara	Ens.BsAs.	al/d.epi	+	C Hist./M	—	310
<i>Leptodactylus latrans</i>	A	08/07/2010	RNI.Punta Lara	Ens.BsAs.	al/d.epi	+	C Hist./M	—	311
<i>Leptodactylus latrans</i>	A	15/07/2010	Arturo seguí	LP.BsAs.	al/d.epi	+	C Hist y M	mod.	313

En la provincia de Misiones analizamos un individuo de *Elachistocleis bicolor* proveniente de la ciudad de Posadas (Arellano *et al.* 2009) con infección positiva para *Bd*. El individuo fue encontrado muerto en la margen de una zanja temporaria originada en el lateral de la Ruta Nacional N° 12 (Fig. 3.3, 169). De esta misma provincia se analizaron un individuo de la especie *Scinax fuscovarius*, y de la especie *Melanophryniscus atroluteus*, ambos encontrados muertos en el Km 1129 y 1130 a orillas de la Ruta Nacional N° 12. Los dos individuos presentaron desprendimiento del estrato epidérmico durante la preparación del material histológico (por lo que no se pudo comprobar la presencia de *Bd*).

En la Provincia de Jujuy se analizaron tres individuos, todos provenientes de la localidad de Santa Catalina. Se examinó un individuo de la especie *Telmatobius marmoratus*, que resultó negativo para la infección por *Bd* y dos individuos de *Hypsiboas aff. riojanus* de los cuales uno mostró evidencias de *Bd* en los cortes (Fig. 3.3, 168).

De la Provincia de Salta se analizaron 2 especies de larvas, *Physalaemus* sp. y *Rhinella* sp. de las cuales solo esta última registró zoosporangios de *Bd* en las estructuras corneas del disco oral, exhibiendo una infección moderada por parte del hongo quitridio (Fig. 3.4, 322). Ambas especies fueron encontradas vivas, *Physalaemus* sp., fue hallada en un zanjón de agua incluido en las serranías de Tratagal ubicadas en la Localidad de Campo Cauzuti, en el Departamento de San Martín, Provincia de Salta., mientras que *Rhinella* sp. se encontraba en la margen del Río Caraparí, ubicado en la misma serranías.

Finalmente en la Provincia de Buenos Aires se examinaron siete individuos de *Leptodactylus latrans*, todos con evidencias positivas de *Bd*. Cuatro de ellas fueron halladas en la Reserva Natural Integral Punta Lara, en las márgenes de una la ex ruta provincial 19 denominada “Camino Negro”. La infección por *Bd* se determinó en tres de ellos mediante el examen directo de mudas de piel al microscopio óptico (Fig. 3.4, 310-312), en los cuales no se pudo determinar el grado de infección (ver detalle “Análisis de las muestras”). En el otro ejemplar se realizaron cortes histológicos y se pudo determinar un grado de infección moderado (Fig. 3.3, 161). Otro de los individuos proviene de un lugar muy cercano y separado nada más que por 9 km del lugar de los hallazgos de los ejemplares de la Reserva (Arellano *et al.* 2009). Fue hallado en el camino de acceso a la Isla Santiago (Fig. 3.3, 162). Por otro lado en el camino de acceso al Balneario La Balandra, se halló un ejemplar (Fig. 3.3, 309) de esta misma especie a orillas de la calzada. Por último, otro ejemplar de *L.*

latrans fue hallado en la localidad de Arturo Seguí, sobre una calle barrial lindante con un descampado.

Todos estos individuos se encontraron moribundos, con una lenta reacción ante los estímulos y en todos los casos presentaron abundante descamación del epitelio (muda excesiva).

A excepción del ejemplar n° 309 proveniente de La Balandra (Fig. 3.3, 309) que presentó un grado de infección grave, el resto de las infecciones se determinaron como moderadas (Fig. 3.3, 161y 162; Fig. 3.4, 310-313).

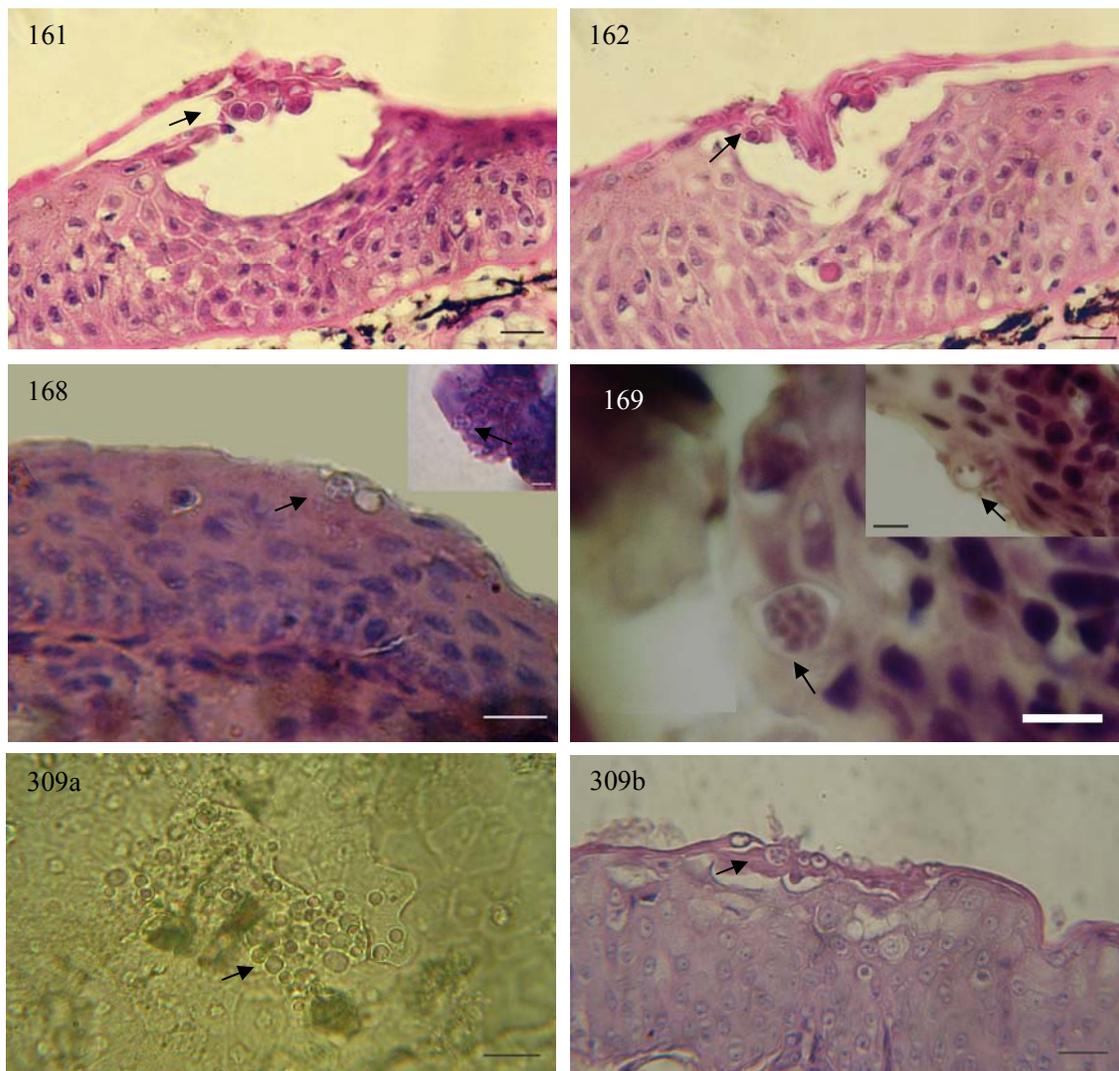


Figura 3.3. Cortes histológicos y mudas de piel infectadas con *Bd*. El número de cada foto representa el número de individuo (Tabla 3). Pueden observarse zoosporangios (flechas) vacíos o con zoosporas. Escalas: 161: 14µm; 162: 15 µm; 168: (A) 14 µm, (B) 16 µm; 169: (A y B) 10,20 µm; 309: 20,4 µm, a: muda, b: corte histológico; 161-309: 400X; 169 (A y B): 1000X.

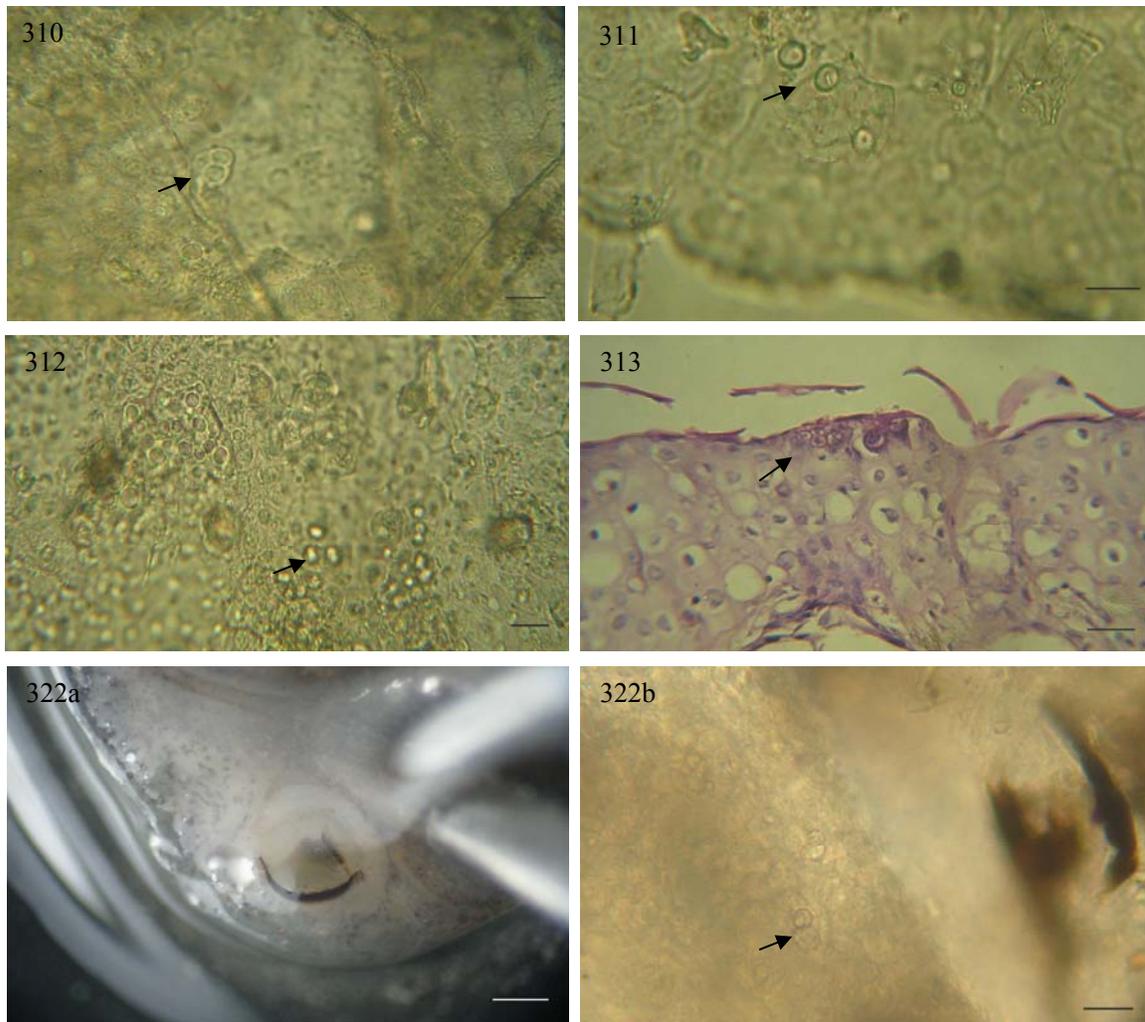


Figura 3.4. Cortes histológicos y mudas de piel infectadas con *Bd*. El número de cada foto representa el número de individuo (Tabla 3). Pueden observarse zoosporangios (flechas) vacíos o con zoosporas. Escalas: 310 y 311: 12 μm ; 312 y 313: 18 μm ; 322: (a) 2,5mm, disco oral observación en la lupa, (b) 20 μm , disco oral en microscopio óptico. 310-322: 400X.

Análisis de las muestras

Examen histológico

Juveniles y Adultos

Los resultados positivos para *Bd* de las muestras de piel mostraron evidencias significativas de infección fúngica. Se identificaron zoosporangios, ovoides y esféricos,

vacíos o con zoosporas en su interior, en el estrato córneo de la epidermis. Los zoosporangios presentaron un rango de diámetro 5,11 a 10,22 μm y muchos de éstos mostraron un tubo de descarga por el cual se liberan las zoosporas. Las áreas infectadas incluyeron una hiperqueratosis media a moderada y áreas de erosión focal adyacente a la infección. Estas observaciones concuerdan con la descripción de *Bd* presentada por Berger *et al.* (1999b).

El examen histológico permitió realizar una estimación del **grado de infección** de los individuos. Se definieron 3 categorías de infección según la cantidad zoosporangios encontrados en las pieles revisadas:

Infección leve: de 1 a 20 zoosporangios; *moderada*: 20 a 50 y *grave*: más de 50 zoosporangios en el total de las pieles revisadas.

En muchas ocasiones los individuos que se encontraron moribundos, presentaron signos **característicos de la enfermedad** como aletargamiento (al.) y descamación excesiva del epitelio (d.epi).

Larvas

El análisis histológico de las estructuras orales de las larvas resultó positivo para dos individuos de los analizados (ind. n°306 y 322). En los cortes del individuo 306, pudieron distinguirse zoosporangios muy definidos en todos los estados de maduración, algunos con zoosporas en su interior y otros vacíos, y muchos con sus tubos de descarga. Se pudo observar también la presencia de cantidades significativas de linfocitos tanto en el tejido conjuntivo (subyacente al epitelio), como infiltraciones de éstos hacia el epitelio.

La identificación de zoosporangios en el ejemplar 322 se realizó mediante la visualización directa de las estructuras del disco oral al microscopio óptico. En el rostródonte del disco oral pudo observarse una evidente decoloración de la mitad izquierda de la “mandíbula” inferior (Fig. 3.3, 322a) durante el examen en microscopio estereoscópico (lupa). Durante el examen en el microscopio óptico, se observaron zoosporangios bien definidos pero representando una infección leve (Fig. 3.3, 322b).

Examen de las mudas de piel

Las mudas de piel analizadas (ind. n° 309 a 313) infectadas con *Bd* se diferenciaron de las mudas de piel sanas, por la presencia de 1 o más zoosporangios que interrumpieron el patrón de mosaico de las células epiteliales escamosas (Fig. 3.3, 309-313). El tamaño de los zoosporangios varió entre 5,20 y 7,60 μm . con un tamaño máximo de 10,20 μm . La mayoría de los zoosporangios se encontraron vacíos y podían reconocerse solos o formando colonias. Muchas veces el centro de las colonias carecía de zoosporangios (los cuales ya habían sido descamados) pero conservaban el tejido hiperqueratósico causado por la infección (Fig. 3.3, 312).

El grado de infección no se pudo analizar en estas muestras puesto que provenían de distintas partes del cuerpo y presentaban distintos tamaños.

En algunos individuos solo pudo identificarse la infección por medio del análisis de las mudas de piel (y no por cortes histológicos).

Aislamiento de la primera cepa de *Batrachochytrium dendrobatidis* en Argentina

Identificación de *Bd*

Observación en microscopio estereoscópico

Se identificaron anomalías de las estructuras orales queratinizadas en 5 de los 10 (50%) individuos analizados (4 *H. cordobae* y 1 *O. occidentalis*). Las anomalías incluyeron falta de pigmentación en mandíbulas superior e inferior, erosión del borde y pérdida del aserrado, y algunas veces pérdida de algún queratodonte (Fig. 3.5).

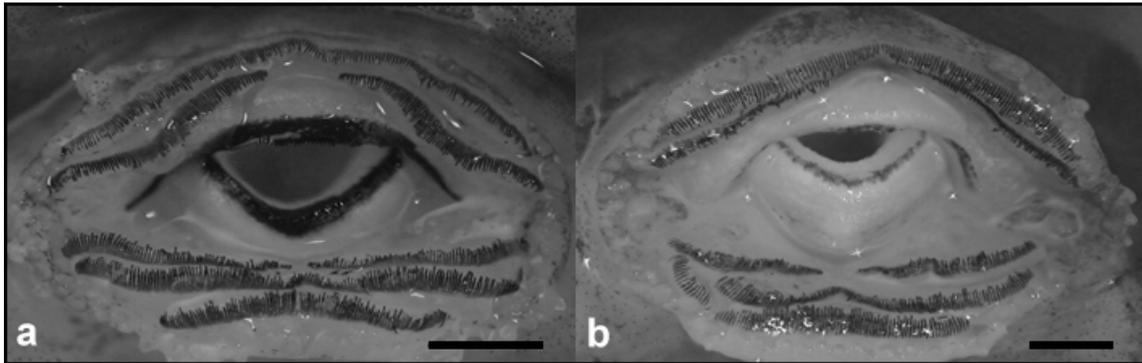


Figura.3.5. Partes bucales queratinizadas de un individuo no infectado (a) y uno infectado con despigmentación (b). Escala: (a) 0, 42 mm; (b) 0, 46 mm. Foto María Luz Arellano.

Observación en microscopio óptico

Las muestras que se observaron en fresco al microscopio mostraron gran cantidad de zoosporangios (tanto vacíos como con gran cantidad de zoosporas en su interior) en todas las regiones queratinizadas (pico córneo y dientes), conllevando a una visible despigmentación que comenzó por los bordes del rostradonte (pico córneo) (Fig. 3.6).

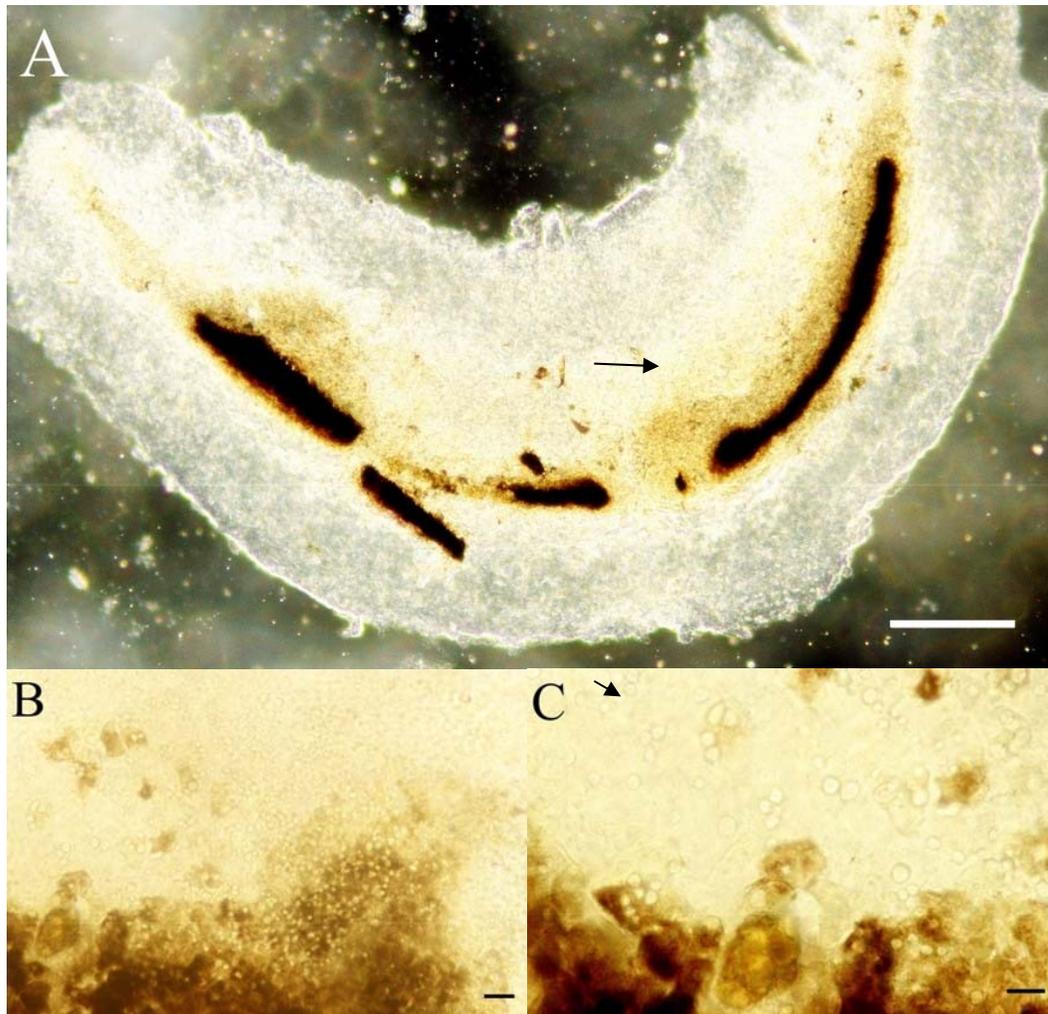


Figura 3.6. Rostrodonte examinado sobre porta objeto. Nótese los bordes de coloración más tenue (flecha) en A. 100X. Zoosporangios (flecha) entre las células del estrato córneo (B, 200X y C, 400X). Foto María Luz Arellano. Escalas: A: 0,25 mm; B: 50 μ m; C: 20 μ m.

Examen histológico

El análisis histológico mostró evidencias de *Bd* para 7 de las 10 (70%) larvas analizadas (5 *H. cordobae* y 2 *O. occidentalis*). En las estructuras orales queratinizadas se identificaron zoosporangios esféricos y ovoides, vacíos o conteniendo zoosporas. Los zoosporangios presentaron un diámetro de entre 5 y 12 μ m (Fig. 3.7), y en algunos pudo visualizarse el tubo de descarga. También pudo observarse una hiperqueratosis evidente del estrato corneo, capas de la epidermis distorsionadas y erosiones focales en la piel con

desprendimientos de capas del estrato córneo (resultados publicados en Gutierrez *et al.* 2010).

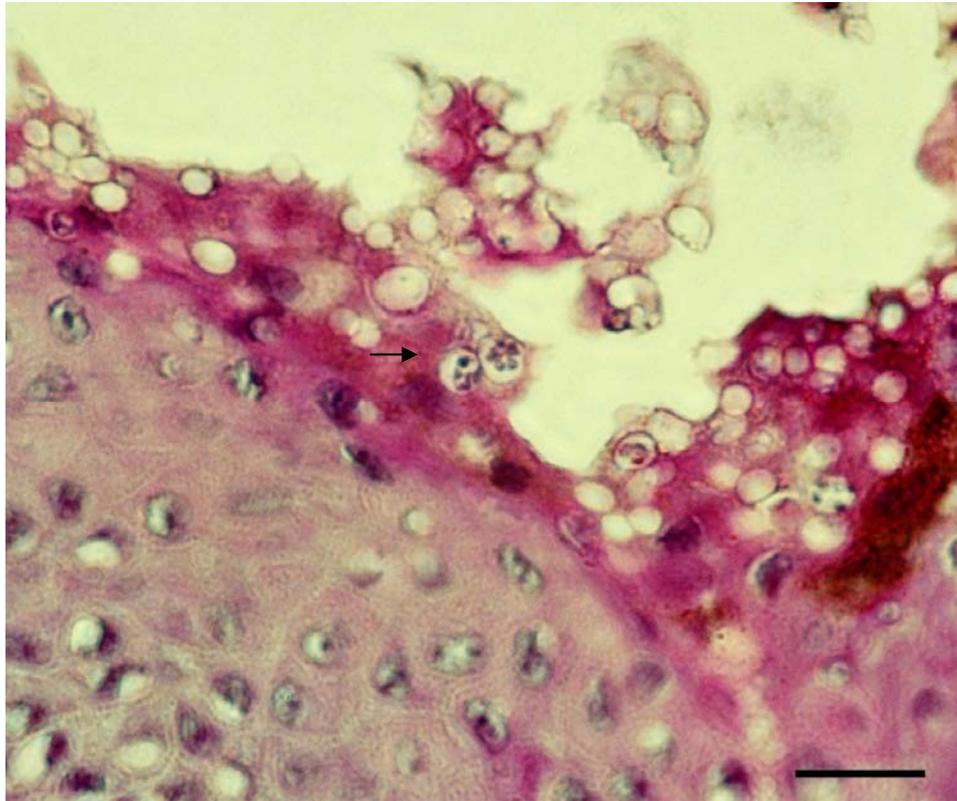


Figura 3.7. Corte de las partes bucales infectadas de las larvas mostrando zoosporangios (flecha) vacíos y con zoosporas. Escala: 30 μ m. Foto María Luz Arellano.

Aislamiento de *Bd*

Las placas de Petri (con las estructuras orales de las larvas) se examinaron luego de 2 días de incubación en la cámara de cultivo a 23°C y se examinaron de manera invertida en un microscopio óptico. En ese momento pudieron observarse zoosporas nadando sobre el medio de cultivo alrededor de las muestras y se visualizaron zoosporangios sobre el borde de las estructuras queratinizadas (Fig. 3.8 A y B).

Tres días más tarde pudieron reconocerse **colonias** de zoosporangios que surgían de las muestras y se extendían horizontalmente por el medio de cultivo (Fig. 3.8 C, D y E). Muchos de éstos se observaron descargando las zoosporas hacia el medio de cultivo. Días más tarde y ubicadas las colonias de zoosporangios en cajas de Petri nuevas con medio de

cultivo, se observó un incremento en el crecimiento de las colonias, aunque esta vez, este fue claramente vertical. Las colonias mostraron un color blanquecino con forma de cono con la terminación casi en punta.

Luego de que las colonias fueron transferidas al medio de cultivo líquido 1% Triptona, las colonias de zoosporangios y las zoosporas se multiplicaron masivamente dejando que el medio pase de translúcido a turbio (Fig. 3.9).

La cepa se encuentra depositada en el cepario del instituto de Botánica Spegazzini (LPSC n 1164) y en el cepario de la Dra. Erica Rosenblum, del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Idaho (EEUU).

Caracterización morfométrica de MLA1

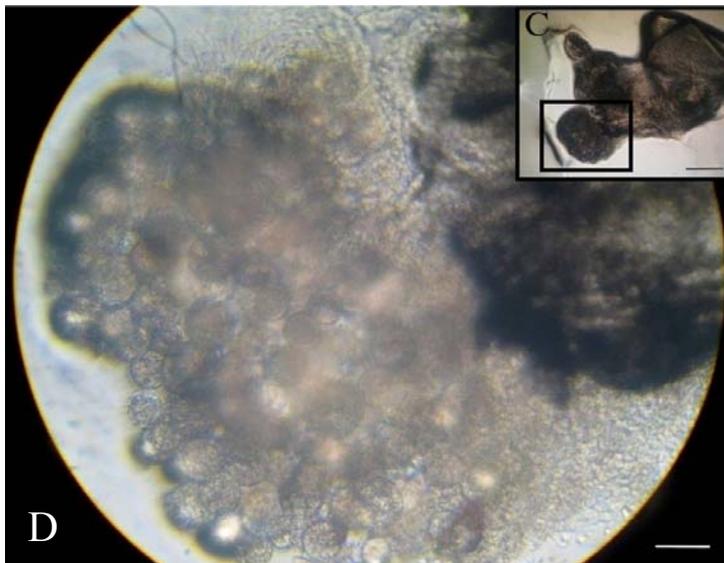
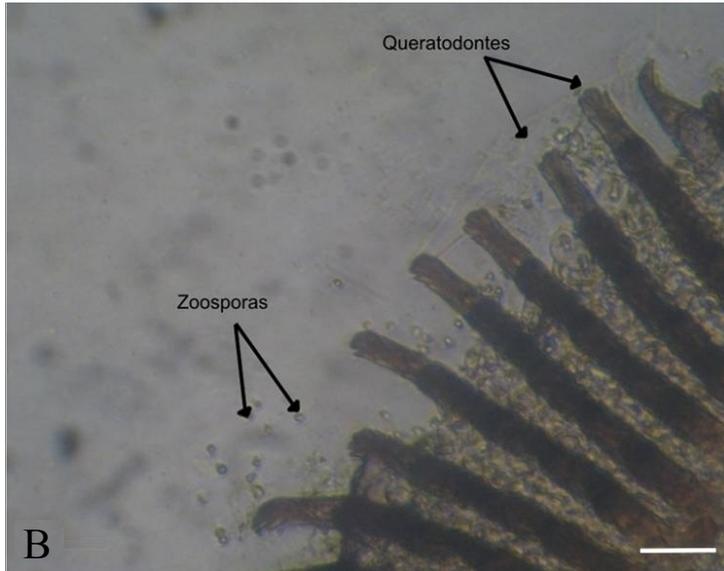
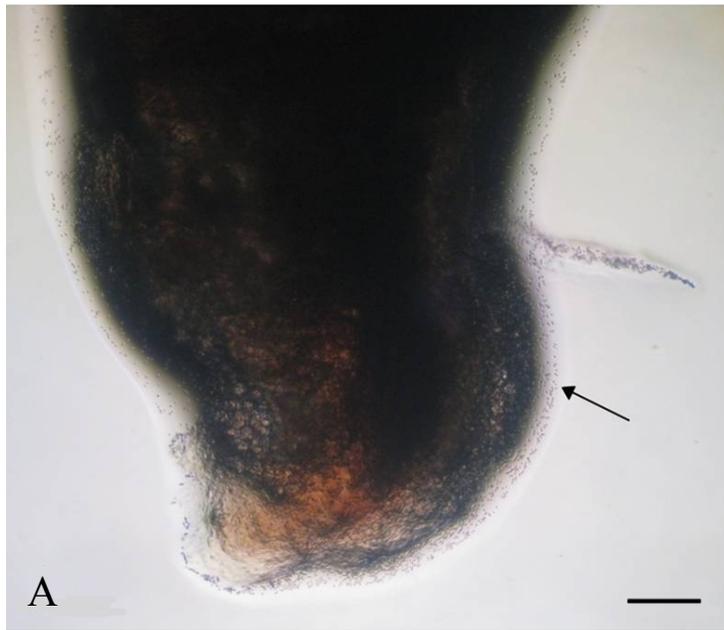
El resultado de las mediciones de los zoosporangios de la cepa MLA1 presentó diámetros con un rango que varió desde 10,22 hasta 51,1 μm con una media de 19,63 μm y un desvío estándar (DS) de 3,75 μm . El número de tubos de descarga varió entre 1 y 2 (Tabla 3.3).

Para la cepa JEL 423, por el contrario, se obtuvieron diámetros de entre 10,22 a 45,99 μm con una media de 24,61 μm y un desvío estándar (DS) de 4,63 μm . El número de tubos de descarga varió entre 1 y 6 (Tabla 3.3).

Las diferencias en el diámetro promedio de los zoosporangios de la cepa MLA1 y JEL 423 fueron significativas ($P < 0,05$). El número de tubos de descarga fue diferente para las dos cepas (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Número de poros y porcentaje (%) de los mismos en las cepas MLA1 y JEL 423.

MLA1		JEL 423	
Nº poros	(%)	Nº poros	(%)
1	95,9	1	75
2	4,1	2	17,2
		3	3,7
		4 a 6	3,1



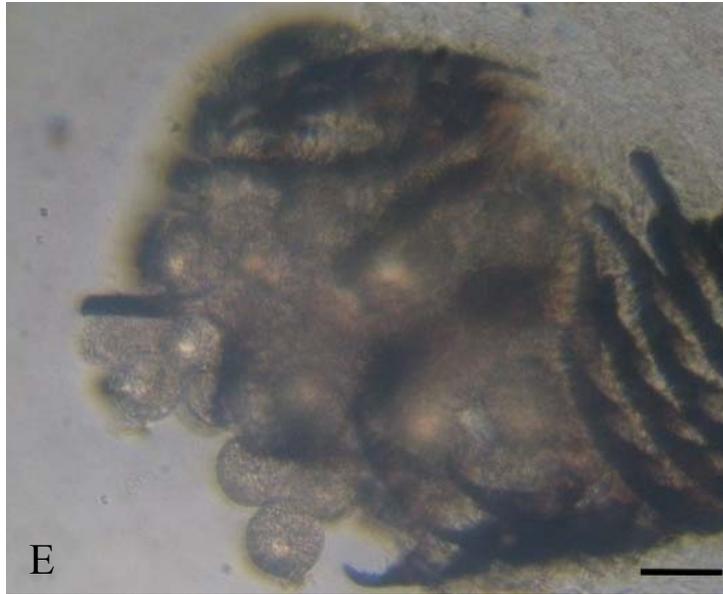


Figura 3.8. Zoosporas liberadas por los zoosporangios hacia el medio de cultivo desde los contornos de la muestra queratinizada proveniente del disco oral de las larvas (A), 100X. Zoosporas liberadas entre los queratodontes (B), 200X. Zoosporangios brotando desde la muestra hacia el medio de cultivo (D), 200X; detalle aumentado de C, 100X. Zoosporangios brotando entre los queratodontes (E), 200X. Escalas: A: 150 μ m; B: 50 μ m; C: 300 μ m; D: 60 μ m; E: 20 μ m.

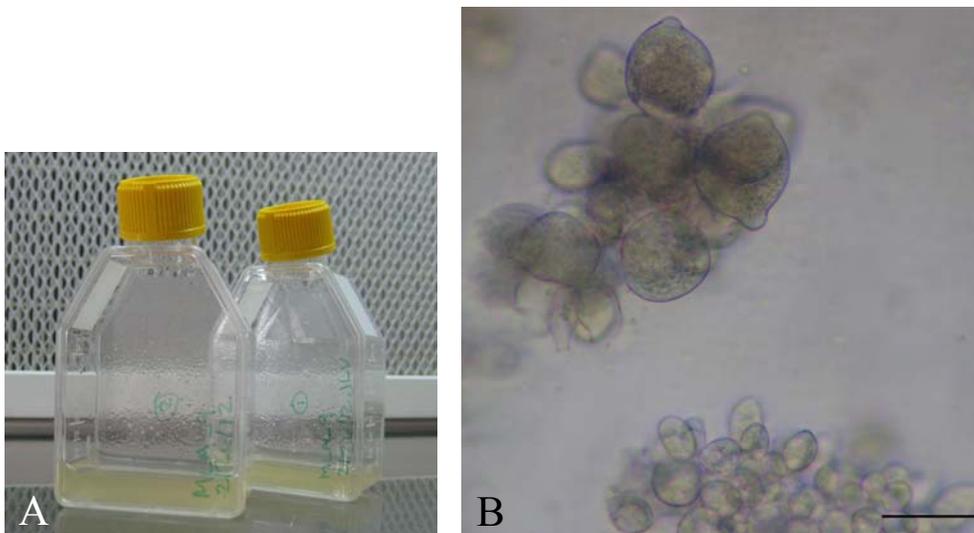


Figura 3.9. Colonias de *Bd* en cultivo líquido (1% Triptona), en recipientes plásticos (A). Zoosporangios de *Bd* en cultivo líquido, 400 X (B). Escala: 30 μ m.

Secuenciación y genoma de la cepa autóctona de *Batrachochytrium dendrobatidis*

Secuenciación

En principio se realizó la secuenciación del genoma completo de seis cepas de *Bd*. Se identificaron entonces, por comparación, las regiones polimórficas en los distintos genomas. Estas regiones representaron 150 nucleótidos a lo largo de todo el genoma. Este método de genotipado de regiones polimórficas se denomina “Sequenom”. Posteriormente se diseñaron los primers (por medio de un software específico de Sequenom”), uno por cada uno de los 150 nucleótidos.

Luego, con esta información se realizó un árbol filogenético, con 47 cepas de *Bd*, utilizando el método de “Neighbor Joining” (Saitou & Nei 1987).

La última cepa (UM142) es un linaje único, de una cepa aislada de rana toro (*Lithobates catesbeianus*) pertenecientes a comercios en Estados Unidos y en el Bosque Atlántico de Brasil.

En la Fig. 3.10 se pueden diferenciar 2 grandes grupos, A (bootstrap: 58,3819 %) y B (bootstrap: 63,651%), además del linaje único (UM142). En el grupo A, pueden encontrarse cepas aisladas de individuos provenientes del Norte, Centro y Sudamérica, África y Australia. Mientras que en el grupo B, todas las cepas pertenecen a aislamientos de individuos de Estados Unidos a excepción de nuestra cepa MLA1. Esto es interesante pues en este análisis MLA1 es la única cepa con “genotipo Norteamericano” aislada fuera de Norte América.

Estos resultados figuran en un trabajo realizado en colaboración con la Dra. Rosenblum en: Rosenblum *et al.* (2012).

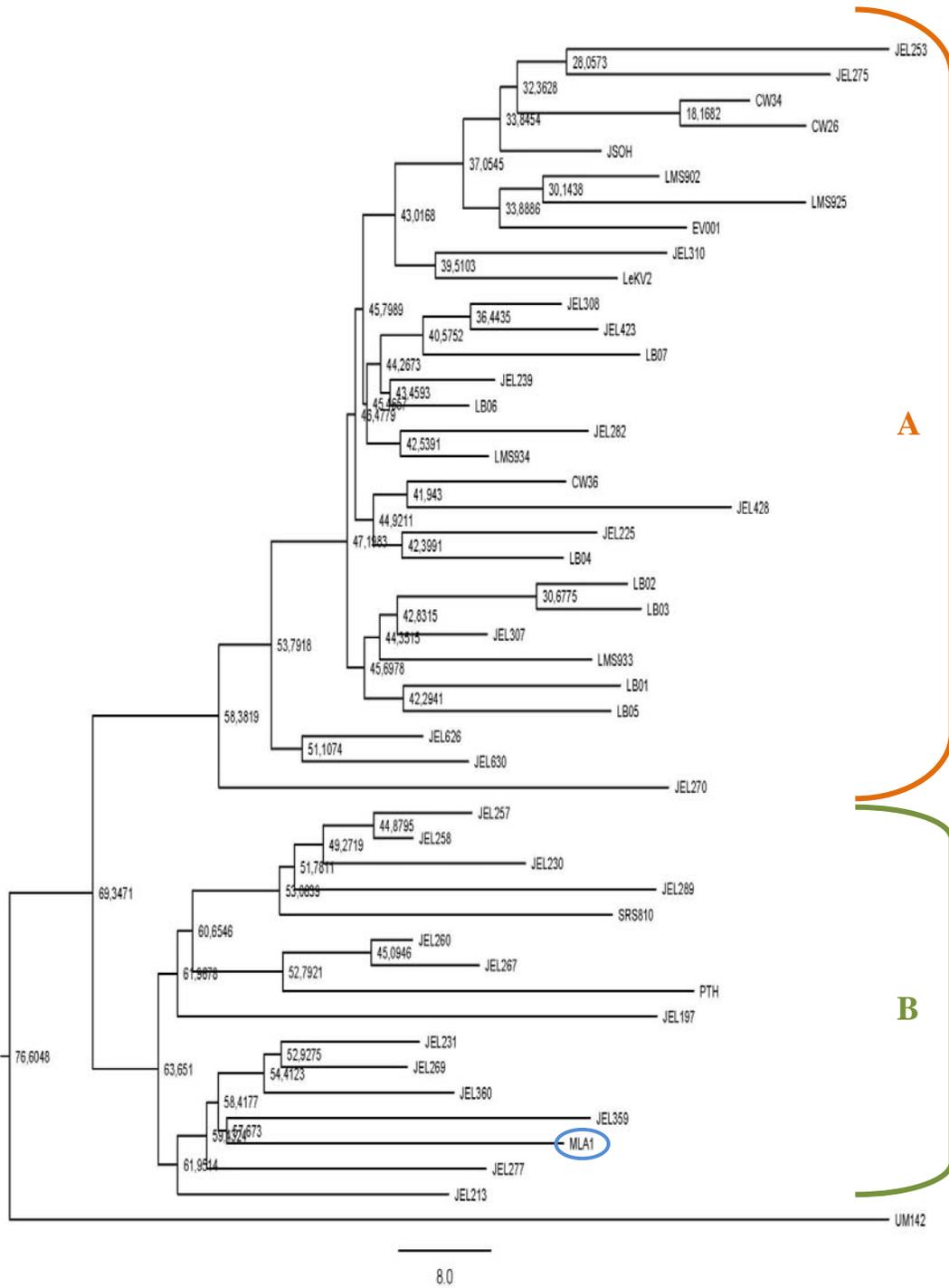


Figura 3.10. Árbol filogenético de 47 cepas de *Bd*. MLA1 (círculo celeste) comparte el grupo “B” solo con cepas aisladas de individuos provenientes de Estados Unidos.

Genoma

Se estimó la filogenia enraizada de 28 cepas incluyendo *Homolaphlyctis polyrhiza* (Hp) como grupo externo.

Los árboles se generaron con 76 polimorfismos de nucleótidos simple (SNPs; que es una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base de una secuencia del genoma) informativos del genoma nuclear usando el método de Máxima Parsimonia en el programa PAUP* 4.0 (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) (Swofford 2003).

Se buscaron arboles usando 100 réplicas mediante el método de permutación de ramas TBR (tree-bisection-reconnection). Los SNPs fueron codificados para distinguir 6 estados de caracteres. Los primeros tres fueron usados para los SNPs donde al menos 1 cepa de *Bd* compartiera 1 alelo con Hp. Los tres posibles estados de carácter fueron homocigota con respecto al alelo Hp, heterocigota, y homocigota con respecto a un alelo alternativo. Los siguientes tres estados del carácter fueron usados para SNPs en donde las cepas *Bd* y Hp no compartían ningún alelo en común y también distinguieran los tres posibles genotipos. Se realizaron 200 réplicas de bootstrap para generar soportes de nodo, bajo un óptimo criterio de parsimonia.

En el árbol resultante puede observarse que *Bd* no muestra especificidad geográfica (visualizada por los distintos colores) o de hospedante (datos no disponibles). Pero es evidente la existencia de dos grandes linajes divergentes de *Bd*. Un gran grupo con 26 cepas (bootstrap 99%), de varios países y hospedantes, por un lado, y el pequeño grupo (bootstrap 100%) que contiene a UM142 (de *L. catesbeianus* de EEUU y de Brasil) y LFT001_10 (de *Hylodes ornata* de Brasil). Cabe subrayar que la cepa autóctona MLA1 (Argentina) y la cepa CLFT026 (del Bosque Atlántico Brasileño) se encuentran dentro de un grupo con “genotipo norteamericano”. Consecuentemente, nuestra cepa MLA1 se sitúa en el grupo con “genotipo norteamericano” tanto en el análisis de las cepas utilizando el genoma completo de las mismas, como en el análisis de las cepas usando solo la secuenciación de las cepas.

Estos resultados figuran en un trabajo realizado en colaboración con la Dra. Rosenblum en: Rosenblum *et al.* (2012).

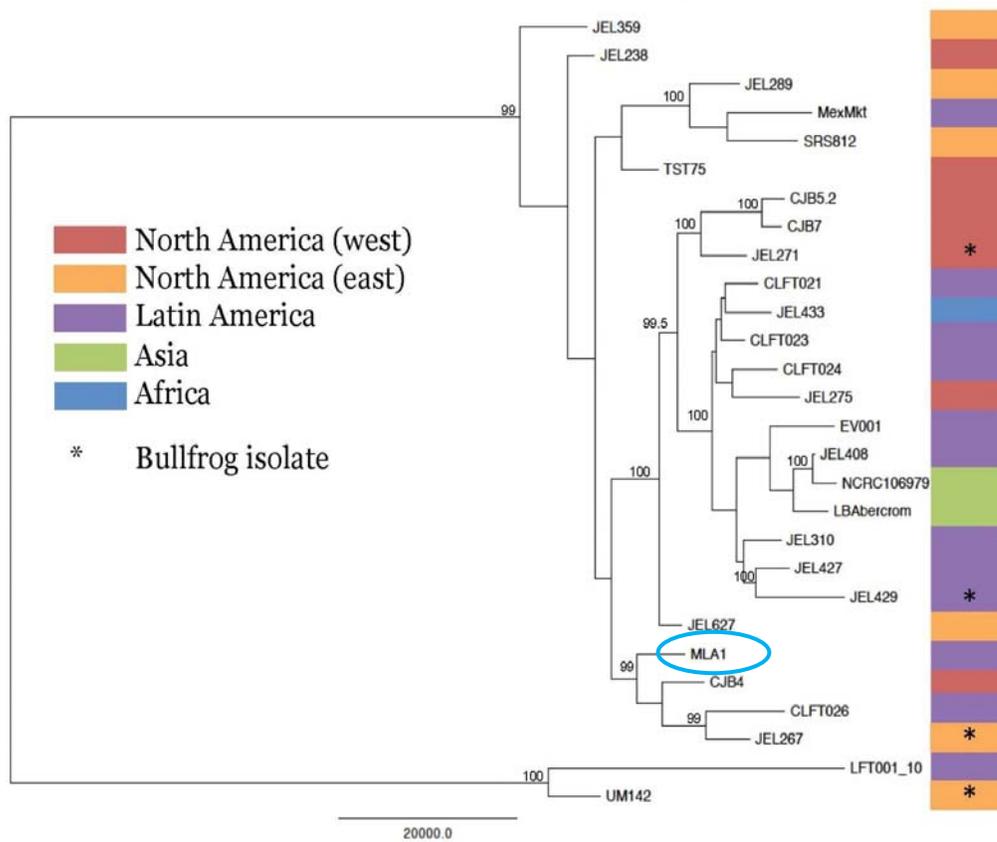


Figura 3.11. Árbol filogenético de 28 cepas de *Bd*, creado a partir del genoma completa de las mismas. MLA1 (círculo celeste).

Bioensayos de Laboratorio

Cálculo de la concentración infectiva de zoosporas/ml y tiempo de exposición

A los dos días del inicio del ensayo, se registró, solamente un individuo muerto durante todo el experimento, el individuo pertenecía al grupo tratamiento con la concentración 6×10^4 zoosporas/ml, y un tiempo de exposición de 3 días, la combinación de ambos factores en sus valores máximos. Ninguno de los individuos de las demás concentraciones y tiempos de exposición experimentó mortalidad. Todos los individuos fueron fijados en formol 10% al término del bioensayo luego de 42 días.

Las muestras histológicas analizadas no mostraron ningún signo de infección por parte de *Bd* (Fig. 3.12), mientras que las mudas obtenidas de los individuos del grupo tratamiento mostraron zoosporangios bien definidos, vacíos y con zoosporas (Fig. 3.13).

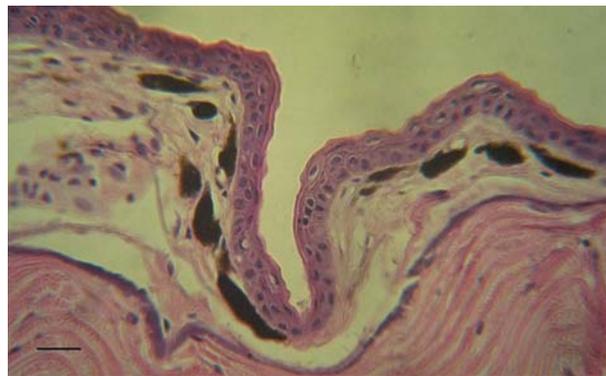


Figura 3.12. Corte histológico de la piel de *R. fernandezae* sin registros de zoosporangios de *Bd*. 400X. Escala: 30

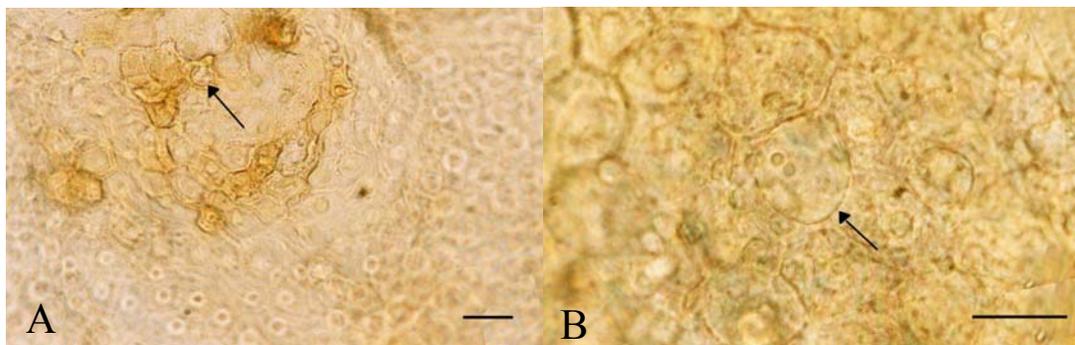


Figura 3.13. Zoosporangios de *Bd* (flechas) en mudas de piel de *R. fernandezae*. En B, nótese las 2 zoosporas dentro del zoosporangio de la figura. A: 400X; B: 1000X. Escalas: A y B: 40 μ m.

Se encontraron mudas infectadas en 6 de los 9 (66%) tratamientos (Tabla 3.4), particularmente en 14 de los 45 individuos de este grupo. En el grupo control se encontraron mudas en solo 2 de los 15 individuos con un examen negativo para *Bd*.

Se encontraron evidencias de *Bd* en las mudas, tan tempranamente como 4 días post exposición a *Bd*.

El análisis de la varianza (ANOVA) siguiendo el modelo tipo III con 3 GL para la variable concentración, reveló un valor de $F = 10,338$ y un valor para $p < 0,0001$; y para la variable tiempo de exposición, con 2 GL, reveló un valor de $F = 7,753$ con un valor de $p = 0,001$. En el análisis de las mudas infectadas (Fig. 3.14) se encontraron diferencias significativas entre la máxima concentración (6×10^4 z/ml) y la media ($p = 0,034$) (6×10^2 z/ml); entre la máxima y la mínima ($p = 0,000$) (60 z/ml) y entre la máxima concentración y el control, con un $p < 0,0001$. También se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de exposición de 3 días-1 día ($p = 0,048$) y 3 días-1 hora ($p = 0,001$).

Tabla 3.4. Distribución de las mudas con *Bd* en las réplicas de los tratamientos.

Répli.	6×10^4 z/ml			6×10^2 z/ml			60 z/ml			C1	C2	C3
	1 h	1 d	3 d	1 h	1 d	3 d	1 h	1 d	3 d			
a			*		*	*			*			
b	*	*	*			*						
c		*	*									
d		*	*			*						
e			*									

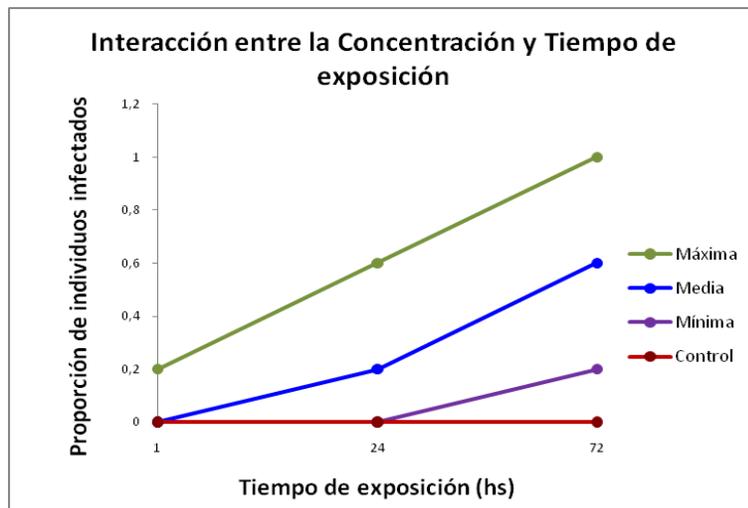


Figura 3.14. Proporción de individuos infectados según la interacción concentración- tiempo de exposición.

Los individuos mostraron cambios en el comportamiento durante el tiempo de exposición. Estos cambios fueron registrados en 10 individuos del grupo tratamiento (22 %) y se detallan en la Tabla 3.5. Los cambios incluyeron:

1. Aletargamiento y capacidad de reacción lenta
2. Frotamiento de las patas traseras contra el cuerpo
3. Estiramiento de lo/s miembro/s trasero/s hacia adelante, muchas veces después de movimientos del recipiente
4. Estiramiento de miembros traseros hacia atrás
5. Retorcimiento del cuerpo
6. Respiración agitada

Tabla 3.5. Síntomas presentados por los individuos del grupo tratamiento. 1: aletargamiento y capacidad de reacción lenta; 2: frotamiento de las patas traseras contra el cuerpo; 3: estiramiento de miembros traseros hacia adelante; 4: estiramiento de miembros traseros hacia atrás; 5: retorcimiento del cuerpo; 6: respiración agitada; a-d: réplicas.

Répli.	6x10 ⁴ z/ml			600 z/ml			60 z/ml			C1	C2	C3
	1 h	1 d	3 d	1 h	1 d	3 d	1 h	1 d	3 d			
a						1,3,4						
b	1,4											
c	1-6			1			1			1		
d							1,3	1				
e	1								1,4			

Los cambios de comportamiento registrados se mantuvieron durante el tiempo de exposición y se atenuaron pasado este tiempo. La excesiva descamación del epitelio (muda) también fue un cambio de comportamiento registrado que se detalló anteriormente. Cabe destacar que el único individuo que se registró muerto en el bioensayo se encontraba boca arriba, tieso, con los miembros anteriores hacia adelante y las glándulas parótidas hinchadas y con secreción.

Un detalle a destacar durante el bioensayo fue que durante el período de exposición, el agua (la suspensión) de algunos de los recipientes de los grupos tratamiento presentó una tonalidad opaca, sucia en comparación con las de los grupos control.

Estudio de la sensibilidad de las distintas especies

Bioensayo con adultos

Bioensayo 1

En los individuos del grupo control de *P. falcipes* se registró 1 individuo muerto el día 5 del inicio del bioensayo, fecha en la cual se fijaron los individuos de esta especie (Tabla. 3.6). En el resto de las especies no se registró mortalidad en los individuos de sus grupos controles en el resto de los días. Luego de 11 días del inicio del bioensayo, se dio por finalizado para evitar que la variable inanición influyera sobre la mortandad de los individuos.

En *H. pulchellus* no se encontraron diferencias significativas ($p=0,317$) entre el grupo tratamiento y el control. Esta especie registró un **tiempo medio de supervivencia (TMS)** de 4 días. El tiempo medio de supervivencia es el tiempo al cual el 50% de los individuos permanecen con vida.

En *S. squalirrostris* se encontraron diferencias significativas ($p=0,034$) entre el grupo tratamiento y el control, siendo el TMS de 4,33 días.

P. falcipes por su parte, no presentó diferencias significativas (0,062) entre ambos grupos, y su TMS también tuvo un valor de 4,33 días.

R. fernandezae, *O. americanus* y *L. latinasus* no presentaron mortalidad durante el desarrollo del bioensayo.

La supervivencia entre todas las especies del grupo tratamiento también mostró diferencias significativas ($p=0,027$) (Fig. 3.15). Se observa una rápida mortalidad de la especie *S. squalirrostris*, seguida por *P. falcipes* e *H. pulchellus*, mientras que no se observa mortalidad en *R. fernandezae* y *O. americanus*

Tabla 3.5. Proporción de supervivencia de las seis especies evaluadas, en ambos grupos (tratamiento y control).

Proporción de supervivencia		
Especies	tratamiento	control
<i>H. pulchellus</i>	0,6	1
<i>S. squalirrostris</i>	0	1
<i>P. falcipes</i>	0,3	0,6
<i>R. fernandezae</i>	1	1
<i>O. americanus</i>	1	1
<i>L. latinasus</i>	1	1

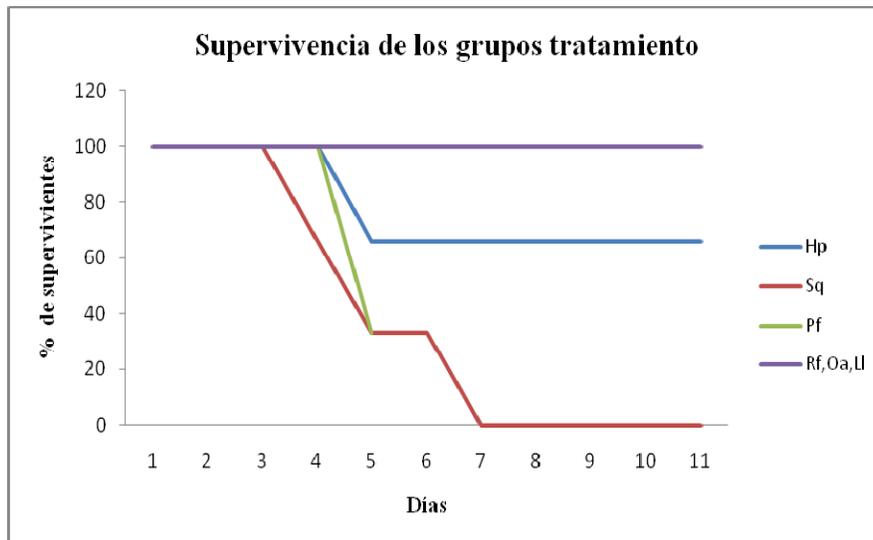


Figura 3.15. Supervivencia (%) en las seis especies expuestas a *Bd* a través del tiempo. Hp: *Hypsiboas pulchellus*, Sq: *Scinax squalirostris*, Pf: *Pseudopaludicola falcipes*, Rf: *Rhinella fernandezae*, Oa: *Odontophrynus americanus* y Ll: *Leptodactylus latinasus*.

En los recipientes de 4 de las 6 (66%) especies del grupo tratamiento (*H. pulchellus*, *O. americanus*, *L. latinasus* y *P. falcipes*) se observaron mudas de piel, las cuales mostraron evidencias claras de zoosporangios de *Bd* (Fig. 3.16). La especie *O. americanus* fue la única que presentó mudas infectadas en sus tres réplicas, las demás solo en algunas. El grupo control presentó mudas de piel en las mismas especies pero con resultados negativos para *Bd*. En el examen histológico de las muestras de piel aparecen zoosporangios visibles en *H. pulchellus*, *L. latinasus* y *R. fernandezae* (Fig. 3.17). Las muestras histológicas de las pieles de un individuo de *P. falcipes* y dos de *S. squalirostris* revelaron pérdida del estrato epidérmico. En los cortes de piel de los restantes dos individuos de *P. falcipes* no se encontró evidencias de infección. El único individuo de *S. squalirostris* que conservó el estrato epidérmico resultó negativo para la infección de *Bd*. Por este motivo y debido a que al igual que *L. latinasus* y *R. fernandezae*, no presentó piel descamada (muda) en los recipientes durante el bioensayo, no se pudo confirmar la infección de *S. squalirrostris* por ninguno de los métodos.

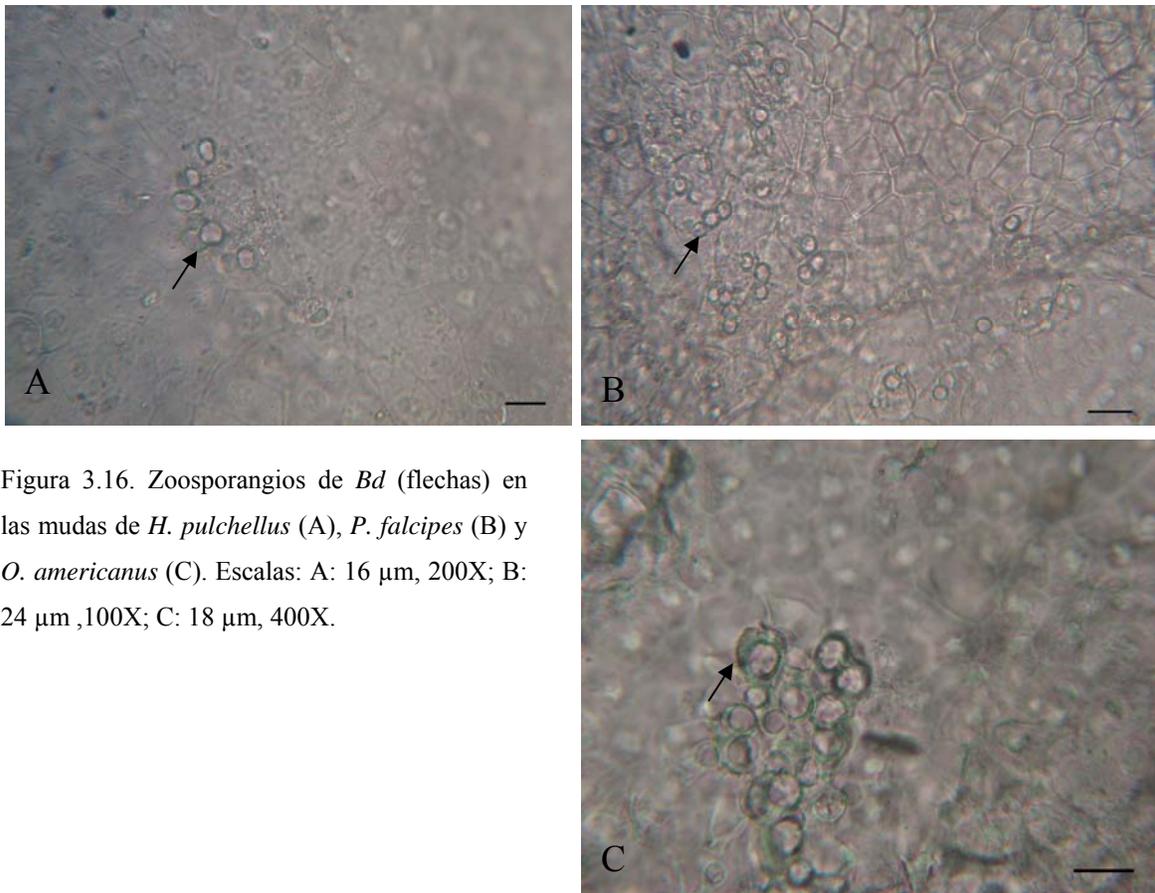


Figura 3.16. Zoosporangios de *Bd* (flechas) en las mudas de *H. pulchellus* (A), *P. falcipes* (B) y *O. americanus* (C). Escalas: A: 16 μm , 200X; B: 24 μm , 100X; C: 18 μm , 400X.

Algunos especímenes del grupo tratamiento mostraron alteraciones en el comportamiento. Los individuos de las especies de *R. fernandezae* y *O. americanus* se mostraron aletargados y con lenta capacidad de reacción, y en esta última especie los ejemplares se frotaron constantemente los miembros anteriores y posteriores contra el cuerpo. En este bioensayo también se observó el agua (suspensión) de los recipientes del grupo tratamiento, más turbia y con trozos de piel (muda) muy pequeños, al contrario del grupo control.

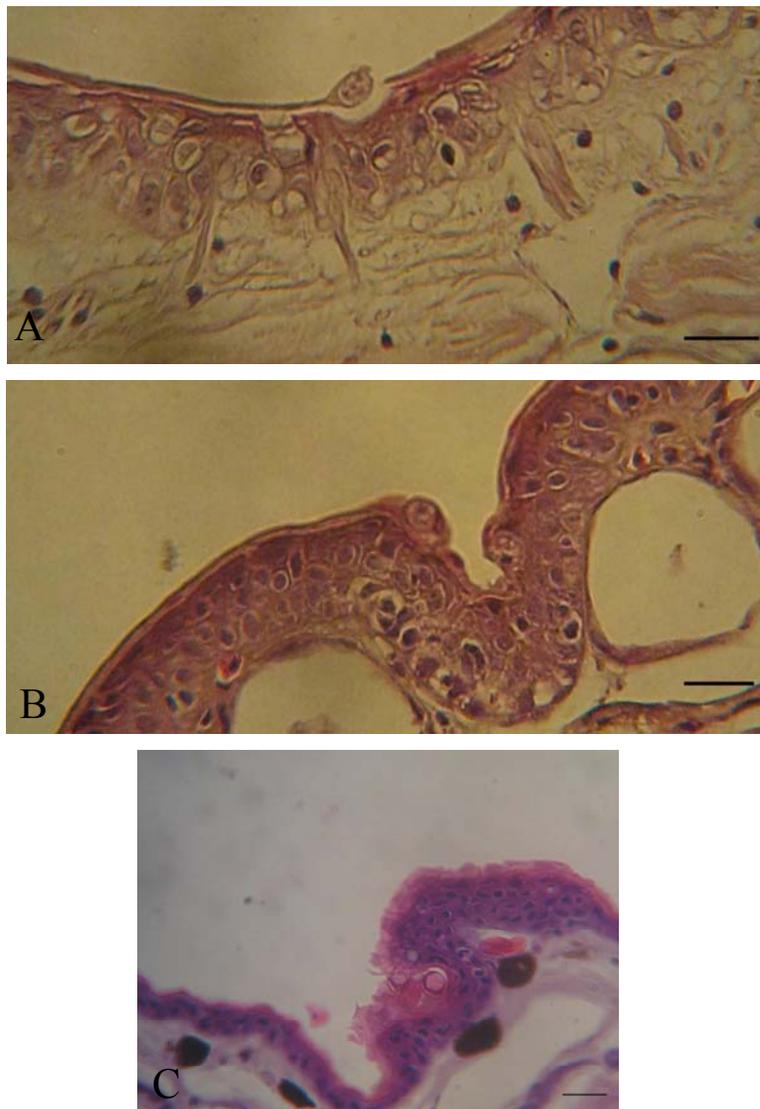


Figura 3.17. Zoosporangios de *Bd* (flechas) en las pieles (cortes histológicos) de *H. pulchellus* (A), *L. latinasus* (B) y *R. fernandezae* (C). Escalas: A: 20 μ m, B: 18 μ m; C: 20 μ m.

Los individuos de las especies *S. squalirrostris* y *P. falcipes* que murieron durante el bioensayo, presentaban ambos miembros traseros estirados y los miembros anteriores contra el cuerpo (Fig. 3.18).



Figura 3.18. Individuos de *P. falcipes* (A) y *S. squalirostris* (B) (muertos durante el bioensayo) con miembros traseros estirados.

Bioensayo 2

En el ensayo con la especie *Hypsiboas pulchellus* se encontró un individuo muerto en el grupo control a los **5 días** del inicio del bioensayo (mortalidad significativa en el grupo control), momento en el cual se registró un 80 % de mortalidad en el grupo tratamiento de esta especie (Fig. 3.19). En ese momento se fijaron todos los individuos y se finalizó ese ensayo. El análisis de la supervivencia mostró diferencias significativas ($p=0,002$) entre el grupo tratamiento y el control, y registró un TMS de 4 días. En los recipientes de los individuos de esta especie no se registraron mudas de piel en ningún momento durante el transcurso del bioensayo. El examen histológico de las muestras de piel resultó negativo, sin evidencias de zoosporangios de *Bd*, para todas las muestras de piel analizadas (Fig. 3.21).

En la especie *Pseudis minutus* se registró el primer muerto en el grupo control a los **6 días** del inicio del bioensayo; en ese momento en el grupo tratamiento se evidenció un 20% de mortalidad (Fig. 3.19) y se procedió de igual manera para la fijación de los ejemplares. No se registraron diferencias significativas ($p=0,465$) en el análisis de la supervivencia entre el grupo tratamiento y el grupo control, y el TMS fue de 4 días. En los recipientes de los individuos de esta especie no se registraron mudas de piel durante el transcurso del bioensayo. El análisis histológico de las muestras de piel resultó negativo

también para esta especie (Fig. 3.21). Uno de los 2 individuos del grupo tratamiento que murieron durante este período, presentó los miembros posteriores estirados (Fig. 3.23).

Por último, en la especie *L. latrans* no se registraron individuos muertos tanto para el grupo control como para el tratamiento durante 13 días. Luego de este período para evitar que la variable inanición influyera sobre la mortandad de los individuos, (teniendo en cuenta que los individuos no se alimentaron durante el transcurso del bioensayo), se dio por finalizado y se fijaron los ejemplares. Los individuos de *L. latrans* exhibieron una gran cantidad de mudas de piel, en 7 de los 10 recipientes del grupo tratamiento (70%) y en 4 del grupo control. Las mudas se registraron desde el día 5 del inicio del tratamiento. Todas las mudas del grupo tratamiento presentaron zoosporangios bien definidos, aislados o agrupados en las células de la epidermis (Fig. 3.22), mientras que no se observaron evidencias de *Bd* en las mudas del grupo control. De manera subjetiva se pudo observar que la cantidad de zoosporangios presentes en las muestras aumentó significativamente con el correr de los días. En los parches de piel procesados mediante la técnica histológica se encontraron zoosporangios de *Bd* en muchos de los cortes examinados.

El análisis de la varianza (ANOVA) siguiendo el modelo tipo III con 2 GL reveló una $F = 14,625$ y una $p < 0,0001$. La supervivencia entre las distintas especies del grupo tratamiento mostró diferencias significativas entre *H. pulchellus* y *L. latrans* ($p < 0,0001$) y entre *H. pulchellus* y *P. minutus* ($p = 0,002$). En un gráfico comparativo (Fig. 3.20) puede observarse una mayor y más temprana caída en la supervivencia de *H. pulchellus* con respecto a la de *P. minutus*.

Las tres especies mencionadas presentaron síntomas de aletargamiento y reacción lenta a lo largo de todo el transcurso del bioensayo, aunque fue mayor durante el tiempo de exposición.

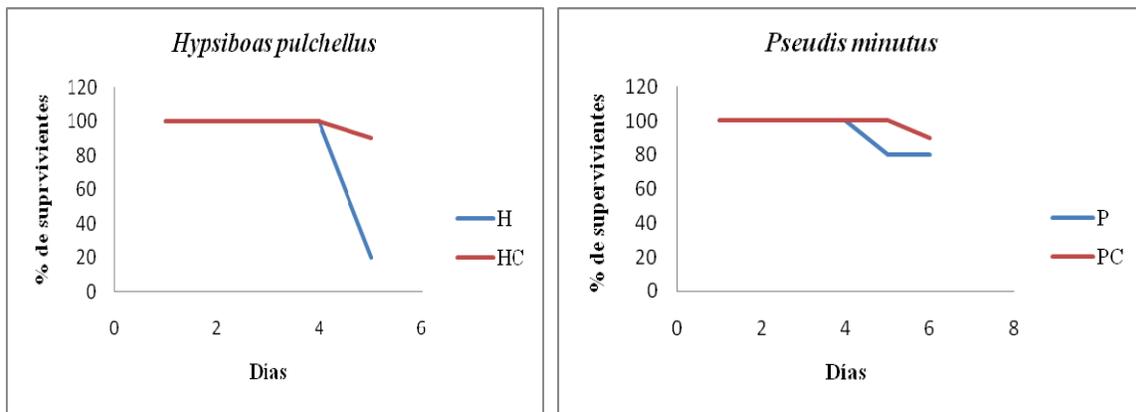


Figura 3.19. Supervivencia de *P. minutus* (P) y *H. pulchellus* (H) y sus controles (Pc, Hc), a través del tiempo.

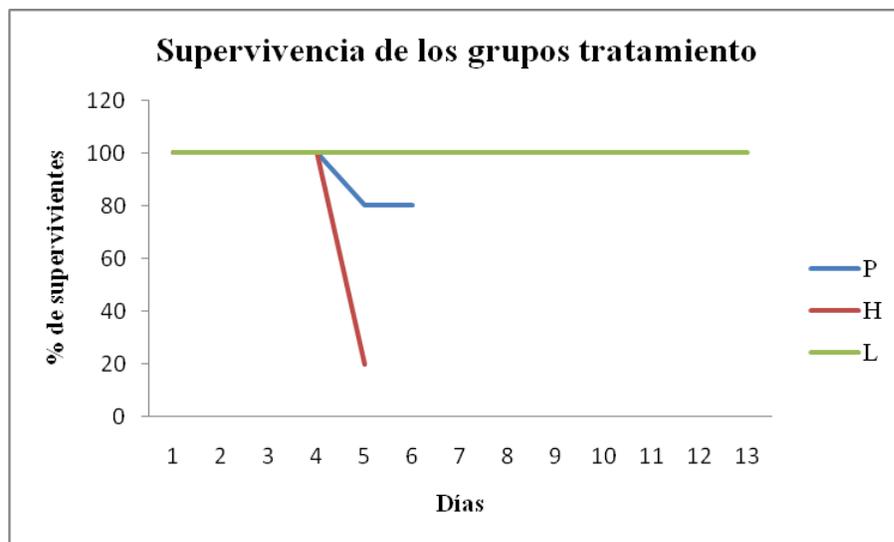


Figura 3.20. Supervivencia de las especies *P. falcipes* (P), *H. pulchellus* (H) y *L. latrans* (L) a través del tiempo.

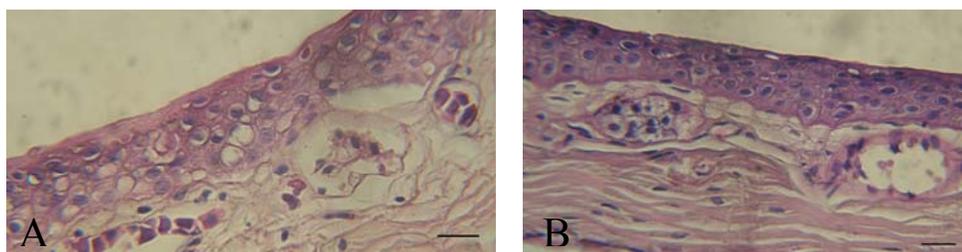


Figura 3.21. Piel de *H. pulchellus* (A) y *P. minutus* (B) sin registros de zoosporangios de *Bd*. Escalas: 30 μ m.

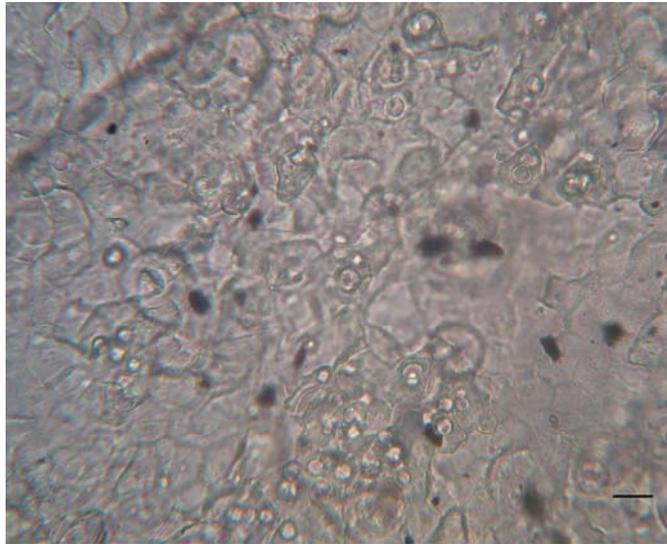


Figura 3.22. Zoosporangios de *Bd.* en las mudas de *L. latrans*. 400X. Escalas: 16 μ m.



Figura 3.23. Individuo de *P. minutus* (muerto durante el bioensayo) con miembros traseros estirados.

Bioensayo con larvas

Bioensayo 3

En los individuos del grupo tratamiento de *Rhinella fernandezae* se registró una supervivencia del 10% al día 1 del bioensayo, la cual se volvió nula el día 2; para ese momento su grupo control no presentó mortalidad alguna.

Por otro lado *Scinax squalirostris* presentó un 50% de supervivencia al día 1 y 0 el 2° día, momento en el cual fue nula la mortalidad de su grupo control. Los ensayos de *R. fernandezae* y *S. squalirostris* finalizaron al registrarse una mortalidad total en el grupo tratamiento, el día 2 del bioensayo (Tabla 3.7; Fig. 3.24).

Leptodactylus latrans mostró al igual que *Hypsiboas pulchellus* una disminución más atenuada de la supervivencia (Tabla 3.7, Fig. 3.24), aunque el grupo control de *L. latrans* registró un 10% de mortalidad el día 5, momento en el cual se dio por finalizado el ensayo para esta especie. *H. pulchellus* fue la especie que registró un mayor tiempo de supervivencia.

Tabla 3.7: Proporción de supervivencia de las cuatro especies y el grupo control a través del tiempo (días). Ll: *Leptodactylus latrans*; Sq: *Scinax squalirostris*; Rf: *Rhinella fernandezae*; Hp: *Hypsiboas pulchellus*.

	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Ll	1	1	0,6	0,2	0,1	0,1			
Hp	1	1	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0
Rf	1	0,1	0						
Sq	1	0,5	0						

El análisis de la varianza (ANOVA) siguiendo el modelo tipo III con 3 GL, reveló un valor de $F = 3,853$ y un valor para $p = 0,017$. El análisis de supervivencia mostró diferencias significativas entre el grupo tratamiento y control para todas las especies: *R. fernandezae* ($p < 0,0001$) registró un TMS de 1,1 días, *S. squalirostris* ($p < 0,0001$) presentó un TMS de 1,5 días, *L. latrans* ($p = 0,004$) que exhibió un TMS de 3,4 días y por último *H. pulchellus* ($p < 0,0001$) tuvo el TMS más prolongado con 3,9 días.

La supervivencia entre las distintas especies del grupo tratamiento mostró diferencias significativas entre *L. latrans* y el resto de las especies ($p = 0,041$).

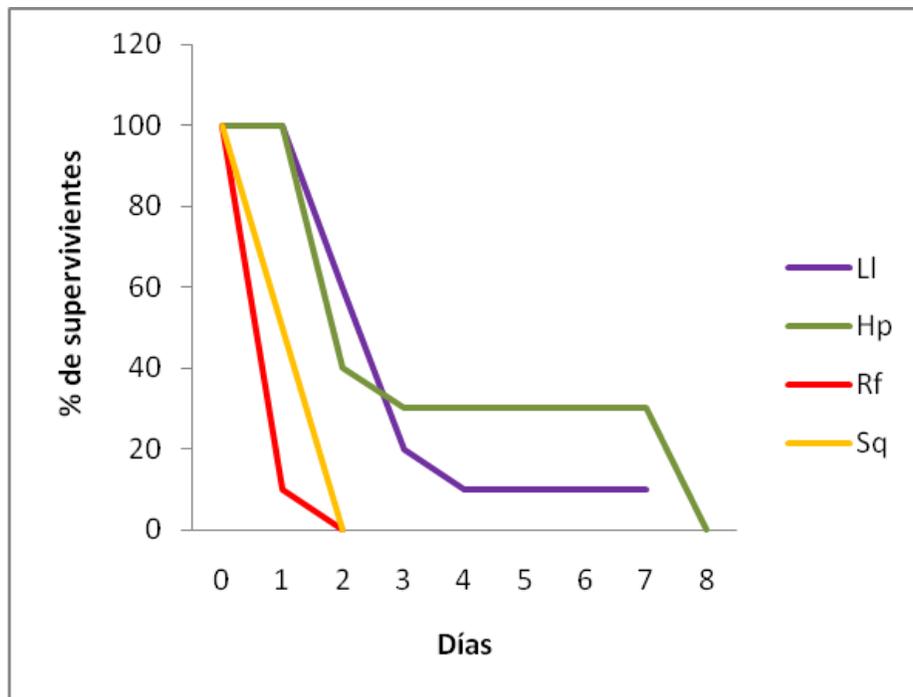


Figura 3.24. Supervivencia (%) de las cuatro especies de larvas expuestas a *Bd*, a través del tiempo. Ll: *Leptodactylus latrans*, Hp: *Hypsiboas pulchellus*, Rf: *Rhinella fernandezae*, Sq: *Scinax squalirostris*.

Examen de las estructuras orales: El análisis de los discos orales de las larvas a la lupa resultó negativo (Fig. 3.25), ya que ninguna especie presentó despigmentación y/o deformación evidente. El examen al microscopio óptico resultó positivo para la presencia de *Bd* en las muestras analizadas para *H. pulchellus* y *R. fernandezae*, mientras que fue negativo para *L. latrans* y *S. squalirrostris* (Fig. 3.26).

El análisis de los cortes histológicos de las larvas de las 5 especies, no reveló evidencias de zoosporangios de *Bd*.

El comportamiento de las larvas expuestas a *Bd* mostró alteraciones durante el bioensayo, registrándose aletargamiento, reacción lenta al estímulo y desorientación. Los controles no manifestaron ningún cambio comportamental.

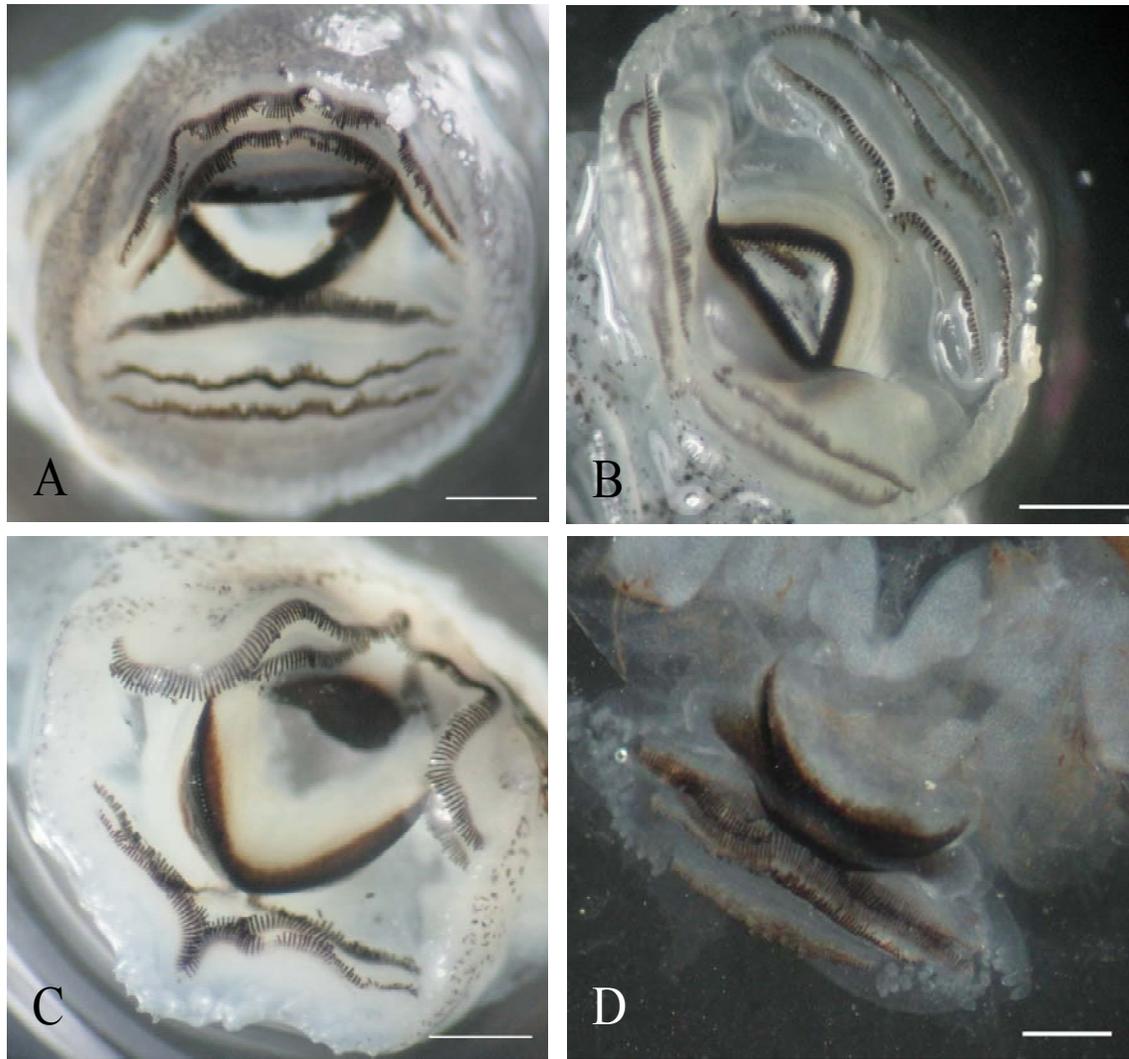


Figura 3.25. Discos orales de *L. latrans* (A), *H. pulchellus* (B), *S. squalirrostris* (C) y *R. fernandezae* (D) sin registros de deformaciones o decoloraciones. Escalas: A: 0,9 mm; B: 0,5 mm; C: 0,7 mm; D: 0,25mm.

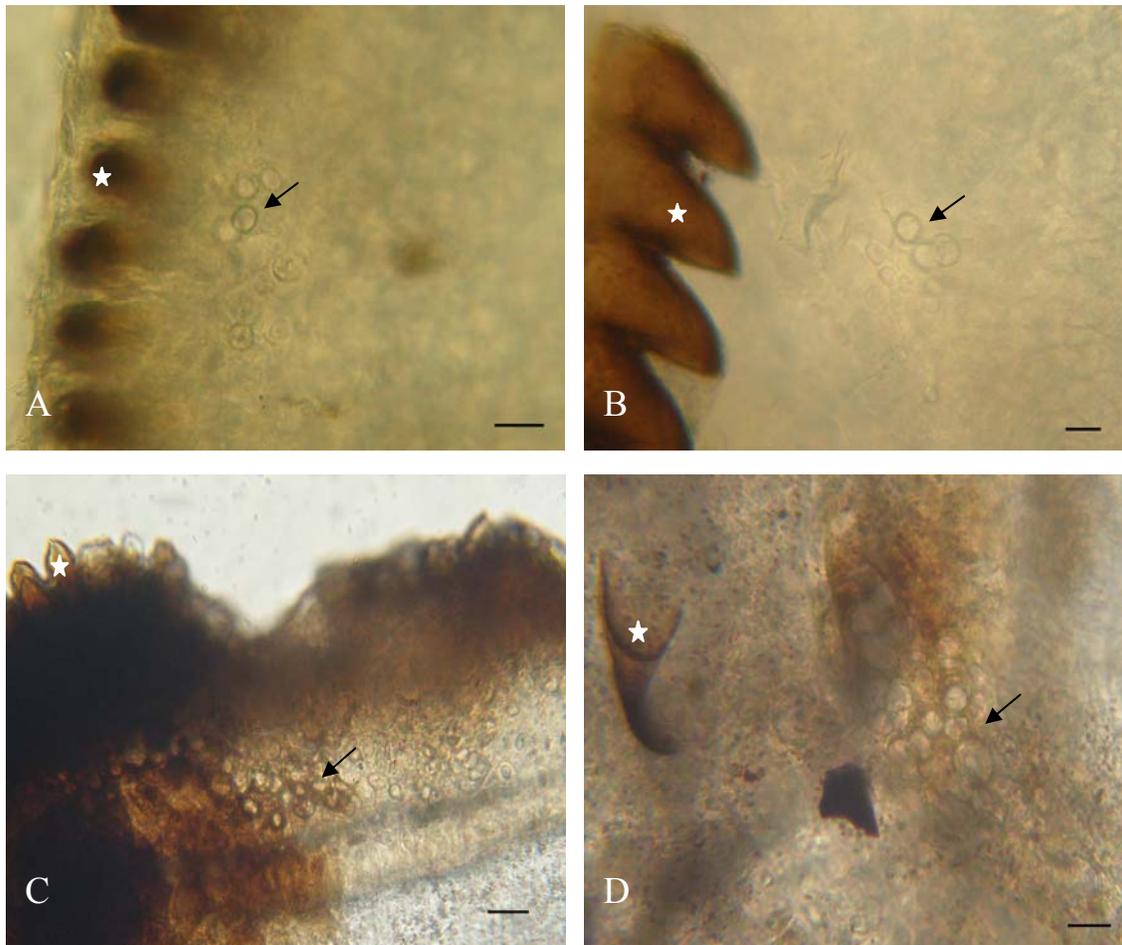


Figura 3.26. Zoosporangios de *Bd* (flecha) en discos orales de *H. pulchellus* (A y B) y *R. fernandezae* (C y D). Nótese los queratodontes en las figuras (estrella). Escalas: A: 20 μm ; B: 10 μm ; C: 20 μm ; D: 10 μm . 400X (A, B y D) y 200X (C).

Bioensayo 4

En este bioensayo se evaluó la susceptibilidad y sensibilidad a *Bd* de una sola especie de anuro, *Physalaemus fernandezae*. Se evaluaron dos poblaciones distintas (Ph: proveniente de la R.N.I. Punta Lara y PhA: proveniente de Pinamar) con una misma cepa de *Bd* autóctona (MLA) y la misma población (proveniente de la R.N.I. Pta. Lara) con una cepa extranjera (JEL 423: PhE).

Se encontraron diferencias significativas en el análisis de la supervivencia de los tres grupos: Ph, PhA y PhE ($p < 0,0001$), con sus respectivos controles (Fig. 3.27). Los TSM

registrados fueron de 3,1, 5,0 y 6,5, respectivamente. La supervivencia de PhA registró una abrupta caída del 100% a 0% del día 4 al 5 del bioensayo, mientras que Ph y PhE tuvieron una disminución más gradual en su supervivencia (Tabla 3.8), siendo PhE el tratamiento que más perduró a lo largo del tiempo. Los grupos control de los tres tratamientos tuvieron una supervivencia del 100% a lo largo de todo el bioensayo.

El análisis de la supervivencia entre todos los grupos tratamientos mostró diferencias significativas ($p=0,001$) entre los tres grupos evaluados, aunque no fue posible analizar entre cuales existían las diferencias (mediante un análisis de ANOVA), ya que todos presentaron mortalidad total en sus grupos tratamientos.

Los tres grupos tratamiento evaluados exhibieron una supervivencia nula en algún momento del bioensayo que varió de 5 días (PhA) a 14 días (PhE).

Gráficamente pueden visualizarse diferencias en el tiempo de supervivencia de los tres tratamientos (Fig. 3.28). Es visible que la población de R.N.I. Pta. Lara evaluada con la cepa foránea JEL 423 (PhE) es el grupo que perdura más tiempo en el bioensayo.

Tabla 3.8: Proporción de supervivientes de los distintos grupos tratamiento (Ph, PhA y PhE) a través del tiempo (días).

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ph	1	1	0,7	0,1	0,1	0,1	0,1	0							
PhA	1	1	1	1	1	0									
PhE	1	1	0,9	0,9	0,9	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0

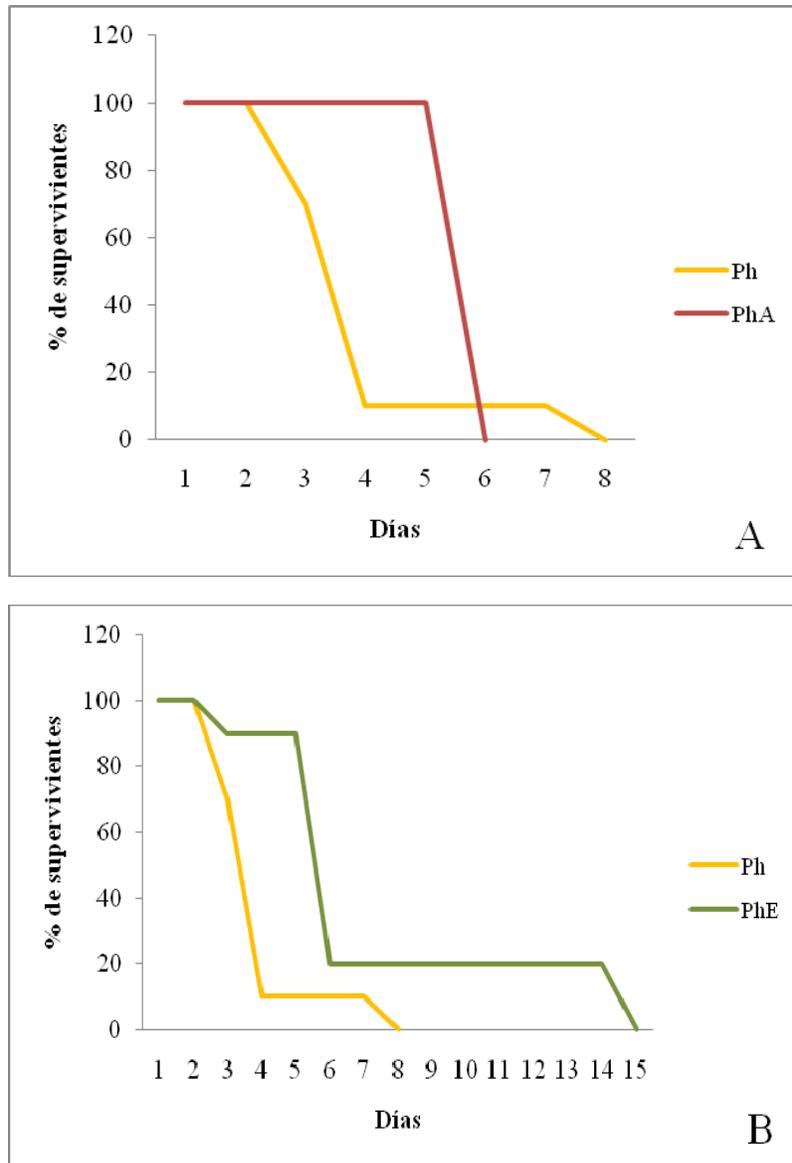


Figura 3.27. Supervivencia (%) de los grupos tratamientos Ph y PhA (A) y Ph y PhE (B) a través del tiempo.

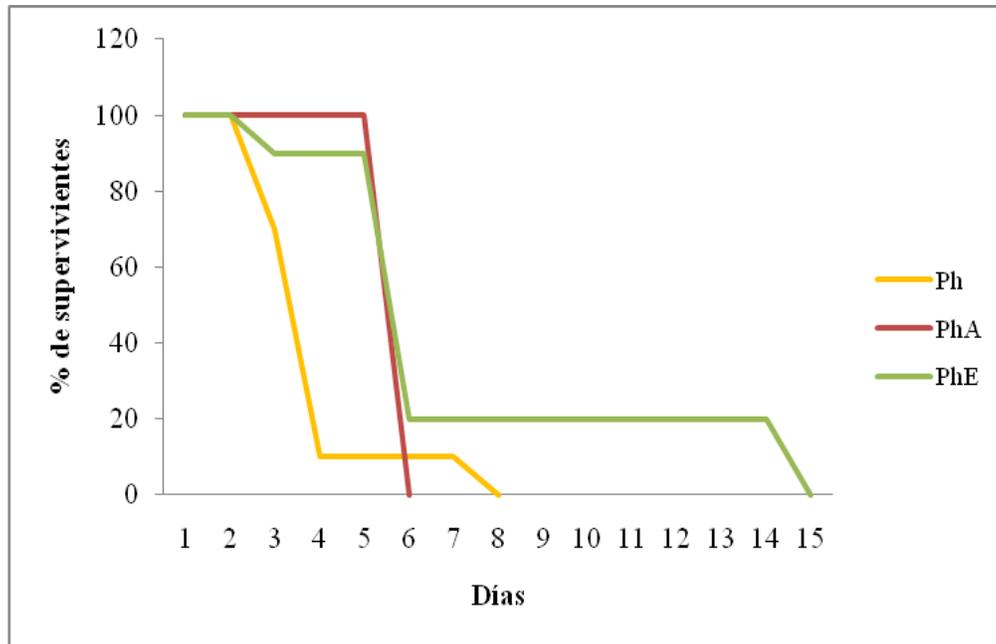


Figura 3.28. Supervivencia de los tres grupos tratamientos a través del tiempo.

Examen de las estructuras orales: El examen a la lupa de los discos orales de las larvas, presentó despigmentación y pérdida de la mayor parte de las estructuras del disco oral en algunos individuos del tratamiento Ph (Fig. 3.29); en muchos el disco oral no pudo observarse debido al deterioro de los mismos. En 2 de los individuos del tratamiento PhA, se observó en una leve decoloración en los queratodontes inferiores (Fig. 3.29, C). Los individuos del tratamiento PhE no pudieron observarse correctamente debido al deterioro de los mismos. El examen de los discos orales al microscopio óptico fue positivo para Ph y PhA, y negativo para PhE (Fig. 3.29, B y D). Se observaron zoosporangios claros de *Bd*, pero en todos los casos con una infección leve. El examen histológico fue negativo para todos los tratamientos.

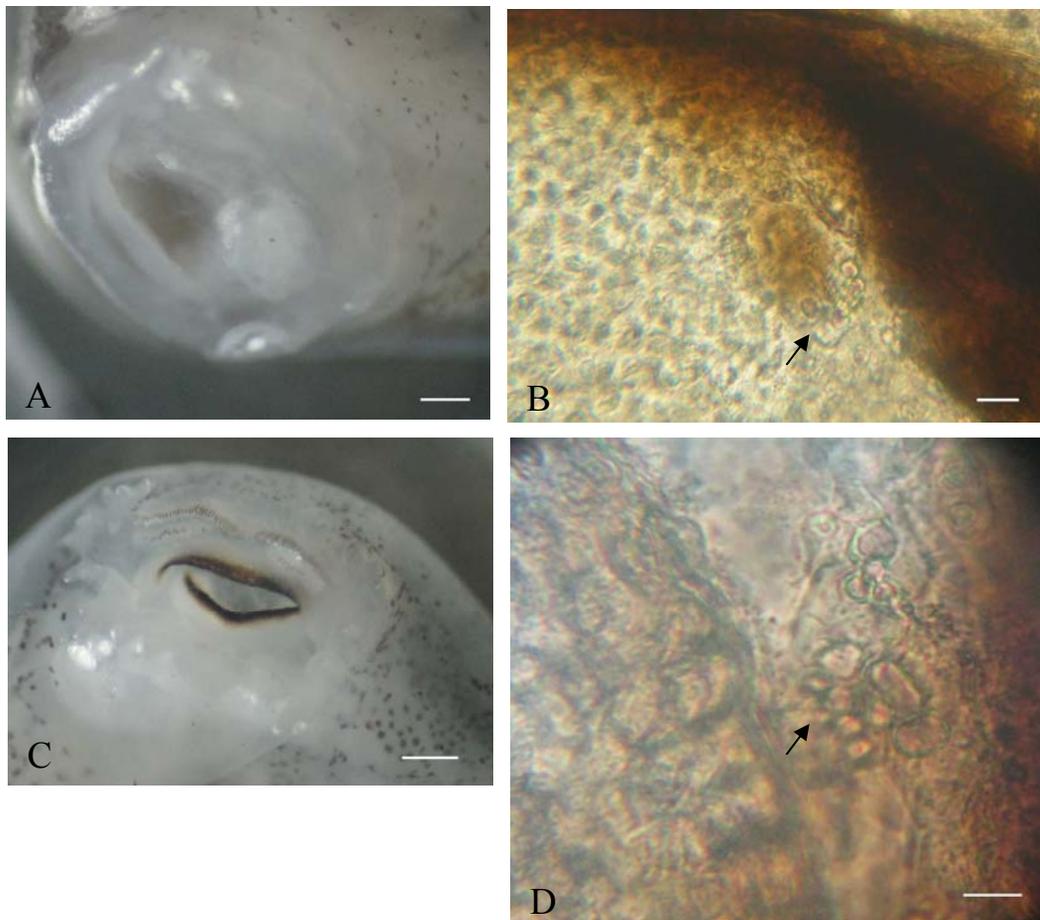


Figura 3.29. Discos orales de *P. fernandezae* en los tratamientos Ph (A) y PhA (C). Zoosporangios de *Bd* (flechas) en discos orales de los tratamientos Ph, (B) y PhA (D). B: 200X, D: 400X. Escalas: A: 0,12 mm; B: 0,25 mm; B: 20 μ m; D: 10 μ m.

Incidencia topográfica de Batrachochytrium dendrobatidis en distintos parches ventrales de L. latrans

Los resultados del análisis de los puntos de infección en las diferentes regiones del cuerpo mostraron un importante predominio en las regiones MI1, MD1 y V1 (Muslo: MI1, MI2; Vientre: V1, V2) para L10 mientras que para L7 fueron MI1, MI2 y MD2 (Fig. 3.30). Al promediar los dos individuos, los puntos de infección predominaron en MI1, MI2 y MD1 (Fig. 3.31). Por lo tanto *Bd* tuvo su mayor incidencia en la región MI1, que predominó en ambos individuos.

En el análisis de los puntos de infección de las diferentes regiones del cuerpo se encontraron diferencias significativas ($p= 0,000$) entre las distintas regiones analizadas tanto para el individuo L10 ($H=28,58$) como para L7 ($H=31,808$). Contrariamente la comparación entre ambos individuos analizados, no mostró diferencias significativas ($p=0,146$, $z=1,453$) para la infección en las distintas regiones.

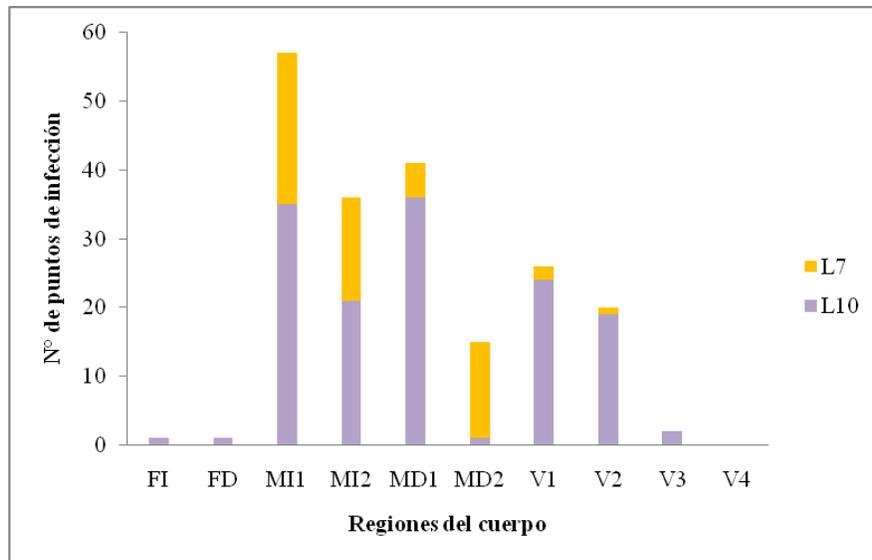


Figura 3.30. Número de puntos de infección en las distintas regiones del cuerpo en L7 y L10.

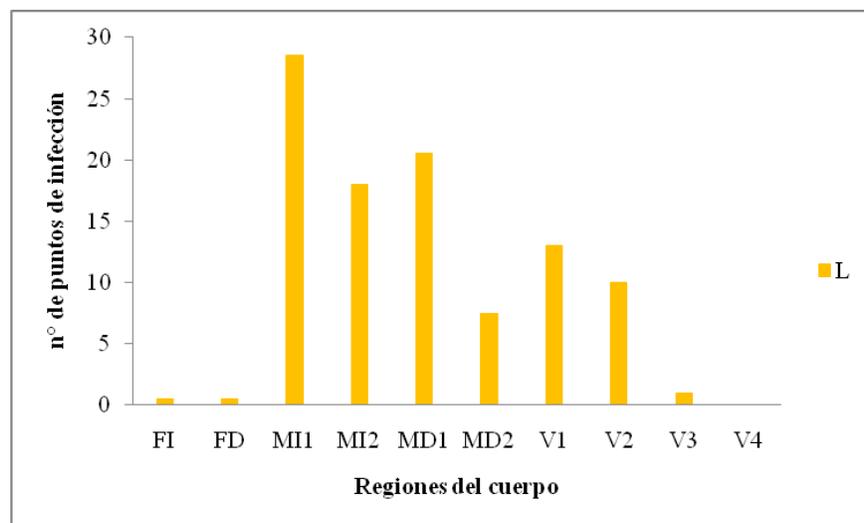


Figura 3.31. Número de puntos de infección en las distintas regiones del cuerpo en L (n° promedio de puntos de infección entre L7 y L10).

La **cantidad de** zoosporangios por punto de infección varió entre los 2 ejemplares. Mientras en los puntos de infección de L10 se encontraron entre 2 y 6 zoosporangios, en los de L7 la mayoría rondaron entre 1 y 4.

La estimación de la cantidad de zoosporangios por mm^2 se realizó teniendo en cuenta un promedio de 4 zoosporangios por punto de infección para L10 y 3 para L7. Al realizarse 120 cortes de 7 mm de ancho por 5 μm de espesor, se analizó en total una zona de 4,2 mm^2 por región. Se estimó entonces la cantidad de zoosporangios por mm^2 en cada región (Tabla 3.9; Fig. 3.32).

Tabla 3.9. Número de zoosporangios de *Bd*/ mm^2 en los individuos L10 y L7.

	FI	FD	MI1	MI2	MD1	MD2	V1	V2	V3	V4
L10	1	1	33	20	34	1	23	18	2	0
L7	0	0	15	11	3	10	1	1	0	0

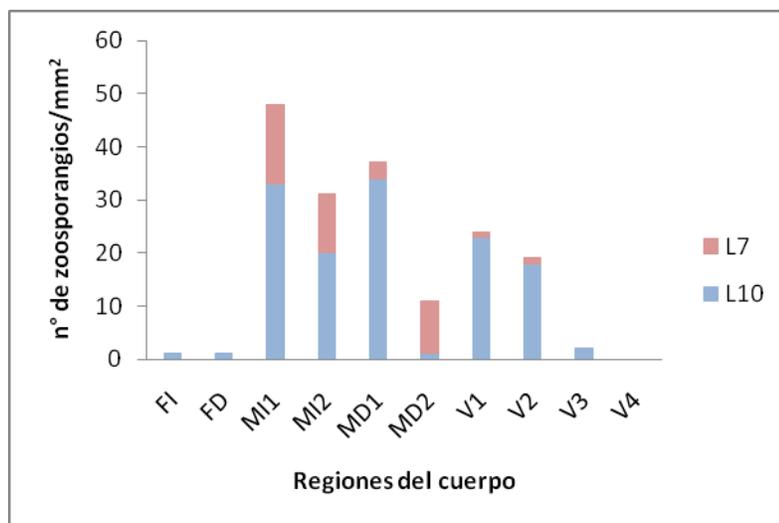


Figura 3.32. Número de zoosporangios/ mm^2 en las distintas regiones del cuerpo en L7 y L10.

Discusión

Análisis de la presencia de *Bd* en Anuros

Anuros del Área de Estudio

Muestreo por transectas y trampas de pozo (captura viva)

Se analizaron 13 individuos pertenecientes a 4 especies de anuros *P. minutus* (cuatro adultos y dos larvas), *H. pulchellus* (un adulto y una larva), *L. latrans* (tres juveniles y un adulto) y *S. squalirrostris* (un adulto). Nueve de los 13 individuos colectados fueron capturados durante la realización de muestreos por transectas que se realizaron de Julio a Noviembre de 2002 (6 individuos) y de Marzo a Octubre de 2006 y 2007 (3 individuos). Mientras que cuatro de ellos (todos pertenecientes a la especie *L. latrans*) fueron colectados mediante el uso de trampas de pozo que se utilizaron paralelamente a las transectas, durante el muestreo entre el 2006 y el 2007. De los seis individuos colectados en el año 2002, un individuo adulto de *P. minutus* y una larva de *H. pulchellus* presentaron infección por *Bd*. El individuo de *P. minutus* se colectó el mismo día junto con un ejemplar de *H. pulchellus* y uno de *S. squalirrostris* (ambos adultos) en la misma charca (charca B), pero solamente el ejemplar de *P. minutus* presentó una infección de tipo leve. Las temperaturas reinantes el día en que se colectaron, rondaron entre 27,6°C (T. mínima) y 14,9°C (T. máxima), mientras que los valores medios mensuales variaron entre 30°C y 3,3°C (datos suministrados por el Departamento de Sismología e Información Meteorológica- FCAG-UNLP. Tabla 3 y 4, ANEXO I). Estas temperaturas son de una gran amplitud y sobrepasan los rangos superior e inferior tolerados por el hongo (Longcore *et al.* 1999; Piotrowski *et al.* 2004). La negatividad de los otros dos individuos (*H. pulchellus* y *S. squalirrostris*), teniendo en cuenta además que la infección hallada en *P. minutus* fue determinada como una infección leve, podría justificarse por la subestimación de la infección de *Bd* mediante la técnica histológica. Pero, ya que todos los individuos fueron analizados de la misma forma, examinando la misma cantidad de piel de los mismos parches corporales (vientre y muslos, más susceptibles a la infección) y mediante el mismo método de observación; esto entonces reduciría el margen de error para un falso negativo. Sumado a esto

aproximadamente 2 meses después de estos hallazgos, se colectaron 2 individuos de *P. minutus* (larvas) en la misma charca, los mismos también resultaron negativos para *Bd*. En este caso podría ser más confiable todavía el análisis de la infección por la técnica histológica, ya que analizando la misma cantidad de tejido, se evalúa un área que es relativamente más grande con respecto al área total susceptible a ser infectada por *Bd* (en este caso el disco oral córneo); por lo que se podría aseverar que estas larvas no estaban infectadas por *Bd*. Esto es llamativo ya que fueron colectadas en el mismo cuerpo de agua con solo 2 meses de diferencia. En la misma fecha aproximadamente, se halló también un individuo de *H. pulchellus* (larva) con una infección grave de *Bd*, evaluada de la misma manera, en una charca muy pequeña (charca 0) situada a solo 200 metros de la charca B. Esta charca, al igual que la charca A y B, es temporaria, pero solo se hace presente durante períodos de abundantes precipitaciones; además tiene un diámetro de tan solo 20 m comparado con los 65 y 50 m de las otras dos charcas. Debemos destacar que la infección grave de la larva de *H. pulchellus*, se caracterizó por la presencia de linfocitos tanto en la dermis como infiltraciones en la epidermis. Berger *et al.* (2005c) describieron, en los casos hallados de infecciones graves, una posible respuesta inflamatoria leve con un ligero aumento en las células mononucleares en la dermis, pero que la inflamación en la epidermis es infrecuente, aunque Reeder *et al.* (2012) pudo observar linfocitos y neutrófilos en la dermis y ocasionalmente extendidos a la epidermis.

Por otro lado, en los muestreos realizados en el año 2006 y 2007, se colectaron solo 7 individuos, 3 de ellos fueron recogidos el mismo día, durante el muestreo por transectas, todos pertenecientes a la especie *P. minutus*, y en el mes de Octubre de 2006, mientras que en los meses anteriores no se encontraron individuos vivos, moribundos o muertos durante la realización de las transectas. Los 4 restantes individuos recogidos durante este muestreo, todos pertenecientes a la especie *L. latrans*, fueron capturados mediante el uso de trampas de pozo, entre junio y julio de 2007. De los 7 individuos solo se registró la presencia de *Bd* en 2 *L. latrans*, un juvenil y un adulto, (capturadas mediante trampas de pozo), colectadas en junio de 2007 y julio de 2007 respectivamente. El individuo adulto se encontró vivo mientras que el juvenil fue hallado muerto dentro de las trampas y ambos presentaron una infección de tipo leve.

Por lo tanto durante el muestreo por transectas de 8 meses de duración a lo largo de

dos años consecutivos solamente se registraron 3 individuos de *P. minutus* sin infección de *Bd*, en el mes de Octubre de 2006, mes en que se registran temperaturas entre 31,1°C y 7,6°C (Tabla 3, ANEXO I), siendo la temperatura máxima, una temperatura letal para este hongo (Piotrowski *et al.* 2004). Los individuos de *L. latrans* infectados con *Bd*, se encontraron en meses con temperaturas mensuales reinantes entre 20,0°C y 0,4°C (junio 2007) y 22,5 y 0,9°C (julio 2007), mientras que las temperaturas diarias de ambos días de captura fueron: 15,5°C (T. máx.)- 4,7°C (T. mín.) y 11,1°C (T. máx.)- 0,5°C (T. mín.) respectivamente (datos suministrados por el Departamento de Sismología e Información Meteorológica- FCAG- UNLP. Tabla 3 y 4, ANEXO I), todas temperaturas que no superan el límite máximo tolerado por el hongo para mantener su crecimiento (25°C; Longcore *et al.* 1999; Piotrowski *et al.* 2004).

Berger *et al.* (2004) realizaron un muestreo en toda la costa este de Australia desde Octubre a Noviembre durante 5 años desde 1996 a 2000, analizando individuos muertos o moribundos. Encontraron que la quitridiomycosis ocurría en todas las estaciones pero que había una incidencia significativamente mayor en invierno. También encontró individuos con otras enfermedades (causadas por bacterias, otros hongos, protozoos y helmintos), pero que prevalecían, contrariamente, en primavera y en verano, por lo que los autores demuestran que el aumento de la incidencia de la enfermedad en invierno, es específico de la quitridiomycosis y no un efecto sobre la incidencia de enfermedades en general. Los autores concluyeron, que ya que *Bd* es altamente patogénico, los efectos de los factores ambientales sobre su crecimiento deben ser los principales determinantes de la ocurrencia de la enfermedad. Alternativamente, la combinación de los efectos de la temperatura sobre *Bd* y la inmunidad de los anfibios debe causar el incremento en la virulencia de la quitridiomycosis a temperaturas bajas (Berger *et al.* 2004).

Por otra parte Drew *et al.* (2006), en otro estudio llevado a cabo en Australia, encontraron que la presencia de *Bd* es más probable en sitios donde la temperatura promedio máxima en verano es menor a 30°C.

A pesar de la cantidad de transectas realizadas durante dos años consecutivos y la adición de trampas de pozo en el área de estudio, y teniendo en cuenta que los muestreos se realizaron durante los meses en que las temperaturas medias no superan los 30 °C (datos suministrados por el Departamento de Sismología e Información Meteorológica- FCAG-

UNLP., Tabla 5, ANEXO I), temperatura máxima tolerada por este hongo quitridial (Piotrowski *et al.* 2004), la cantidad de individuos capturados fue significativamente baja. La presencia de *Bd* en esta área, fue determinada ya hace una década (Herrera *et al.* 2005), y desde ese momento nunca se han registrado mortalidades masivas en la región. Podemos plantear varias ilustraciones posibles que expliquen la escasa mortalidad que manifestaron los anuros del área de estudio.

La primera explicación podría ser la **baja altitud** a la que se encuentra el área de muestreo. Este pastizal se encuentra enmarcado en la provincia Fitogeográfica denominada “Provincia Pampeana” (Cabrera & Willink 1973) y se halla a unos 7 a 8 msnm. Walker *et al.* (2010), en un estudio que monitoreó la presencia de *Bd* a través de la península Ibérica, encontraron una fuerte relación entre altitudes elevadas y brotes fatales de quitridiomycosis. Por otro lado en Centro América, se registraron numerosos reportes de declinaciones de anfibios por encima de los 500 m de elevación (Young *et al.* 2001). Otros estudios en Centro América (Lips *et al.* 2003), encontraron que las poblaciones en declinación compartieron rangos altitudinales restringidos, entre otras características. Por lo tanto, estos datos podrían apoyar la primera explicación.

Contrariamente otros autores (Drew *et al.* 2006; Kriger & Hero 2008) no encontraron presencia entre la incidencia de *Bd* y la altitud. Más aún, Muths *et al.* (2008) encontraron mayores proporciones de individuos con *Bd* en los sitios de reproducción de las larvas de *Bufo boreas* en elevaciones bajas (1030 msnm) con relación a los sitios de altas elevaciones (3550 msnm).

Un segundo supuesto que podríamos plantear para explicar la condición del área de estudio, es que la **población lleva tiempo infectada**, ya se ha producido un proceso de declinación (detectado o no por el hombre) y los ejemplares que actualmente la componen poseen una cierta resistencia a la enfermedad (Retallick *et al.* 2004). Una condición similar concuerda con lo observado en *Litoria wilcoxii* (Kriger & Hero 2007) y en *Rana muscosa* y *R. sierrae* (Briggs *et al.* 2005) en las montañas de Sierra Nevada, California. Luego de una epidemia de *Bd*, los anfibios, a pesar de tener una disminución importante en el número de individuos, no desaparecieron por completo de la zona. Estas poblaciones, infectadas con *Bd*, son resistentes a la enfermedad; incluso, los adultos que presentan niveles bajos de infección, frecuentemente pierden y adquieren la enfermedad nuevamente (Briggs *et al.*

2005). La zona donde se realizó el muestreo, ha sido monitoreada intensamente por diferentes investigaciones desde el año 1998 (Natale 2006), y solo se han registrado algunos pocos individuos muertos de la especie *L. latrans* entre el año 2002 y 2004 (Natale com. pers.). Por lo cual es poco probable que la población haya estado sujeta a una declinación masiva en esta zona para adquirir luego una resistencia.

Otra posibilidad a plantear, podría ser que el **área no sea apropiada para el desarrollo del hongo**, por lo cual se desarrolle escasamente en la zona. Esto es refutable según los resultados de modelos de predicción de nicho realizados por otros autores (Ron 2005; Ghirardi 2011) en los que Buenos Aires se encuentra dentro de las provincias con condiciones ambientales más favorables para el desarrollo de *Bd* (con un índice de solapamiento $> 0,7$).

Por último, otra hipótesis para explicar este fenómeno podría ser la **baja prevalencia de este patógeno en el área de estudio**. En un muestreo realizado en Australia, Kriger *et al.* (2007b), encontraron que las ranas que se reproducían en cuerpos de agua permanentes eran significativamente más propensos a ser infectados que las que se reproducían en cuerpos de agua efímeros o hábitats terrestres, y las ranas que se reproducían en arroyos permanentes eran significativamente más propensos a ser infectados que las de charcas temporarios. En otra investigación Lips (1999) realizó muestreos mediante transectas en arroyos y transectas terrestres en el oeste de Panamá. Mientras en las transectas en arroyos encontraron 15% de los individuos capturados muertos, no encontraron ninguno en las transectas terrestres. Más tarde, en otro sitio de Panamá, donde se registró la presencia de *Bd*, se encontraron 340 anfibios muertos en las transectas realizadas en arroyos mientras que solo 6 en las transectas terrestres (Lips *et al.* 2006). Nuestros muestreos se realizaron mediante transectas terrestres y en las márgenes de charcas temporarias, que son las charcas que caracterizan a esta zona. Esto se podría relacionar con la necesaria vinculación del hongo quitridial con el medio acuático, donde completa su ciclo de vida y donde se propagan las zoosporas infectivas (Longcore *et al.* 1999); mientras que en suelo o la materia orgánica, *Bd* quedaría como estructura de resistencia (Kilpatrick *et al.* 2010).

En otro estudio realizado por Lips *et al.* (2003), encontraron que las poblaciones en declinación compartieron varias características, pero la variable más significativa fue el

índice de vida acuática. De las especies que se reproducen y habitan los pastizales de nuestra área de estudio, solo una de ellas (*Pseudis minutus*) posee hábitos acuáticos, las demás son especies netamente terrestres.

Por último, en un estudio de monitoreo intensivo, de Septiembre de 2009 a Mayo de 2010, realizado en la zona (por medio de trampas de pozo) por otro grupo de herpetólogos, encontraron mediante la técnica de hisopado, la presencia de *Bd* en todas las especies del área pero con niveles bajos de infección. Este nivel bajo de infección podría explicar la supervivencia de los individuos del área a pesar de estar infectados (Agostini *et al.* 2010).

Con respecto a la biología de las especies que resultaron infectadas con *Bd* en el área de estudio, cabe destacar que *H. pulchellus* tiene una amplia distribución que abarca el Litoral fluvial argentino, todo Uruguay y parte sur de Brasil y Paraguay (Kwet *et al.* 2004). Esta especie posee hábitos y características que favorecen la infección por el quitridio (Bosch *et al.* 2001; Bradley *et al.* 2002; Hopkings & Channing 2002) ya que se encuentra activa durante los meses fríos del año (López *et al.* 2011), sus larvas son de desarrollo lento (entre 2 y 6 meses, dependiendo del período de puesta) y pueden encontrarse en los cuerpos de agua durante un amplio período entre los meses de otoño e invierno (Lajmanovich 2000; Scarabotti 2005). *L. latrans* también poseen una amplia distribución; con poblaciones que son abundantes en muchos ambientes y sus larvas son gregarias, forman densas agrupaciones de renacuajos en las lagunas que habitan (Vaz-Ferreira & Gehrau 1975), hábito que favorecería la posibilidad de contagios durante la etapa larval, tanto en individuos de esta especie, como en otras especies con larvas acuáticas con las que comparten los cuerpos y cursos de agua (Rachowicz & Vredenburg 2004).

P. minutus, por su parte se encuentra en la cuenca del Río Salado en Buenos Aires, y en los ríos Paraná y Uruguay, se distribuye en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Entre Ríos (Manzano *et al.* 2004). *P. minutus* es una especie semiacuática, por lo que esta característica favorecería a esta población a declinar, ya que tiene un índice de vida acuática muy alto (Lips *et al.* 2003). Esta especie tiene tres períodos reproductivos, de julio a noviembre, de diciembre a enero, y de febrero a abril. Las larvas del primer período reproductivo mencionado pasan el invierno como tales, aumentando su crecimiento en tamaño aunque no su desarrollo (Manzano *et al.* 2004). Esta característica también favorece

su infección ya que permanece en el agua durante el período invernal, con temperaturas que favorecen la presencia de *Bd* (Berger *et al.* 2004; Drew *et al.* 2006).

Muestreo temporal por trampas de pozo (captura muerta)

En el área de muestreo, de los 51 ejemplares analizados, capturados mediante la técnica de trampas de pozo (captura muerta), durante Noviembre de 2004 a julio 2005, solamente 1 ejemplar perteneciente a la especie *L. latrans*, resultó con infección positiva para *Bd*. Los ejemplares fueron analizados mediante cortes histológicos de una muestra de piel del muslo y otra del vientre de cada ejemplar. Esta metodología se sabe puede subestimar la infección por *Bd*, y aunque se considera que se hicieron los suficientes cortes como para evaluar la presencia de *Bd* en los individuos, no se descarta que si se trató de una infección muy leve, pudiese no estar siendo representada a través de nuestro análisis. Este supuesto está apoyado por un estudio posterior realizado en la misma área, por Agostini *et al.* (2010), entre Septiembre de 2009 y Abril de 2010, en donde se registró, mediante hisopado de los individuos (y posterior identificación por PCR), la infección de *Bd* en todas las especies que habitan esa zona, pero con niveles muy bajos de infección. Esto podría estar desencadenado por lo anteriormente propuesto (baja altitud, especies con índices de vida acuática bajos, cuerpos de agua temporarios etc.). Cabe destacar que en el área de estudio, los únicos individuos que han registrado muertos en “condiciones naturales” (es decir sin el uso de dispositivos de captura), pertenecen a esta especie (*L. latrans*). A pesar de que en la zona se conocen que habitan por lo menos 14 especies de anuros (Natale, 2006). Cabe destacar que este ejemplar se encontró en un día del mes de Mayo con una temperatura máxima de 18,8°C y una mínima de 15,4°C (Tabla 3, ANEXO I), lo que corrobora la hipótesis de que el hallazgo se encuadra dentro de las temperaturas óptimas para el desarrollo del hongo quitridial (Longcore *et al.* 1999; Piotrowski *et al.* 2004).

Anuros de otras regiones

De los tres individuos analizados para la provincia de Misiones, solo uno resultó positivo para la presencia de *Bd*. El ejemplar, adulto, perteneciente a la especie *E. bicolor*, fue hallado en las márgenes de una charca temporaria originada a los costados de la Ruta

Nacional N° 12, en la ciudad de Posadas. Esta especie es un microhylido, pequeño, ovoide, ampliamente distribuido en Uruguay, Noreste de Argentina, Sureste de Brasil y Paraguay, y Sudoeste de Bolivia (IUCN 2010). Los apareamientos tienen lugar en charcas temporarias, tras fuertes lluvias (De la Riva *et al.* 1996; Rodrigues *et al.* 2003), constituyendo una especie con patrón reproductivo explosivo, según lo propuesto por Wells (1977). Esto conlleva necesariamente a un agrupamiento muy grande de individuos, lo que aumentaría necesariamente la probabilidad del contagio de *Bd*. Por otro lado, no es una especie acuática, se desarrolla en cuerpos de agua temporarios (De la Riva *et al.* 1996; Rodrigues *et al.* 2003), no es altamente específica de un hábitat, y no habita ambientes de altura (Lavilla *et al.* 2004), por lo que no comparte muchas de las características de anuros más propensos a declinar propuestas por otros autores (Lips *et al.* 2003; Williams & Hero 1998), aunque su pequeño tamaño podría contribuir a ser más susceptible a la infección y presentar infecciones más graves (Kriger *et al.* 2007). Este reporte, representa, junto con el de Ghirardi (2011), el registro más austral de *Bd* en la Ecoregión del Bosque (Selva) Paranaense (*sensu* Burkart *et al.* 1999). Esta eco-región es parte de un grupo de bosques húmedos subtropicales colectivamente conocidos como Bosque (Selva) Atlántico, el cual actualmente está reducido al 7 a 8 % de su tamaño original (Galindo Leal & Gusmão Câmara 2005). El Bosque Atlántico, considerado como uno de los cinco “hotspots” de la biodiversidad originalmente reportados para Sud América (Myers *et al.* 2000; Conservation International 2005), no solo alberga la diversidad más grande de anfibios en Argentina y Paraguay, sino que también es una de las áreas de batracios más ricas en Brasil (Brusquetti & Lavilla 2006; Cochran 1955; Ceï 1980). Misiones incluye todo el Bosque Atlántico remanente en Argentina (Giraudó 2005). Esta región se incluye entre las regiones con condiciones ambientales más favorables para el desarrollo de *Bd* (con un índice de solapamiento $> 0,7$, según Ghirardi 2011) según los resultados de modelos de predicción de nicho realizados por otros autores (Ron 2005; Ghirardi 2011). Este es el primer reporte para la Argentina de infección de *Bd* en el género *Elachistocleis* y representa el primero para la provincia de Misiones (Arellano *et al.* 2009).

En la provincia de Misiones analizamos también un individuo perteneciente a la especie *Scinax fuscovarius*, y uno de la especie *Melanophryniscus atroluteus*, ambos encontrados muertos a orillas de la Ruta Nacional N° 12. Los dos individuos presentaron

desprendimiento del estrato epidérmico durante la preparación del material histológico por lo que no se pudo comprobar la presencia de *Bd*. Esta característica puede darse durante la preparación del material para histología, cuando las muestras provienen de ejemplares que han sufrido un proceso de descomposición previo a su colección. O bien, podría también tratarse de una infección tan severa, que produzca la pérdida de la epidermis con la totalidad de los zoosporangios de *Bd* (Berger *et al.* 2005c).

En la Provincia de Jujuy se analizaron tres individuos, uno perteneciente a la especie *Telmatobius marmoratus*, que resultó negativo para la infección por *Bd*, y dos individuos de la especie *Hypsiboas aff. riojanus* de los cuales uno mostró evidencias de *Bd* en los cortes. Cabe destacar que Ghirardi (2011) sí detectó la presencia de *Bd* en adultos de *T. marmoratus* en la misma provincia, a sólo 65 km de distancia. Nuestro ejemplar se hallaba junto a los dos ejemplares de *Hypsiboas aff. riojanus*, de los cuales uno resultó con infección positiva para *Bd*. Los tres individuos fueron hallados muertos, por lo que podría esperarse que *T. marmoratus* también estuviera infectado y que la técnica utilizada como detección (histología) estuviese subestimando la infección en comparación con la técnica de PCR utilizada por Ghirardi (2011). Podemos agregar también que se encontraba a una altura de 3827 msnm, lo cual la hace mucho más susceptible a infecciones y a declinaciones ocasionadas por esta enfermedad. El individuo de *Hypsiboas aff. riojanus* infectado con *Bd* mostró una infección leve, lo cual puede deberse a la misma razón anteriormente mencionada acerca de la técnica utilizada. Debemos tener en cuenta que, debido a la altura en donde se la encontró, 3827 msnm, podría tratarse de una población más susceptible a declinar (Berger *et al.* 2004; Lips *et al.* 2003; Williams & Hero 1998). Este registro también coincide con las provincias con condiciones ambientales más favorables para el desarrollo de *Bd* (Ron 2005; Ghirardi 2011), con un índice de solapamiento $> 0,8$ (Ghirardi 2011). Cabe destacar que este es el primer registro de *Bd* para el género *Hypsiboas aff. riojanus* para la Argentina en la provincia de Jujuy. Hasta el momento se ha registrado la presencia de *Bd* en esta provincia en otros géneros como *Rhinella* y *Telmatobius* (Ghirardi 2011).

En la Provincia de Salta se analizaron 2 especies de larvas pertenecientes a las especies *Physalaemus* sp. (hallada en un pequeño curso de agua serrano) y *Rhinella* sp. (hallada en la margen del Río Caraparí). Sólo *Rhinella* sp. mostró evidencias de *Bd* en las

estructuras córneas del disco oral. Estos ejemplares no pudieron identificarse a nivel específico. Ambos sitios se hayan incluidos en las serranías de Tartagal, en el Departamento de San Martín, y fueron hallados a unos 612 msnm de altitud. Esta altitud no sobrepasa los 1000 metros, por lo cual no estaría dentro de las poblaciones más susceptibles citando acuerdo con algunos autores (Lips *et al.* 2003; Berger *et al.* 2004; William & Hero 1998). Lo que es muy destacable, es que esta zona no coincide con zonas de alta probabilidad para el desarrollo de *Bd* según Ghirardi (2011) y Röder *et al.* (2009), aunque Ron (2005) con menores puntos de evaluación (por lo tanto con un mayor margen de error), calcula la zona dentro de las áreas susceptibles.

Nuestro hallazgo se sitúa dentro del la Provincia Fitogeográfica de las Yungas (Cabrera 1994) en la provincia de Salta, justo en el límite con el chaco seco, lo que se denomina la Selva de Transición, que es la parte más baja con altitudes que van desde los 350 a los 500 msnm. Este ambiente forma un cordón que corre de norte a Sur y de Este a Oeste, desde el extremo norte de Salta, pasando por Tucumán y hasta el este de Catamarca (Cabrera 1994).

Los programas de modelado de nicho suelen tener un buen desempeño a la hora de modelar con datos de presencia (Phillips *et al.* 2006; Puschendorf *et al.* 2009). A pesar de ello, no hay que dejar de tener en cuenta que los modelos están sujetos a dos tipos claros de errores: errores de comisión (falsos positivos) y errores de omisión (falsos negativos). Los muestreos parciales o incompletos tienden a incrementar los errores de omisión, por lo que el nicho puede estar subestimado (Ghirardi 2011). Por lo que posiblemente la falta de muestreos en esa zona pueda estar llevando a una subestimación del nicho para la presencia de *Bd*. Otra explicación posible es que realmente las variables ambientales reinantes no sean las que el modelo toma como óptimas para el desarrollo de *Bd*. Las Yungas se caracterizan por un clima cálido y húmedo con precipitaciones estivales (700 a 1000 mm anuales) y heladas invernales, mientras que la selva Paranaense de Misiones (lugar propicio para el desarrollo de *Bd*) posee un clima cálido y húmedo con precipitaciones durante todo el año (que alcanzan los 2012 mm anuales) y una temperatura que varía entre 20 y 21°C con inviernos suaves y veranos no muy calurosos (Cabrera 1994). Esta diferencia tal vez en las variables ambientales (temperatura y precipitación), podría ser una explicación de porqué el modelo no está marcando esa zona como posible zona de desarrollo.

Finalmente en la Provincia de Buenos Aires se examinaron siete individuos de *Leptodactylus latrans*, todos con evidencias positivas de *Bd*. Cuatro de ellas fueron halladas en la Reserva Natural Integral Punta Lara, en las márgenes de una la ex Ruta Provincial 19 (localmente conocida como “Camino Negro”), y otro de los individuos proviene de un lugar muy cercano a la reserva, también hallado a la orilla del camino de acceso a la Isla Santiago. Otros ejemplares fueron hallados en La Balandra y en la localidad de Arturo Seguí.

Esta especie de anuro posee una amplia distribución desde el Norte de Sud América, incluyendo Colombia, Venezuela, Brasil, Bolivia, Paraguay, Uruguay hasta Argentina (en casi toda su extensión), y habita desde altitudes a nivel del mar hasta los 1400 msnm (Heyer *et al.* 2010). Esta amplitud de hábitats, le confiere una plasticidad ambiental muy importante y la hace muy susceptible a la infección por *Bd*. Como ya se mencionó anteriormente, el hábito gregario de sus larvas, favorecería la posibilidad de contagios durante la etapa larval, tanto en individuos de esta especie, como en otras especies con larvas acuáticas, con las que comparten los cuerpos y cursos de agua (Rachowicz & Vredenburg 2004). Por otro lado la zona de reporte coincide con las áreas predichas por los modelos predictivos de nicho, realizado por varios autores (Ghirardi 2011; Ron 2005; Röder *et al.* 2009), casi siempre con índices de probabilidad mayores a 0,7 (Ghirardi 2011). Es de especial importancia que cuatro de los individuos fueron encontrados dentro de una Reserva Natural Integral Punta Lara (RNIPL). Incluso uno de ellos (ind. n° 312) se registró en el sitio en el que el Camino Negro contacta un relicto de Selva Marginal que circunda el Arroyo Boca Cerrada en la RNIPL. Ésta comunidad constituye la etapa sucesional más evolucionada sobre el Río de La Plata. En cuanto al origen de su flora, la mayor parte de las especies arbóreas y herbáceas son de origen tropical y subtropical y su llegada a estas costas se debe en gran medida a las corrientes fluviales del Río Uruguay y en menor medida, a las del Paraná (Cóccaro *et al.* 1998).

En esta reserva podemos encontrar 16 especies de anuros, distribuidas en seis familias (Bufonidae, Ceratophryidae, Hylidae, Cycloramphidae, Leiuperidae y Leptodactylidae), lo que representa el 61,5% de la anfibiofauna de la provincia de Buenos Aires, según las distribuciones indicadas por Cei (1980), Lavilla *et al.* (2000) y las detalladas en el website: www.iucnredlist.org. De las 16 especies confirmadas, se ha

confirmado la actividad reproductiva de 15 de ellas, lo que indica que los ambientes protegidos por la RNIPL (principalmente los pastizales húmedos) son fundamentales para el desarrollo de poblaciones de anfibios, sobre todo si consideramos que se encuentra rodeada de grandes centros urbanos, siendo el área natural protegida más importante para la zona (Agostini *et al.* 2012). Según la categorización de anfibios y reptiles de la República Argentina (Lavilla *et al.* 2000), la RNIPL no cuenta con especies que se encuentren bajo alguna categoría de amenaza a nivel nacional, aunque *Ceratophrys ornata* ha sido calificada bajo la categoría de vulnerable a nivel provincial (Bertonatti 1994). Los ambientes protegidos por la reserva constituyen sitios propicios para el desarrollo de comunidades de anuros, representando una de las áreas con mayor diversidad de anfibios para la provincia de Buenos Aires (Agostini *et al.* 2012). Todos los individuos allí hallados fueron encontrados moribundos con notables signos de la enfermedad, aletargamiento, excesiva descamación del epitelio y reacción lenta a los estímulos. Aunque la infección, en todos los casos en los que se pudo determinar, fue leve y moderada.

Por otro lado en el camino de acceso al Balneario La Balandra, se halló un ejemplar de esta misma especie a orillas de la calzada. Este lugar se encuentra a solo 30 km de la RNIPL y se caracteriza por un mosaico ambiental representado por relictos de ambientes naturales nativos (pajonales, juncales, bosque en galería) con diferentes intrusiones exóticas, surcados por una nutrida red de cursos de agua menores tributarios del Río de la Plata (Pablo Grilli com. pers.). El individuo que se encontró a orillas del camino, presentaba también evidentes signos de la enfermedad, y una extendida infección, determinada como grave.

Por último, el ejemplar de *L. latrans* hallado en la localidad de Arturo Seguí, en la matriz suburbana, evidenciaba también signos de la enfermedad y una infección moderada.

Debemos subrayar que todos los individuos de *L. latrans* hallados en encuentros fortuitos, en la RNIPL, La Balandra y el barrio Arturo Seguí, fueron registrados en horarios diurnos o nocturnos deambulando cerca de los caminos y desorientados. Esta actividad no es propia de los anfibios, por lo que puede sugerirse que estaban bajo la influencia de los cambios de comportamiento que causa la quitridiomycosis en algunas especies de anuros (aletargamiento, desorientación etc.) y bajo ciertas condiciones ambientales.

Por último podemos destacar que los encuentros casuales de todo estos ejemplares en los distintos lugares del país, fueron registrados en distintos ambientes, desde la Selva de Transición de las Yungas, con clima cálido y húmedo, precipitaciones estivales y heladas invernales; la selva Paranaense de Misiones con un clima cálido y húmedo con precipitaciones durante todo el año (Cabrera 1994); la provincia Puneña, con clima frío y seco y gran amplitud térmica diaria y escasas lluvias (Cabrera 1994), hasta la Selva en Galería de Punta Lara.

Evidencia reciente sugiere que *Bd* podría ser capaz de producir una espora de resistencia a la desecación (Morgan *et al.* 2007). La habilidad de sobrevivir como saprófito y la producción de un estado de reposo podría incrementar el potencial de *Bd* de ocupar rangos más amplios de hábitats independientemente de la presencia o no de los anfibios (Hossack *et al.* 2009; Kilpatrick *et al.* 2010). Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto y habiendo nombrado las características de la Selva en Galería como transportador eficaz de semillas a través de las corrientes fluviales, podríamos suponer que una estructura de resistencia de *Bd* podría transportarse desde la Selva Paranaense de Misiones, hasta la Reserva de Punta Lara pasando por una variedad de ambientes.

La información presente hasta el momento sobre la relación de *Bd* y el ambiente está en constante incremento. Según demuestran numerosos estudios realizados en laboratorio (Longcore *et al.* 1999; Puschendorf *et al.* 2006; Berger *et al.* 1999, 2004), la temperatura óptima de crecimiento de *Bd* es de 23°C, crece bien a 16°C, sobrevive a 4°C, pero muere ante situaciones de desecación y a temperaturas mayores de 29°C (Longcore *et al.* 1999; Kilpatrick *et al.* 2010).

Complementariamente, Drew *et al.* (2006) encontraron que el hongo, para prosperar, necesita una temperatura media máxima de verano inferior a los 30°C, y que a valores superiores a esa temperatura se reduce su supervivencia. Otros tantos estudios han registrado la prevalencia de *Bd* en condiciones ambientales con temperaturas bajas (Berger *et al.* 2004; Kriger & Hero 2007).

Contrariamente Pounds *et al.* (2006) en un estudio a gran escala en América Latina, encontraron una relación significativa entre años cálidos y las extinciones a gran altitud de las ranas arlequín *Atelopus varius* (Bufonidae: *Atelopus*) en América Latina, e hipotetizaron que el calentamiento contemporáneo del clima, habría creado (en lugar de

disminuir) condiciones térmicas óptimas para *Bd*. A pesar de que los hallazgos de Kriger & Hero (2007), acerca de que la prevalencia y severidad de la quitridiomycosis se incrementa a medida que disminuye la temperatura, puedan parecer contradictorios a los hallazgos de Pounds *et al.* (2006), los dos estudios pueden reconciliarse si los miramos en un contexto dependiente de la altitud.

En el mismo trabajo citado anteriormente, Pounds *et al.* (2006) postulan que a menos de 1000 msnm y más de 3500 msnm las condiciones ambientales no serían propicias para que se den episodios de quitridiomycosis. Sin embargo, en un estudio más reciente, Seimon *et al.* (2007) estudiaron una población de anuros en la zona cordillerana de Perú, entre los 4500 y 5500msnm, en la que se han reportado retracciones de los glaciares. Los autores registraron expansión vertical de los rangos de distribución de las especies en respuesta al aumento de las temperaturas en zonas alpinas de alta montaña (Parmesan & Yohe 2003; Halloy *et al.* 2005) e indican claramente que ni las temperaturas muy por debajo del congelamiento ni las grandes variaciones diurnas, son factores limitantes para la patogenicidad *Bd*. Y que a pesar de que las temperaturas atmosféricas en las zonas Alpinas tropicales están muy por debajo de la ventana de crecimiento óptimo de *Bd*, el calentamiento solar intenso durante las horas del mediodía eleva temporalmente la temperatura del agua en los estanques poco profundos hasta dentro de este rango, incluso en alturas extremas alrededor de los márgenes de glaciares por encima de 5300 m (Seimon *et al.* 2007).

En muchos países, la mayoría de los reportes de *Bd* y declinación de anfibios se produjeron en altitudes mayores a 500 msnm (Young *et al.* 2001; Puschendorf *et al.* 2009). Inicialmente, estos y otros estudios han llevado a sugerir que *Bd* prospera preferentemente en latitudes correspondientes a regiones montañosas (Drew *et al.* 2006; Burrowes *et al.* 2008; Young *et al.* 2001; Puschendorf *et al.* 2009). Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, Kriger & Hero (2007) proponen en su trabajo que en altitudes bajas, el crecimiento de *Bd* esté probablemente limitado por las altas temperaturas del verano, que en muchas regiones tropicales y subtropicales debería alcanzar niveles letales para el hongo quitridial (de ahí la falta de extinciones de ranas arlequín de baja altitud en el trabajo de Pounds *et al.* (2006). Podemos esperar que el calentamiento global reduzca aún más los impactos de la quitridiomycosis en poblaciones de ranas a baja altitud en las regiones

subtropicales y tropicales. Sin embargo, en regiones montañosas y las tierras bajas de clima templado, las temperaturas máximas nunca pueden alcanzar niveles letales para las condiciones de vida de *Bd*. En cambio, el crecimiento del hongo puede ser limitado principalmente por las bajas temperaturas (10°C o menos) (Piotrowski *et al.* 2004). Se esperaría por lo tanto que el calentamiento en estas regiones, favorezcan al hongo quitridial y exacerben los descensos de las poblaciones de anfibios (Kriger & Hero 2007).

Por otro lado, se ha registrado a este hongo quitridial en regiones templadas cercanas a nivel del mar (Herrera *et al.* 2005; Carnaval *et al.* 2006) y también en regiones a 1600 msnm (Toledo *et al.* 2006) y 2400 msnm (Carnaval *et al.* 2006) sin evidencias de declinaciones poblacionales. Por lo tanto es todavía muy difícil establecer condiciones óptimas para el desarrollo de *Bd* en las diferentes regiones.

Aislamiento de la primera cepa de *Batrachochytrium dendrobatidis* en Argentina

Bd parasita la epidermis superficial, ocupando el estrato granuloso y córneo de la piel de anfibios anuros y urodelos (Berger *et al.* 1998; Pessier *et al.* 1999). En las larvas, *Bd* ocurre solamente en el disco oral de las mismas, ya que contiene el único epitelio queratinizado del cuerpo (Berger *et al.* 1998). Las larvas infectadas con *Bd*, suelen tener anomalías en el disco oral, como hileras de dientes deformadas o faltantes, pérdida de pigmento y aplastamiento de las células epiteliales. En nuestro análisis de los discos orales de las larvas de *H. cordobae* y *O. occidentalis*, identificamos anomalías de las estructuras orales queratinizadas que incluyeron falta de pigmentación en mandíbula superior e inferior, erosión del borde y pérdida del aserrado, y algunas veces pérdida de algún queratodonte. Según Rachowich & Vredenburg (2004), la pérdida de pigmentación comienza con "huecos" (es decir, una pérdida completa de pigmento en un área localizada de la vaina de la mandíbula completamente rodeada por áreas pigmentadas; una discontinuidad en la longitud del pigmento del pico oral) en las vainas de la mandíbula que se hace más grande con el tiempo hasta hacerse completa y que luego aparece la pérdida de pigmento en la fila de dientes. Por lo tanto nuestros resultados coinciden con una infección de grado avanzado en las larvas. Además de la identificación mediante el examen al

microscopio estereoscópico, determinamos la infección a través de la visualización directa de las estructuras del disco oral al microscopio óptico, dispuestas sobre un porta objeto, una modalidad que suele ser usada para estas identificaciones (Smith *et al.* 2007). Por otra parte, el examen de los preparados histológicos mostró también una infección severa, ya que se observaron muchos zoosporangios distribuidos en una capa de epidermis muy engrosada debido a la hiperqueratosis. También observamos capas de la epidermis distorsionadas, y erosiones focales en la piel con desprendimientos de capas del estrato córneo, estos resultados concuerdan con las observaciones de Berger *et al.* (1998; 2001) y Pessier *et al.* (1999).

El ciclo de vida de *Bd* es una progresión simple desde una zoospora hasta el organismo en crecimiento, conformado por el Talo unicelular, que produce un zoosporangio (que contiene zoosporas). El contenido del zoosporangio, se resuelve en nuevas zoosporas que salen del zoosporangio a través de una o varias papilas (tubos de descarga). No se ha observado reproducción sexual hasta el momento (Berger *et al.* 2005a). La duración del ciclo *in vitro* (que parece ser la misma que en la piel del anfibio) es de 4 a 5 días a 22°C (Berger *et al.* 2005a), aunque el 50% de las réplicas de los cultivos expuestos a temperaturas de 30°C por 8 días, no sobrevive (Piotrowski *et al.* 2004). Nuestro aislamiento mostró, que luego de 2 días de incubación a 23°C, las zoosporas habían sido liberadas hacia el medio de cultivo desde las estructuras orales, y que tres días después ya se observaban zoosporangios sobre el medio de cultivo, lo cual concuerda con lo anteriormente expuesto por Berger *et al.* (2005a). Las colonias crecieron como grupos de zoosporangios granulares sobre la placa, con un color blanquecino con forma de cono de terminación casi en punta, característica que también coincide con las observaciones de Berger *et al.* (2005a).

La caracterización morfológica de nuestra cepa MLA1 dio como resultado zoosporangios que variaron entre 10,22 hasta 51,1 μm de diámetro, conteniendo 1 o 2 tubos de descarga, mientras que otros autores caracterizaron zoosporangios de más de 30 μm y con 1 a 3 tubos de descarga (Pessier *et al.* 1999) o más de 40 μm y 1 o varios tubos de descarga (Longcore *et al.* 1999). Por otro lado la cepa JEL 423 (cepa aislada de anuros de Panamá) presentó zoosporangios que variaron entre 10,22 a 45,99 μm con la presencia de 1 a 6 tubos de descarga.

Fisher *et al.* (2009), en un estudio con varias cepas de *Bd*, analizaron la relación genética entre los aislamientos, la variación fenotípica entre aislamientos y la virulencia de los distintos aislamientos en el sapo común europeo, *Bufo boreas*, entre otras cosas. Los resultados mostraron una relación entre el tamaño del zoosporangio y las regiones geográficas, aquellos aislamientos provenientes de Mallorca (España), producían, en promedio, zoosporangios significativamente más pequeños que los de otras regiones (España peninsular y el Reino Unido). Y que el diámetro de los zoosporangios estaba correlacionado positivamente con la distancia genética entre las cepas. Este resultado muestra que a medida que los aislamientos se alejan más genéticamente, existe una tendencia creciente a que sus zoosporangios varíen en tamaño (Fisher *et al.* 2009). También mostraron que los aislamientos de Mallorca produjeron significativamente más zoosporas en relación al tamaño de sus zoosporangios, que los aislamientos de España peninsular y el Reino Unido. El resultado de las infecciones con las distintas cepas demostró que los aislamientos de España peninsular y el Reino Unido eran más virulentos que los de Mallorca. Como citaron Fisher *et al.* (2009) “Los modelos matemáticos han demostrado que el aumento de la producción de zoosporas por *Bd* aumenta la fuerza de la infección en poblaciones naturales y por lo tanto aumenta la cantidad de mortalidad en las poblaciones (Mitchell *et al.* 2008)”. Pero en el estudio de Fisher *et al.* (2009) las cepas que produjeron más zoosporas (Mallorca) fueron las menos virulentas.

En nuestro caso, el tamaño de los zoosporangios de la cepa argentina (MLA1) fue significativamente mayor al los de la cepa panameña (JEL 423). Esta diferencia de tamaño, podría, en primer lugar, estar confirmando una distancia genética entre las cepas (demostrada en los estudios genéticos en este mismo trabajo); en segundo lugar que la cepa panameña (de zoosporangios más pequeños) sería productora de más cantidad de zoosporas; y en tercer lugar, que la cepa autóctona sería en este caso más virulenta que la foránea.

Secuenciación y genoma de *Batrachochytrium dendrobatidis*

Una de las hipótesis de la aparición de la quitridiomycosis en diferentes regiones, es la reciente introducción humana de este hongo dentro de poblaciones naive (Berger *et al.* 1999; Daszak *et al.* 1999). Alternativamente, o en conjunto, el cambio climático o los contaminantes pueden haber alterado una relación huésped-parásito preexistente (Daszak *et al.* 2000; Blaustein & Kiesecker 2002), causando así la mortalidad de las poblaciones. La predicción para una enfermedad que ha surgido a causa de la reciente introducción o translocación, es la de una población con una estructura poblacional geográfica no determinada y con una diversidad genética global menor que la que se encontraría si la enfermedad hubiese surgido debido a factores extrínsecos tales como los cambios ambientales (Morehouse *et al.* 2003). Estudios previos de *Bd*, han sugerido baja variabilidad genética del patógeno y una amplia dispersión de genotipos de *Bd* estrechamente relacionados (Morehouse *et al.* 2003; Morgan *et al.* 2007, citado por James *et al.* 2009).

Dos hipótesis explican cómo *Bd* puede haberse extendido en todo el mundo pero que aún no se han probado (James *et al.* 2009). Una de ellas postula que la enfermedad se originó en África, siendo, a partir de entonces, transportada a través de la difusión intercontinental de *Xenopus laevis* para acuarios, la investigación científica y las pruebas de embarazo (Weldon *et al.* 2004). Una segunda hipótesis propone que la enfermedad se propagó a través de expansiones tanto intencionales como no intencionales de la rana toro de Norte América, *L. catesbeianus* hacia el resto del mundo (Fisher & Garner 2007). Aunque el hallazgo de *Bd* en regiones inhóspitas donde recientemente ha llegado el hombre (Cordillera de Vilcanota en Perú, a 5348 msnm, Seimon *et al.* 2007), descarta estas dos teorías.

Análisis previos, basados en MLST (genotipado de “multilocus” de la secuencia) muestran relativamente baja variabilidad genética entre aislamientos provenientes de varios países (Morehouse *et al.* 2003; James *et al.* 2009). Morehouse *et al.* (2003), encontraron además, que en general las cepas obtenidas de la misma localidad aparecían dentro de un mismo agrupamiento según su genotipo, pero que curiosamente, dos cepas panameñas y tres australianas, compartían el mismo grupo con una alta relación genética, y provenían de

dos áreas que habían implicado descensos en poblaciones de anfibios debido a la quitridiomycosis (Berger *et al.* 1998). James *et al.* (2009) también encontraron que cepas de las mismas regiones geográficas mostraban una tendencia a agruparse, pero que también se observó una estrecha asociación entre una cepa de España y cepas de Estados Unidos. El estudio expuesto en este trabajo (Rosemblum *et al.* 2012), basado en la secuenciación del genoma, que incluye nuestro aislamiento (MLA1), muestra también un grupo dentro del árbol que se destaca, pues dentro de un agrupamiento que contiene a 15 cepas norteamericanas, se encuentra nuestra cepa MLA1 proveniente de Argentina. Por lo cual esta cepa estaría dentro de un grupo con genotipo “norteamericano”.

El hallazgo de una alta relación genética entre cepas de Panamá y Australia, en los estudios de Morehouse *et al.* (2003), argumenta en favor de la dispersión o reciente introducción del patógeno en estas dos áreas de disminución de las poblaciones de anfibios (Morehouse *et al.* 2003). En el análisis mostrado en el presente trabajo (Rosemblum *et al.* 2012) la relación entre nuestra cepa autóctona MLA1 y varias cepas provenientes de Estados Unidos, podría deberse a una reciente dispersión del hongo patógeno en estas dos zonas. Ya que nuestra cepa fue aislada de una población de anuros ubicada en una laguna de altura perteneciente a una Reserva Natural Estricta, la hipótesis de una introducción por parte del hombre es poco probable. Pero con los nuevos hallazgos de la posibilidad de transporte en las escamas de las patas de las aves (Garmin *et al.* 2012), sería mucho más lógico pensar que el hongo pudo haber llegado allí albergado en las patas de algún ave acuática.

En el estudio expuesto en este trabajo (Rosemblum *et al.* 2012), basado en el genoma completo de las cepas (que incluye nuestro aislamiento MLA1), se revela que no existe relación geográfica o de hospedante entre las cepas analizadas. Estudios previos basados en la secuencia del genoma (genotipado de “multilocus” de la secuencia, MLST) también mostraron un escaso efecto de los hospedantes sobre la relación de los patógenos, sugiriendo que no hay especificidad de huésped en los genotipos del patógeno (James *et al.* 2009). El patrón geográfico (aunque leve) más que el del hospedante, confirma los resultados de diversos estudios de campo que muestran que *Bd* es un patógeno que se somete a una rápida proliferación local con baja especificidad de huésped (Daszack *et al.* 2003; Lips *et al.* 2008; Bosch & Rincon 2008, citado por James *et al.* 2009).

James *et al.* (2009) y Morehouse *et al.* (2003), vieron que a pesar de que había una tendencia de cepas de las mismas regiones geográficas a agruparse juntas, el estudio no mostró un patrón global de distribución genotípica, pues muchas otras cepas estaban distribuidas aleatoriamente en el árbol. En el análisis mostrado en este trabajo (Rosemblum *et al.* 2012) también se llegaron a esos resultados, pero vuelve a visualizarse una alta relación entre la cepa MLA1 y un grupo de cepas de origen norteamericano.

Si *Bd* ha sido recientemente dispersado a partir de un origen geográfico determinado o a partir de una población huésped determinada, entonces, se esperaría que la población de origen albergara mayor diversidad genética que las poblaciones en las que el patógeno se estableció recientemente, pero esta hipótesis no se ha comprobado aún. Por otra parte, si *Bd* ha sido estocásticamente transmitido de una región a otra a través de la dispersión por largas distancias, entonces cada introducción es probable que haya causado un concurrente cuello de botella en la diversidad genética (James *et al.* 2009). En general los estudios que demuestran esta variación genética extremadamente baja proporcionan un fuerte apoyo para la hipótesis del patógeno nuevo sobre la del patógeno endémico. Hipótesis que también está sustentada por la ausencia de un patrón geográfico amplio (James *et al.* 2009).

Bioensayos de Laboratorio

Cálculo de la concentración infectiva de zoosporas/ml y tiempo de exposición

A los dos días del inicio del ensayo, se registró, solamente un individuo muerto durante todo el experimento. El individuo pertenecía al tratamiento que combinaba la concentración máxima (6×10^4) con el tiempo de exposición máximo (3 días).

Los cortes histológicos de la piel, no evidencian zoosporangios de *Bd* en ninguno de los tratamientos, pero estos sí fueron evidentes en las mudas de piel extraídas de los recipientes durante el ensayo. Estos resultados son consistentes con los de Davidson *et al.* (2003), quienes, en un bioensayo con la salamandra *Ambystoma tigrinum*, no encontraron zoosporangios de *Bd* en los exámenes histológicos mientras que sí fueron visibles en las

pieles descamadas analizadas. Por lo tanto podemos asegurar que esta especie es **susceptible** a la infección por *Bd*.

El análisis de la presencia de estas mudas en los distintos tratamientos evidenció diferencias significativas entre la máxima concentración y el resto de las concentraciones y también con el grupo control. Respecto al tiempo de exposición, también se encontraron diferencias entre el tiempo máximo y los restantes dos tiempos. Esto indica que tanto la concentración de zoosporas a la que son expuestos los individuos como el tiempo durante el cual se los expone, son factores influyentes en la infección de los ejemplares. Carey *et al.* (2006), en un ensayo con *B. boreas* en el que los individuos fueron infectados con tres concentraciones y tres tiempos de exposición concluye, que la dosis inicial a la que son expuestas las ranas así como el tiempo de exposición, tienen efectos significantes en el número de individuos infectados y la cantidad de días que sobreviven.

La escasa mortalidad registrada en *R. fernandezae* puede insinuar una resistencia de la especie con respecto a la infección de *Bd*. Se considera que la concentración máxima de zoosporas utilizadas en la infección fue suficiente como para infectar y causar mortalidad en los individuos. Carey *et al.* (2006) utilizaron, en un experimento con *B. bufo* tres concentraciones, de las cuales la máxima fue de 10^6 zoosporas en 20 ml de solución Holtfreter, o sea una concentración final de 5×10^4 zoosporas /ml que produjo la muerte de todos los individuos expuestos al final del bioensayo, mientras que la nuestra fue de 6×10^4 zoosporas/ml.

El hecho de que los individuos hayan mudado en exceso desde el inicio del bioensayo, que se hayan encontrado evidencias de *Bd* en estas mudas de piel, que no se hayan evidenciado zoosporangios en los cortes histológicos y la escasa mortalidad registrada, puede deberse a un rápido recambio de la piel de estos individuos como respuesta a la infección. Davidson *et al.* (2005) sugirieron que la rápida y frecuente respuesta de descamación del epitelio de la salamandra *A. tigrinum*, durante el ensayo de infección con *Bd*, puede contribuir a su habilidad para reducir o evitar la infección. Sin embargo a bajas concentraciones de zoosporas no todos los individuos en el ensayo de Carey *et al.* (2006) se infectaron; parece que una proporción relativamente alta (96-99%) de las zoosporas presentes en las proximidades inmediatas de los individuos no colonizan con éxito a los ejemplares durante un período de 24 horas (Carey *et al.* 2006). También indican

que para que se produzca mortalidad en los individuos, la infección debe alcanzar un umbral para causar la muerte de los individuos. Tal vez cada especie necesite un umbral diferente, y el caso de *R. fernandezae* tendría que evaluarse con otras concentraciones. En este caso consideraríamos a esta especie como **poco sensible** a la infección por *Bd*, en laboratorio.

Las mudas de piel con evidencias de *Bd* fueron encontradas 5 días posteriores al inicio de la exposición, evidencias que coinciden en mayor medida con lo observado por Davidson *et al.* (2003) en los ensayos realizados con la salamandra *R. yavapaiensis* y *R. boylei*, en los que registraron zoosporangios de *Bd* en las mudas a los 4 días de la exposición. También observó que de las 19 ranas expuestas de ambas especies que murieron durante el experimento, sólo uno tenía claras evidencias de infección en el examen histológico, y que sólo tres de las ranas expuestas que sobrevivieron exhibieron algún zoosporangio de *Bd* (Davidson *et al.* 2003).

Debido a que *Bd* infecta sólo la capa queratinizada exterior de la piel, los péptidos antimicrobianos puede ser la principal defensa de los anfibios contra estos patógenos. Rollins-Smith *et al.* (2005), mostraron que las zoosporas de *Bd* eran sensibles a ciertos péptidos antimicrobianos producidos en la piel de algunos anfibios. Por otra parte, otros estudios demuestran que diversas especies de bacterias que habitan la pieles de dos especies de salamandras (*Plethodon cinereus* y *Hemidactylium scutatum*) inhiben el crecimiento de los hongos, incluyendo el patógeno *Bd* in vitro (Harris *et al.* 2006)

Woodhams *et al.* (2007b) demostraron que una población de *R. sierrae* que había estado conviviendo con *Bd* durante más de 6 años, tenía una proporción significativamente mayor de especies bacterianas anti-*Bd* que una población de *R. muscosa* que se extinguió un año después de la llegada de *Bd*. Lam *et al.* (2010) por su parte, encontraron una población con una alta proporción de individuos con bacterias anti-*Bd* que estaba libre de *Bd* al momento del relevamiento, y un año después registraron la presencia de *Bd* en esa población que se encontraba coexistiendo y persistiendo con el hongo. Poca información existe acerca de los péptidos antifúngicos que producen los anfibios autóctonos de la Argentina (Siano *et al.* 2010; Sanchez *et al.* 2003), así como de las bacterias con las que cuentan las especies estudiadas, pero seguramente es una posibilidad para elucidar el porqué de la resistencia de esta especie.

Los cambios de comportamiento registrados, se mantuvieron durante el tiempo de exposición y se atenuaron pasado este tiempo. La gran cantidad de descamación de la epidermis (muda), el aletargamiento, la reacción lenta a los estímulos entre otros, coinciden en mayor medida con los de estudios previos (Nichols *et al.* 2001; Lamirande & Nichols 2002; André *et al.* 2008). Cabe destacar que el único individuo que se registró muerto en el bioensayo se encontraba boca arriba, tieso, con los miembros anteriores hacia adelante y las glándulas parótidas hinchadas y con secreción. Esto último puede deberse a la secreción de sustancias atífungicas por parte de las glándulas parótidas ante la presencia de *Bd*. También se registró una respiración agitada en los individuos expuestos, esto podría explicarse si tenemos en cuenta la hipótesis de que *Bd* produce la muerte de los anfibios mediante el bloqueo del intercambio de oxígeno a través de la piel, entonces la ventilación de los pulmones se incrementaría. Contrariamente a esto Carey *et al.* (2006) encontraron que la respiración de los individuos expuestos era más lenta que la de los individuos control.

Aunque las interacciones entre las zoosporas y los anfibios pueden diferir en la naturaleza y en el laboratorio, las mediciones experimentales del número de zoosporas necesario para iniciar una infección fatal y la cantidad de tiempo de exposición necesaria para que ocurra la infección, constituyen pasos valiosos en la comprensión de estos fenómenos en la naturaleza (Carey *et al.* 2006).

Estudio de la sensibilidad de las distintas especies

Bioensayo con adultos

Bioensayo 1

De las cinco especies utilizadas en este bioensayo, solo una, *P. falcipes*, presentó mortalidad en su grupo control, el resto de los controles continuaron sin registro de mortalidad hasta el final del bioensayo. De las especies ensayadas que presentaron mortalidad en su grupo tratamiento (*H. pulchellus*, *P. falcipes* y *S. squalirrostris*), solo *S. squalirrostris* presentó diferencias significativas entre el grupo tratamiento y el control. Respecto al TMS, fue el mismo para *S. squalirrostris* y *P. falcipes* (4,33 días) y un poco mayor para *H. pulchellus* (4 días), aunque las dos especies anteriormente mencionadas

experimentaron mortalidad más tempranamente que *H. pulchellus*, pero más equitativamente repartida en el tiempo. Por otra parte *R. fernandezae*, *O. americanus* y *L. latinasus* no presentaron mortalidad durante el desarrollo del bioensayo, volviéndose a confirmar la hipótesis de una **sensibilidad escasa o una relativa resistencia** de la especie *R. fernandezae* a la infección por *Bd*. Woodhams *et al.* (2006) encontraron que las especies de Bufónidos, *Atelopus varius* y *B. boreas*, tenían en la piel péptidos que no eran tan efectivos contra *Bd*, inhibían el crecimiento de *Bd* pero no producían su muerte, lo que hacía a estas especies mucho más sensibles a la infección por *Bd*. Por otro lado Stuart *et al.* (2004) cita a la familia Bufonidae como una de las cuatro familias de anfibios que tienen un número significativamente mayor de especies de “disminución rápida” que la media para todos los anfibios. A pesar de lo expuesto, nuestros resultados sugieren lo contrario.

Respecto a las otras dos especies, no hay otros estudios hasta hoy que demuestren la sensibilidad de estas especies a la infección por *Bd*, por lo que podríamos sugerir que *O. americanus* y *L. latinasus* también poseen una sensibilidad escasa a la infección por *Bd*. Pero lo que sí podemos asegurar es que todas las especies aquí ensayadas, excepto *S. squalirrostris* en la que no pudo confirmarse la infección, son susceptibles a la infección por el hongo, ya que mediante alguna metodología, los zoosporangios de *Bd* fueron confirmados en las pieles de estas especies. La mayoría de los individuos de *S. squalirrostris* exhibieron pérdida del estrato epidérmico, por lo que la infección no pudo confirmarse; Woodhams *et al.* (2007a) revelaron la pérdida del estrato córneo en una de las especies evaluadas con *Bd*.

De las 4 especies del grupo tratamiento que presentaron mudas de piel con evidencias de *Bd* en los recipientes durante el bioensayo (*H. pulchellus*, *O. americanus*, *L. latinasus* y *P. falcipes*), *O. americanus* fue la única en la que se registraron grandes cantidades de piel y en todas sus réplicas. Tal vez esto tenga relación con lo que sugieren Davidson *et al.* (2003) acerca de tratar de evitar la infección mediante este mecanismo. Adicionalmente, los cortes histológicos de esta especie no revelaron zoosporangios de *Bd* en las pieles, aunque más estudios deberían realizarse para confirmar esta suposición.

Los individuos de las especies de *R. fernandezae* y *O. americanus* se mostraron aletargados y con lenta capacidad de reacción, hecho que coincide para *R. fernandezae* en el ensayo mencionado anteriormente (referente al Cálculo de la concentración infectiva de

zoosporas/ml y tiempo de exposición). En *O. americanus* los ejemplares se frotaron constantemente los miembros anteriores y posteriores contra el cuerpo, lo que podría estar demostrando una incomodidad en la piel causada por la presencia del hongo. En este bioensayo también se observó el agua (suspensión) de los recipientes del grupo tratamiento más turbia y con trozos de piel (muda) muy pequeños al contrario del grupo control, hecho tal vez relacionado al mayor recambio de las capas de piel como reacción a la presencia de *Bd*. Esta misma característica también fue observada por Nichols *et al.* (2001). Otro comportamiento registrado fue que los individuos de las especies *S. squalirrostris* y *P. falcipes*, que murieron durante el bioensayo, presentaron ambos miembros traseros estirados y los miembros anteriores contra el cuerpo, síntoma característico de individuos infectados por *Bd* (Symptoms of the disease caused by *Bd*. IUCN SSC ISSG).

Searle *et al.* (2011) realizaron un bioensayo con 6 especies de anfibios (tres pertenecientes a la familia Hylidae, dos a Ranidae y una a Bufonidae), manteniendo una misma concentración de zoosporas para la exposición: $2,6 \times 10^5$ zoosporas total por individuo (concentración que se asemeja a la usada en nuestros ensayos). Los autores encontraron que *Anaxyrus terrestris* (Bufonidae) y *Lithobates sylvaticus* (Ranidae) experimentaron las mayores tasas de mortalidad comparado al resto de las especies.

Los resultados de otros estudios también sugieren que los sapos como *A. boreas* podrían ser más susceptibles a *Bd* que otras especies (Blaustein *et al.* 2005; Garner *et al.* 2009). Davidson *et al.* (2003) exponen también que *Bd* sería más letal en dendrobátidos y bufónidos que en ránidos. En nuestro bioensayo, la especie más sensible resultó ser *S. squalirrostris* (familia Hylidae), luego *P. falcipes* (familia Leiuperidae) y por último *H. pulchellus* (familia Hylidae), mientras que las especies *O. americanus* (Cicloramphidae), *R. fernandezae* (Bufonidae) y *L. latinasus* (Leptodactylidae) no presentaron mortalidad durante el bioensayo. Aunque de la mayoría de las especies (y familias de anuros) aquí evaluadas no se tienen conocimientos previos acerca de su susceptibilidad a la infección por el hongo, nuestros resultados respecto a la especie de la familia Bufonidae (*R. fernandezae*) resistente a la infección, y la familia Hylidae (*H. pulchellus* y *S. squalirrostris*) sensibles a la infección, no coinciden con estudios previos. A pesar de ello, deberían realizarse estudios más complejos para confirmar la sensibilidad/resistencia de las especies autóctonas a la infección por el hongo patógeno.

Carey *et al.* (2006), mediante ensayos de infección, observaron que, dentro de la misma especie, los individuos más grandes sobrevivían más tiempo que los más pequeños. Searle *et al.* (2011) también observaron una relación entre el tamaño del cuerpo de los individuos y los niveles de infección, siendo menor en los individuos de mayor tamaño en la mayoría de los casos. Kriger *et al.* (2007) en un muestreo de campo, también encontraron que las ranas pequeñas tenían mayor probabilidad de infección e infecciones más intensas que las ranas de mayor tamaño. Es probable que la infección del hongo deba alcanzar un umbral específico en los individuos, para poder causar la muerte en los mismos (Carey *et al.* 2006), y es también probable que ese umbral sea diferente para las distintas especies. Contrariamente, Bancroft *et al.* (2011) evaluaron la relación de muchas características de las especies de anfibios con la probabilidad de infectarse con el hongo y encontraron que las especies con tamaños mayores son más susceptibles a la infección por *Bd*. Aunque no se evaluó una relación entre masa y mortalidad en este trabajo, puede observarse coincidentemente con algunos autores (Kriger *et al.* 2007; Carey *et al.* 2006), que dentro de las especies sensibles, las especies de menor tamaño tuvieron mortalidades más tempranas que las de mayor tamaño.

Muchos ensayos han demostrado sensibilidades diferentes entre especies (Woodhams *et al.* 2007a; Searle *et al.* 2011; Blaustein *et al.* 2005). Estas diferencias pueden deberse a los ya mencionados péptidos antifúngicos de la piel de los anfibios (Rollins-Smith *et al.* 2005) o las bacterias simbiotas (Harris *et al.* 2006; Woodhams *et al.* 2007b; Lam *et al.* 2011), sin embargo muchas características de las especies pueden hacerlas más susceptibles y más sensibles a la infección por *Bd*. En el estudio de Bancroft *et al.* (2011) las especies de mayor tamaño, las pertenecientes a las familias Ranidae y Salamandridae, las especies que depositan sus huevos en hábitats acuáticos y en grandes aglomeraciones, y las especies dependientes del agua en algún estadio de su ciclo de vida por ejemplo, son más susceptibles a la infección por *Bd*.

Bioensayo 2

En este bioensayo la especie *H. pulchellus* presentó la mayor sensibilidad a la infección por *Bd*, sufriendo un 80% de mortalidad en el grupo tratamiento a los **5 días** del

inicio del bioensayo (momento que coincidió con la mortalidad del 10% en el grupo control), mostrando diferencias significativas entre la supervivencia del grupo tratamiento y el control. Mientras que *P. minutus* registró solo un 20% de mortalidad en el grupo tratamiento un día después (coincidente con 10% mortalidad en el grupo control) y sin diferencias significativas en la supervivencia. Los TMS sin embargo, fueron iguales para ambas especies (4 días) y coincidente con el TMS de *H. pulchellus* en el Bioensayo 1. Por último *L. latrans* no presentó mortalidad en ninguno de los grupos durante un período de 13 días. Pero debe destacarse que mientras en *H. pulchellus* y *P. minutus* no se registraron mudas en ningún momento en los recipientes, en *L. latrans* se registraron abundantes cantidades desde el día 5 del inicio del tratamiento y con evidencias de *Bd*. Ya que el ensayo de *H. pulchellus* finalizó a los 5 días de su inicio y el de *P. minutus* a los 6 días, si esperamos que la muda esté relacionada con el tiempo de infección, deberían haber presentado descamación del epitelio en esos días. Por otro lado, las dos especies que sufrieron mortalidad, no evidenciaron ningún zoosporangio de *Bd* en las muestras histológicas, pero *L. latrans*, luego de un período de 13 días presentó zoosporangios en casi todas las muestras de piel analizadas. La ausencia de evidencias de infección en las pieles de *H. pulchellus* y *P. minutus* puede tratarse de falsos negativos en el método utilizado para la evaluación de la infección. Sabiendo que *Bd* tiene un tiempo de crecimiento in vitro de 4 días (Longcore *et al.* 1999; Piotrowski *et al.* 2004), entonces estas especies habrían tenido el tiempo mínimo para adquirir una infección tal que pueda ponerse de manifiesto con la técnica histológica. Si nos referimos al Bioensayo 1, *H. pulchellus* mostró evidencias de *Bd* en los cortes histológicos en individuos que sobrevivieron 11 días. Si estas especies hubieran exhibido mudas de piel en sus recipientes tal vez la infección hubiese sido visible aunque escasa, ya que en el Bioensayo 1, *P. falcipes* mostró evidencias de *Bd* a los 5 días del inicio del bioensayo en sus mudas de piel. De haberse infectado, *H. pulchellus* y *P. minutus* tendrían una infección muy leve, por lo cual podríamos inferir que no fue la infección del hongo *per se* la causante de la mortalidad en estas especies. Existen dos hipótesis acerca de la manera en que *Bd* produce la muerte en los individuos: una sugiere que el hongo produce toxinas letales dentro del individuo, mientras la otra sugiere que la infección interrumpe las funciones normales de la piel, afectando la respiración y la osmoregulación (Berger *et al.* 1998). Estos dos mecanismos pueden actuar en combinación

(Daszak *et al.* 1999). Por lo tanto tendríamos que hablar en este caso, de la primera hipótesis, la de una posible o posibles toxinas letales para estas especies, pues al estar ausente la infección o al ser casi imperceptible, no podemos hablar de mecanismos de respiración y osmoregulación interrumpidos por una hiperqueratinización del epitelio.

L. latrans no sufrió mortalidad durante 13 días, a pesar de verse evidenciada su infección tanto en los cortes histológicos como en las mudas de piel. Esto sugiere una resistencia, o una escasa sensibilidad de esta especie a la infección por *Bd*. Esta diferencia de sensibilidad de esta especie con respecto a las otras dos en este ensayo, puede deberse a muchas razones. Siano *et al.* (2010) encontraron que la piel de *L. latrans* contenía péptidos que inhibían el crecimiento de una cepa de *Mycobacterium tuberculosis*. Por lo tanto deberían evaluarse éste y otros péptidos contra *Bd* en muchas especies. De igual manera deberían evaluarse las bacterias simbiotas (Harris *et al.* 2006; Woodhams *et al.* 2007b; Lam *et al.* 2011) presentes en la piel de estas especies. Si hablamos de la biología de las especies y su susceptibilidad a la infección por *Bd*, podríamos pensar que *P. minutus*, una especie semiacuática, debería ser la más sensible de este grupo, ya que numerosos autores hablan de que el índice de vida acuática influye de manera considerable en la susceptibilidad a la infección por *Bd* (Lips *et al.* 2003; Brancroft *et al.* 2011). Contrariamente *H. pulchellus* muestra, marcadamente, ser más sensible.

También debemos destacar que los síntomas característicos de la enfermedad, aletargamiento y reacción lenta, fueron presentados por las tres especies evaluadas, lo que sugiere que no es necesaria una infección grave para que los síntomas se hagan evidentes. Seguramente la misma toxina que la hipótesis sugiere como letal, traería aparejados los cambios en el comportamiento, que luego serían acentuados con los efectos de la hiperqueratinización del epitelio.

Por último cabe poner de manifiesto que uno de los dos individuos del grupo tratamiento de *P. munitus* que murieron, presentó los miembros posteriores estirados, hecho que coincide nuevamente con los síntomas de la infección de *Bd* citados por la ISSG (Invasive Species Specialist Group).

Ya que la cepa utilizada en estos bioensayos (JEL 423) ha sido probada en otras especies produciendo síntomas de la enfermedad (Becker and Harris 2010), y mortalidad en especies como *Litoria caerulea* (Branelly in rev. citado por Branelly *et al.* 2012), nuestros

resultados sugieren a *L. latrans* como una posible “especie reservorio” pudiendo de este modo convivir con infecciones considerables sin sufrir mortalidad y por ende transmitiendo el hongo a otras especies, que como vimos, son más sensibles a este patógeno.

Bioensayo con larvas

Bioensayo 3

De las cuatro especies evaluadas en este bioensayo, *R. fernandezae*, *S. squalirrostris*, *H. pulchellus* y *L. latrans*, las dos primeras sufrieron una mortalidad total en su grupo tratamiento a los 2 días del inicio del bioensayo, mientras que *L. latrans* e *H. pulchellus* alcanzaron entre 5 y 7 días de supervivencia. Por lo tanto todas las especies sufrieron mortalidad en sus grupos tratamientos entre 2 y 7 días, mientras que los grupos control de todas las especies, a excepción de *L. latrans*, no registraron mortalidad alguna.

En las larvas de anuros, *Bd* solo infecta las estructuras orales queratinizadas de los individuos (Blaustein *et al.* 2005; Fellers *et al.* 2001; Smith *et al.* 2007). La mayoría de los bioensayos con larvas, así como también los estudios de campo, muestran que las larvas de la mayoría de las especies se comportan como reservorios de *Bd* (Berger *et al.* 1998, 1999; Daszak *et al.* 1999, 2003; Briggs *et al.* 2010), ya que éstas no experimentan mortalidad (Parris & Baud 2004; Rachowicz & Vredenburg 2004). Según Haydon *et al.* (2002), los hospedantes reservorio tienen baja sensibilidad a un patógeno; por lo tanto pueden acarrear infecciones no letales y servir como vectores que transmiten el patógeno a otros hospedantes que son más sensibles.

Nuestros resultados muestran que bajo las condiciones utilizadas en este bioensayo [temperatura y fotoperiodo, la cepa de *Bd* usada (JEL 423) y la concentración de zoosporas utilizada (6×10^4)], las especies evaluadas son altamente sensibles a la infección por *Bd*. Blaustein *et al.* (2005) evaluó la susceptibilidad de cuatro especies de anuros a la infección por *Bd* usando una concentración de 1400 zoosporas/ml en la exposición (una concentración mucho más baja que la nuestra) y encontraron diferencias en la sensibilidad de las especies evaluadas. *B. boreas* fue la única especie que presentó diferencias significativas entre las larvas expuestas y el control, observándose mortalidad de las larvas

de *B. boreas* al final del período de exposición en el día 2. En nuestros resultados la mortalidad de *R. fernandezae* y *S. squalirrostris* comenzó el día 1 (dentro de las 24 hs luego de la primera exposición), mientras que las demás especies comenzaron a disminuir desde el día 2.

El análisis de los discos orales de las larvas bajo el microscopio estereoscópico resultó negativo; ninguna especie presentó despigmentación y/o deformación evidente mientras que el examen directo al microscopio óptico registró la presencia de *Bd* en *H. pulchellus* y *R. fernandezae*, pero fue negativo para *L. latrans* y *S. squalirrostris*. Rachowicz & Vredenburg (2004) visualizaron despigmentación del disco oral a partir de la semana 7 post-exposición a *Bd*, en un bioensayo de laboratorio. Estas observaciones avalan nuestros resultados, ya que seguramente la despigmentación de las estructuras orales se deba a una infección en estado avanzado, y 1 o 2 días de infección se considera muy poco tiempo para que la infección pueda llegar a diseminarse por gran parte de la superficie del disco oral. También detectaron despigmentación en las larvas con infección de *Bd* confirmada, pero no observaron despigmentación en las larvas en las que la infección con *Bd* resultó negativa mediante análisis histológico (Rachowicz & Vredenburg 2004). Otros autores también han encontrado una fuerte asociación entre la despigmentación del disco oral y la confirmación histológica de *Bd* (Symon *et al.* 2007; Smith *et al.* 2007). Aunque Fellers *et al.* (2001), en un trabajo previo, encontró que solo el 67% de las larvas que tenían anomalías en los discos orales, presentaban evidencias histológicas de *Bd*. Por lo tanto concluimos que, como comentamos previamente, la técnica histológica, suele subestimar la infección por *Bd*, por lo que seguramente la infección está presente en muchos casos en que no es evidente en los cortes y en los que no llega a crear despigmentaciones ni pérdida de estructuras orales. Esto se confirma ya que nuestros resultados muestran infección mediante el examen directo de las estructuras orales al microscopio óptico en dos de las cuatro especies, a la vez que resultó negativo el examen histológico para todas las especies. En el experimento con *B. boreas*, Blaustein *et al.* (2005), encontraron que de los 10 individuos muertos en el tratamiento con *Bd*, ninguno mostró signos de infección en las muestras histológicas. Esto vuelve a corroborar que esta técnica debe ser complementada con otras, para aseverar los resultados obtenidos. La ausencia de registro de infección en las otras dos especies (mediante el examen directo al microscopio óptico) puede deberse a una baja

susceptibilidad de estas especies a infectarse con *Bd*, por lo menos en el tiempo en que fueron evaluadas.

El comportamiento de las larvas expuestas a *Bd* mostró alteraciones durante el bioensayo, registrándose aletargamiento, reacción lenta al estímulo y desorientación en todas las especies expuestas. Blaustein *et al.* (2005) también encontraron que las larvas de *B. boreas* (las únicas en experimentar mortalidad) permanecían vivas pero inmóviles en la base de los recipientes, y desorientadas, mientras las demás especies se mostraban activas. Los controles no manifestaron ningún cambio comportamental.

Nuevamente la hipótesis de una toxina letal producida por *Bd*, apoya más la mortalidad de las especies en este bioensayo, que la interrupción del proceso de intercambio gaseoso y osmorregulatorio de la piel como consecuencia de la respuesta de ésta a la presencia del patógeno.

Nuestros resultados sugieren que las larvas no sólo funcionan como reservorios para la transmisión de la enfermedad, sino que también pueden morir directamente por la exposición al hongo. Esto podría ocurrir, por ejemplo, cuando las charcas se secan y las concentraciones de *Bd* aumentan, y puede ser especialmente importante en larvas muy sociales que forman grandes agrupaciones (Blaustein *et al.* 2005).

Bioensayo 4

Las larvas de *Physalaemus fernandezae* presentaron mortalidades significativas en los tratamientos de los tres grupos evaluados [**Ph**: población proveniente de la R.N.I. Punta Lara infectada con cepa de *Bd* autóctona (MLA); **PhA**: población proveniente de Pinamar infectada con cepa de *Bd* autóctona (MLA) y **PhE**: proveniente de la R.N.I. Pta. Lara infectada con una cepa extranjera (JEL 423)]. No se registró mortalidad en los grupos control de los tres tratamientos.

La supervivencia de los tres grupos, mostró diferencias significativas y los TMS de los tratamientos fueron diferentes para todos los grupos, desde 3,1 para Ph hasta 6,5 para PhE. Con respecto a la mortalidad de los individuos en los grupos, se observó que la población de la RNIPL evaluada con la cepa autóctona (Ph) y evaluada con la cepa foránea

(PhE) fueron las que registraron mortalidades más temprano en el bioensayo, a partir del día 2; pero mientras Ph disminuyó casi un 60% su población del día 2 al 3, PhE se mantuvo con el 90% de su población desde el día 2 hasta el día 14. Por otro lado la población de Pinamar expuesta a la cepa autóctona (PhA) se mantuvo constante hasta el día 5, momento en el cual redujo su supervivencia a cero. Ph y PhA fueron evaluadas con la misma cepa autóctona y bajo las mismas condiciones, por lo tanto la diferencia en el tiempo de supervivencia seguramente se deba a diferencias en las características poblacionales de estos dos grupos.

Berger *et al* (2005b) en un ensayo con adultos de *Litoria caerulea* y tres cepas de *Bd* encontraron que esa especie era altamente sensible a la infección por *Bd* pues se produjo el 100% de mortalidad con todas las cepas, pero que el tiempo de muerte difería con las distintas cepas utilizadas. Las diferencias en la virulencia de las cepas podría estar asociada a presiones de selección ambientales y del hospedador, reflejando los diferentes lugares y especies hospedantes para cada aislamiento (Berger *et al.* 2005b). Por otro lado Retallick & Miera (2007) evaluaron dos grupos de individuos de una misma población de *P. triseriata* con dos cepas de *Bd* y encontraron que las mismas provocaron tanto efectos letales como subletales en los individuos. Las cepas utilizadas en nuestro bioensayo tienen diferencias en la procedencia y en el hospedador del que fueron aisladas. La cepa JEL 423, fue aislada de un individuo adulto de *Phyllomedusa lémur* de Guabal, Panamá y ha sido utilizada en diversos bioensayos produciendo síntomas de la enfermedad y mortalidad en diferentes especies (Becker & Harris 2010; Branelly in rev. citado por Branelly *et al.* 2012); mientras que la cepa MLA1 ha sido aislada de larvas de *H. cordobae* y *O. occidentalis* provenientes de una laguna de altura en la provincia de San Luis (Argentina), y éstas son las primeras evaluaciones que se realizan con esta cepa. Nuestros resultados muestran que los dos grupos evaluados con la cepa MLA1 sufrieron mortalidades más rápidas que el grupo evaluado con la cepa JEL 423. Por lo que se considera más virulenta que el aislamiento JEL 423.

Alternativamente, diferencias en el manejo *in vitro* de los cepas, así como también el tiempo desde su primer aislamiento, pueden inferir en cambios en la virulencia de las distintas cepas (Berger *et al.* 2005b). En nuestro bioensayo la cepa JEL 423 fue aislada por primera vez en Diciembre de 2004, mientras que MLA1 fue aislada por primera vez en

Enero de 2010. En nuestro bioensayo JEL 423 había sido repicada cuatro veces en laboratorio antes de realizar la infección (estos repiques no tienen en cuenta los realizados antes de que la cepa fuese recibida). Por otro lado la cepa MLA1 fue repicada solo una vez antes del bioensayo. Esta diferencia puede justificar la disminución en la patogenicidad de ambas cepas, siendo la cepa más virulenta, la aislada más recientemente y con menos pasajes *in vitro* (MLA 1), lo que coincide con los resultados de Berger *et al.* (2005b) y Retallick & Miera (2007). Otra explicación para esta diferencia en la virulencia podría ser la diferencia de tamaño de zoosporangios que registramos entre estas dos cepas, siendo mayores los de la cepa MLA1, hecho que coincide con lo expuesto por Fisher *et al.* (2009), en los que cepas con morfologías mayores en sus zoosporangios eran más virulentas.

Este experimento y trabajos previos muestran que a pesar que existe poca variación genética entre los aislamientos de *Bd* alrededor del mundo (Morehouse *et al.* 2003), existen diferencias significativas en virulencia y comportamiento entre las diferentes cepas (Berger *et al.* 2005b).

El examen bajo el microscopio estereoscópico de los discos orales de las larvas presentó despigmentación y pérdida de la mayor parte de las estructuras del disco oral en algunos individuos del tratamiento Ph, una leve decoloración en los queratodontes inferiores en 2 de los individuos del grupo PhA, mientras que los individuos del tratamiento PhE no pudieron observarse correctamente debido al deterioro de los mismos. La mortalidad de los distintos grupos se registró desde el día 2 del bioensayo, o sea dentro de las 48 hs de la exposición inicial y dentro aún del período de exposición, por lo que es altamente improbable que la decoloración y/o pérdida total de las estructuras del disco oral pueda deberse a una infección severa ya que trabajos previos aseguran que se necesitan por lo menos 6 semanas de infección para visualizar decoloraciones en esas estructuras (Rachowicz & Vredenburg 2004). A pesar de que la falta de pigmento en estas estructuras suele estar fuertemente asociada a la infección por *Bd* (Rachowicz & Vredenburg 2004; Simons *et al.* 2007; Smith *et al.* 2007; Lips 1999; Lips *et al.* 2003, 2004), existe también la posibilidad de una identificación de la quitridiomycosis errónea, porque la despigmentación de las piezas bucales también está asociado con la metamorfosis (Gosner 1960), la exposición a los contaminantes químicos (Hayes *et al.* 1997; Rowe *et al.* 1998), y las bajas temperaturas (Rachowicz 2002). En nuestro bioensayo, el examen de los discos orales al

microscopio óptico fue positivo para Ph y PhA, y negativo para PhE, pero siempre se determinaron infecciones leves. Por otro lado el examen histológico fue negativo para todos los tratamientos, con lo que volvemos a corroborar que seguramente una infección leve está subestimada por esta técnica.

De todas maneras podemos referirnos a la especie *P. fernandezae* como susceptible a la infección por *Bd* y altamente sensible a la misma.

Incidencia topográfica de Batrachochytrium dendrobatidis en distintos parches ventrales de L. latrans

Los resultados del análisis de los puntos de infección y de la cantidad de zoosporangios en las diferentes regiones del cuerpo, muestran un importante predominio en las regiones MI1, MI2 V1 y V2 para L10 y MI1, MI2 y MD2 para L7 y las diferencias en los puntos de infección entre las distintas regiones fueron significativas. En ambos individuos podemos visualizar que MI1 y MI2 son las regiones con más cantidad de puntos de infección y de zoosporangios, por lo tanto las regiones con más **incidencia de *Bd***.

En estudios previos (Berger *et al.* 1998; Pessier *et al.* 1999; Ardipradja 2001), *Bd* fue encontrado más frecuentemente en el estrato córneo de los dígitos y en las superficies ventrales.

Berger *et al.* (2005c) estudiaron la distribución de la infección de *Bd* en distintas regiones dorsales y ventrales de los individuos de *Litoria caerulea*, encontrando la gran mayoría en la región ventral y los pies, siendo la región media de los miembros posteriores (fibula), la región con el menor número medio de zoosporangios de la región ventral. Nuestros resultados muestran también mayor número de zoosporangios y puntos de infección en la región de los muslos y menor en la región de la fibula.

Conclusiones

Análisis de la presencia de *Bd* en Anuros del área de estudio y otras áreas

- Mediante los muestreos realizados en el Área de Estudio (ubicada en el valle de inundación del arroyo “El Pescado, en las afueras de la ciudad de La Plata, provincia de Buenos Aires) se confirma la presencia de *Bd* en las especies: *Pseudis minutus*, *Hypsiboas pulchellus* y *Leptodactylus latrans*.
- En el Área de Muestreo no fueron registradas mortalidades significativas en ninguna de las especies hospedantes detectadas, aunque se verifica que convive con el hongo *Bd* por lo menos desde el año 2002.
- La infección de *Bd* en el Área de Muestreo es de carácter leve, afirmación que se confirma a través de los resultados de los Muestreos por Transectas y trampas de pozo (captura viva) y Trampas de Pozo (captura muerta).
- El análisis del relevamiento de *Bd* en Anuros de Otras Regiones (Misiones, Jujuy, Salta y Buenos Aires) confirma su presencia en las siguientes especies:

Elachistocleis bicolor en la Provincia de Misiones. Este reporte representa el primer registro de *Bd* en el género *Elachistocleis* y el primero para la provincia de Misiones. Además se encuentra en la región del Bosque Atlántico, considerado como uno de los cinco “hotspots” de la biodiversidad, originalmente reportados para Sudamérica.

Hypsiboas aff. riojanus en la Provincia de Jujuy, en la región de la Puna. Este registro representa el primer reporte de *Bd* para la especie *Hypsiboas aff. riojanus* para la Argentina.

Rhinella sp en la Provincia de Salta, en Selva de Transición perteneciente a la Provincia Fitogeográfica de las yungas. Cabe destacar que este es el único reporte en nuestro estudio que no coincide con una zona de probabilidad para el desarrollo del quitridio según los análisis de solapamiento de nicho.

Leptodactylus latrans en la Provincia de Buenos Aires. Los individuos pertenecen a la Reserva Natural Integral Punta Lara, a la región del camino a la Isla Santiago, La Balandra y la localidad de Arturo Seguí. Uno de los ejemplares se registró en el sitio en el que el Camino Negro (RNIPL) contacta un relicto de Selva Marginal que circunda el Arroyo Boca Cerrada en la RNIPL.

Aislamiento de la primera cepa de *Batrachochytrium dendrobatidis* en Argentina

- Se aisló la primera cepa de *Bd* argentina, MLA1, a partir de larvas de *H. cordobae* y *O. occidentalis*. Nuestra cepa difiere morfológicamente de la cepa JEL 423 de origen Panameño.

Secuenciación y genoma de *Batrachochytrium dendrobatidis*

- El estudio expuesto en este trabajo (Rosemblum *et al.* 2012), basado en la secuenciación del genoma, sitúa a nuestra cepa MLA1 dentro de un agrupamiento que contiene a 15 cepas norteamericanas. Por lo cual esta cepa estaría dentro de un grupo con genotipo “norteamericano”.
- En el estudio expuesto en este trabajo (Rosemblum *et al.* 2012), basado en el genoma completo de las cepas (que incluye nuestro aislamiento MLA1), se revela que no existe relación geográfica o de hospedante, entre las cepas analizadas.

Bioensayos de laboratorio

Mediante la realización de los ensayos de laboratorio se confirmó que:

- Los individuos adultos de *R. fernandezae*, *O. americanus*, *L. latinasus* y *L. latrans* son especie **poco sensibles** o **resistentes** a la infección por *Bd*, en laboratorio.
- Las especies más sensible resultaron los individuos adultos de *S. squalirrostris* (familia Hylidae), luego *P. falcipes* (familia Leiuperidae) y por último *H. pulchellus* (familia Hylidae).

- Todas las especies de adultos evaluadas, excepto *S. squalirrostris*, son susceptibles a la infección por *Bd*.
- Las larvas de todas las especies evaluadas son sensibles a la infección por *Bd*. La sensibilidad fue mayor en orden decreciente desde: *R. fernandezae*, *S. squalirrostris*, *P. fernandezae*, *L. latrans* hasta *H. pulchellus*.
- Las especies *H. pulchellus* y *R. fernandezae* resultaron susceptibles a la infección por *Bd*, mientras no lo fueron *L. latrans* y *S. squalirrostris*.
- La cepa MLA1 (Argentina) resultó ser más virulenta que la cepa JEL 423 Panameña.
- Las regiones corporales ventrales con mayor incidencia de *Bd*, fueron los **muslos** (MI1 y MI2).

Bibliografía

- ACAP. 2005. Amphibian conservation summit. Appendix 1. Declaration. En: Gascon, C., Collins, J. P., Moore, R. D., Church, D. R., McKay, J. E. and Mendelson, J. R. III (eds). Amphibian Conservation Action Plan. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 64pp. 17-19 September 2005. Washington, DC.
- Agostini MG, Díaz Seijas ME, Natale GS & Ronco AE. 2005. Comparación de la diversidad de anuros de dos agroecosistemas del valle de inundación del arroyo "El Pescado", provincia de Buenos Aires. VI Congreso Argentino de Herpetología. 21 a 23 de Noviembre de 2005, Paraná, Argentina.
- Agostini MG, Saibene P & Barrasso DA. 2011. Anfibios de la Reserva Natural de Punta Lara. En Inventario de la Fauna de Vertebrados de la Reserva Natural Punta Lara. Aves Argentinas/Asociación Ornitológica del Plata. Buenos Aires.
- Alexander MA & Eischeid JK. 2001. Climate variability in regions of amphibian declines. *Conservation Biology* 15: 930-942.
- Amphibian Conservation Summit. Declaration. 2005. Washington DC, 17-19 September. Disponible en: http://www.amphibianark.org/pdf/ACAP_Summit_Declaration.pdf.
- Andre SE, Parker J & Briggs CJ. 2008. Effect of temperature on host response to *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in the mountain yellow-legged frog (*Rana muscosa*). *Journal of Wildlife Diseases* 44: 716-720.
- Ardipradja K. 2001. A study of resistance towards the emerging pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in 4 species of Australian frogs. BSc, University of Melbourne, Melbourne.
- Arellano ML, Agostini MG, Herrera R, Steciow MM, Lavilla E & Barraso D. 2006. Nuevo hallazgo de quitridiomycosis en el noreste de la provincia de Buenos Aires. VII Congreso Argentino de Herpetología. 29 de Noviembre a 1° de Diciembre, Corrientes, Argentina.
- Arellano ML, Ferraro DP, Steciow MM & Lavilla EO. 2009. Infection by the chytrid

- fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in the yellow belly frog (*Elachistocleis bicolor*) from Argentina. *Herpetological Journal* 19: 217-220.
- Bancroft, BA, Han BA, Searle CL, Biga L, Olson DH, Kats LB, Lawler JJ & Blaustein AR. 2011. Species level correlates of susceptibility to the pathogenic amphibian fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in the United States. *Biodiversity and Conservation*, 20: 1911–1920.
- Bardier C, Ghirardi R, Levy MG & Maneyro R. 2011. First Case of chytridiomycosis in an adult specimen of a native anuran from Uruguay. *Herpetological Review* 42(1): 65-66.
- Barrionuevo S & Mangione S. 2006. Chytridiomycosis in two species of *Telmatobius* (Anura: Leptodactylidae) from Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms* 73: 171-174.
- Barrionuevo JS, Aguayo R & Lavilla EO. 2008. First record of chytridiomycosis in Bolivia (*Rhinella quechua*; Anura: Bufonidae). *Diseases of aquatic organisms* 82: 161-163.
- Barrionuevo JS, & Ponssa ML. 2008. Decline of three species of the genus *Telmatobius* (Anura: Leptodactylidae) from Tucuman Province, Argentina. *Herpetologica*, 64: 47–62.
- Becker MH, Harris RN. 2010. Cutaneous Bacteria of the Redback Salamander Prevent Morbidity Associated with a Lethal Disease. *PLoS ONE* 5(6): e10957.
- Belden LK, & Blaustein AR. 2002. Exposure of red-legged frog embryos to ambient UV-B radiation in the field negatively affects larval growth and development. *Oecologia* 130:551-554.
- Beldomenico PM, Begon M. 2009. Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles?. *Trends in Ecology and Evolution*. 25(1): 21-27.
- Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham AA, Gonnin CL, Slocombe R, Ragan MA, Hyatt AD, McDonald KR, Hines HB, Lips KR, Marantelli G & Parkes H. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America.

- Proceedings of the National Academy of Sciences 95: 9031-9036.
- Berger L., Speare R., Hyatt A. 1999a. Chytrid fungi and amphibian declines: Overview, implications and future directions. In: Campbell A, editor. Declines and disappearances of Australian frogs. Canberra, Australia: Biodiversity Group Environment Australia. p. 23-33.
- Berger L, Speare R & Kent A. 1999b. Diagnosis of chytridiomycosis in amphibians by histologic examination. Disponible en: <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/histo/chhisto.htm>.
- Berger L, Speare R, Hines HB, Marantelli G, Hyatt AD, McDonald KR, Skerratt LF, Olsen V, Clarke JM, Gillespie GR, Mahony MJ, Sheppard N, Williams C & Tyler MJ. 2004. Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. Australian Veterinary Journal 82: 31-36.
- Berger L, Hyatt AD, Speare R & Longcore JE. 2005a. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. Diseases of Aquatic Organisms, 68, 51-63.
- Berger L, Marantelli G, Skerratt LF & Speare R. 2005b. Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. Diseases of Aquatic Organisms 68: 47-50.
- Berger L, Speare R & Skerratt LF. 2005c. Distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and pathology in the skin of green tree frogs *Litoria caerulea* with severe chytridiomycosis. Diseases of Aquatic Organisms 68: 65-70
- Bertonatti C. 1994. Lista propuesta de anfibios y reptiles amenazados de extinción. Cuadernos de Herpetología 8(1):164–171.
- Bickford D, Howard Sd, Ng Djj, Sheridan Ja. 2010. Impacts of climate change on the amphibians and reptiles of Southeast Asia. Biodiversity and Conservation 19:1043–1062.
- Blaustein AR & Kiesecker JM. 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations Ecology Letters 5: 597-608.
- Blaustein AR, Romansic JM, Scheessele EA, Han BA, Pessier AP & Longcore JE.

2005. Interspecific Variation in Susceptibility of Frog Tadpoles to the Pathogenic Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology* 19(5): 1-9.
- Bonaccorso E, Guayasamin JM, Méndez D & Speare R. 2003. Chytridiomycosis as a possible cause of population declines in *Atelopus cruciger* (Anura: Bufonidae). *Herpetological Review* 34: 331-334.
- Borteiro C, Cruz JC, Kolenc F, Aramburu A. 2009. Chytridiomycosis in frogs from Uruguay. *Diseases of Aquatic Organisms*. 84: 159–162.
- Bosch JI, Martínez-Solano I & García-Parris M. 2001. Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the Midwife Toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of Central Spain. *Biological Conservation* 97: 331-337.
- Bosch J. 2003. Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. Munibe. Donostia- San Sebastián. Nº 16.
- Bosch J, Carrascal L, Duran L, Walker S, Fisher M. 2007. Climate change and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of Central Spain; is there a link? *Proceedings of the Royal Society B*. 274: 253-260.
- Bosch, J. & P. A. Rincón. 2008. Chytridiomycosis-mediated expansion of *Bufo bufo* in a montane area of Central Spain: an indirect effect of the disease. *Diversity and Distributions* 14: 637- 643
- Burrowes, PA, Joglar RL & Green DE. 2004. Potential causes for amphibian declines in Puerto Rico. *Herpetologica* 60(2):141-154.
- Bradford DF, Tabatabai F & Graber DM . 1993. Isolation of remaining populations of the native frog, *Rana muscosa*, by introduced fishes in Sequoia and Kings Canyon National Parks, California. *Conservation Biology* 7: 882–888.
- Bradley GA, Rosen PC, Sredl JM & Jones TR. 2002. Chytridiomycosis in native Arizona frogs. *Journal of Wildlife Diseases* 38: 206-212.
- Brannelly LA, Chatfield MWH, Richards-Zawacki CL. 2012. Field and laboratory studies of the susceptibility of the green frog (*Hyla cinerea*) to *Batrachochytrium dendrobatidis* infection. *PLoS One* 7: e38473.

- Briggs CJ, Vredenburg VT, Knapp RA & Rachowicz LJ. 2005. Investigating the population-level effects of chytridiomycosis: an emerging infectious disease of amphibians. *Ecology* 86: 3149-3159.
- Brooks TM, Mittermeier RA, Da Fonseca GAB, Gerlach J, Hoffmann M, Lamoreux JF, Mittermeier CG, Pilgrim JD & Rodrigues ASL. 2006. Global Biodiversity Conservation Priorities. *Science* 313: 58-61.
- Brusquetti F, Lavilla EO. 2006. Lista comentada de los anfibios de Paraguay. *Cuadernos de Herpetología* 20 (2): 3-79.
- Burton TM & Likens GE. 1975. Salamander populations and biomass in the Hubbard Brook Experimental Forest, New Hampshire. *Copeia* 1975: 541-46.
- Burkart R, Bárbaro N, Sánchez RO & Gómez DA. 1999. *Eco-Regiones de la Argentina*. - Administración de Parques Nacionales, Buenos Aires, 62 pp.
- Cabrera AL, Willink A. 1973. *Biogeografía de América Latina*. 2º edición corregida. Monografía 13. Serie Biología. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington DC. EEUU. 120 pp.
- Cabrera AL. 1994. Regiones Fitogeográficas Argentinas. En: Kugler, W. (ed.), *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*, 2º ed., T II, F 1, 85 pp.
- Camilión MC, Manassero MJ, Hurtado MA, Ronco AE. 2003. Copper, lead and zinc distribution in soils and sediments of the South Western coast of the Río de la Plata estuary. *Journal of Soils and Sediments* 3(3): 213-220.
- Carey C, Cohen N, & Rollins-Smith L. 1999. Amphibian declines: an immunological perspective. *Developmental and Comparative Immunology* 23: 459-472.
- Carey C, Bruzgul JE, Livo IJ, Walling ML, Kuehl KA, Dixon BF, Pessier AP, Alford RA, & Rogers KB. 2006. Experimental exposures of boreal toads (*Bufo boreas*) to a pathogenic chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *EcoHealth* 3: 5-21.
- Carnaval ACOQ, Puschendorf R, Peixoto OL, Verdade VK & Rodrigues MT. 2006. Amphibian chytrid fungus broadly distributed in the Brazilian Atlantic rain forest. *EcoHealth* 3: 41-48.

- Cei JM. 1980. Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano (N.S.)*, Monogr. 2: 1-609.
- Cóccaro JM, Olivier SR, Villar M. 1998. “La forêt marginale de PuntaLara (Buenos Aires, Argentine), témoignage subtropical Dans un ambiance d’estuaire temperé”. En: îles littorales tropicales. Actes des VIIèmes Journées de Géographie tropicale, Brest, 11-12-13 septembre 1997, pp.621-628. Ouest Éditions, Presses Académiques.
- Cochran DM. 1955. Frogs of Southeastern Brazil. *United States National Museum Bulletin*, 206: 1-423.
- Conservation International. 2005. Biodiversity Hotspots. Available at <http://www.biodiversityhotspots.org/xp/Hotspots> (accessed 11 August 2009).
- Corn SP. 2001. Técnicas Estándar para Inventarios y Monitoreos; Muestreos por Transectas. En: *Medición y Monitoreo de la Diversidad Biológica, Métodos Estandarizados para Anfibios*, 104-113. Heyer W.R., Donnelly M.A., McDiarmid R.W., Hayek L.C. y Foster M.S (Eds.). Smith. Inst. Press, Editorial Universitaria de la Patagonia. 349pp.
- Cortez CSR, De la Riva I, Köhler J, Lavilla E. 2004. *Hypsiboas andinus*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 20 September 2012.
- Daszak P, Berger L, Cunningham AA, Hyatt AD, Green DE, & Speare R. 1999. Emerging Infectious Diseases and Amphibian Population Declines. *Emerging Infectious Diseases* 5(6): 735-748.
- Daszak P, Cunningham AA & Hyatt AD. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. *Science* 287: 443-449.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. 2001. Draft guidelines for international translocation of amphibians with respect to infectious diseases. Attachment 6. En: Speare R & Steering Committee of Getting the Jump on Amphibian Disease. Developing management strategies to control amphibian diseases: Decreasing the risks due to communicable diseases. School of Public Health and Tropical Medicine, James Cook University: Townsville: 150-156.

- Daszak P, Cunningham AA & Hyatt AD. 2003. Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity & Distributions* 9: 141-150.
- Daszak P, Lips K, Alford R, Carey C, Collins JP, Cunningham A, Harris R & Ron S. 2007. Infectious Diseases. En: Gascon C, Collins JP, Moore RD, Church DR, McKay JE & Mendelson JR. III (eds). *Amphibian Conservation Action Plan*. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 64pp.
- Davidson C, Shaffer HB, Jennings MR. 2002 Spatial tests of the pesticide drift, habitat destruction, UV-B, and climate-change hypotheses for California amphibian declines. *Conservation Biology* 16: 1588-1601.
- Davidson EW, Parris M, Collins JP, Longcore JE, Pessier AP, & Brunner J. 2003. Pathogenicity and transmission of Chytridiomycosis in Tiger Salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Copeia* 2003: 601-607.
- De La Riva, I., R. Márquez & J. Bosch. 1996. Advertisement calls of four microhylid frogs from Bolivia (Amphibia, Anura). *American Midland Naturalist* 136: 418-422.
- Delgado CS, Natale GS, Barraso DA & Herrera RH. 2010. Presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Physalaemus fernandezae* (Anura: Leiuperidae) para Buenos Aires, Argentina. XI Congreso Argentino de Herpetología. 19 a 22 de Octubre de 2010, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- Dodd CK, & Smith LL. 2003. Habitat destruction and alteration: historical trends and future prospects for amphibians. Pages 94-112 in R. D. Semlitsch, editor. *Amphibian Conservation*. Smithsonian Institution, Washington.
- Duellman WE & Trueb L. 1994. *Biology of Amphibians*. Johns Hopkins University Press. ISBN 978-0-8018-4780-6.
- Drew A, Allen EJ & Allen LJS. 2006. Analysis of climatic and geographic factors affecting the presence of chytridiomycosis in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms* 68: 245-250.

- Duellman WE, de la Riva I, Wild ER. 1997. Frogs of the *Hyla armata* and *Hyla pulchella* groups in the Andes of South America, with definitions and analyses of phylogenetic relationships of Andean groups of *Hyla*. Scientific Papers of the Natural History Museum of the University of Kansas, 3, 1–41
- Fellers GM & Drost CA. 1993. Disappearance of the cascades frog *Rana cascadae* at the southern end of its range, California, USA. *Biological Conservation* 65: 177-181.
- Fellers GM, Green DE & Joyce EL. 2001. Oral Chytridiomycosis in the Mountain Yellow-Legged Frog (*Rana muscosa*). *Copeia* 4: 945-953.
- Fisher MC. 2007. Potential interactions between amphibian immunity, infectious disease and climate change. *Animal Conservation* 10: 420-421.
- Fisher MC, Garner TWJ. 2007. The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biology Reviews* 21:2-9.
- Fisher MC, Bosch J, Yin Z, Stead DA, Walker J, Selway L, Brown AJP, Walker LA, Gow NAR, Stajich JE, Garner TWJ. 2009. Proteomic and phenotypic profiling of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* shows that genotype is linked to virulence. *Molecular Ecology* 18(3): 415-429.
- Fox SF, Greer AL, Torres-Cervantes R & Collins JP. 2006. First case of ranavirus associated morbidity and mortality in natural populations of the South American frog *Atelognathus patagonicus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 72: 87-92.
- Galindo Leal C & Gusmão Câmara I. 2005. El Estado del “Hotspot” Bosque Atlántico: una visión general. En: *El Bosque Atlántico en Paraguay, Biodiversidad, Amenazas y Perspectivas*, 3-12. Cartes, J.L. (Ed.). Conservation International-Center for Applied Biodiversity Science- Guyra Paraguay. Asunción.
- García TS, Romansic JM & Blaustein AR. 2006. Survival of three species of anuran metamorphs exposed to UV-B radiation and the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 72:163-169.
- Garmyn A, Van Rooij P, Pasmans F, Hellebuyck T, Van Den Broeck W, Haesebrouck

- F, Martel A. (2012) Waterfowl: Potential Environmental Reservoirs of the Chytrid Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. PLoS ONE 7(4): e35038.
- Garner TWJ, Walker S, Bosch J, Leech S, Rowcliffe M, Cunningham AA, Fisher MC. 2009. Life history tradeoffs influence mortality associated with the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. Oikos 118: 783-791.
- Gillespie GR. 2001. The role of introduced trout in the decline of the spotted tree frog (*Litoria spenceri*) in south-eastern Australia. Biological Conservation 100: 187-198.
- Ghirardi R, Lescano JN, Longo MS, Robledo G, Steciow MM & Perotti MG. 2009. *Batrachochytrium dendrobatidis* in Argentina: first record in *Leptodactylus gracilis* and another record in *Leptodactylus ocellatus*. Herpetological Review 40: 175-176.
- Ghirardi R. 2011. Estudio de la quitridiomycosis por *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios anuros del Litoral, Cuyo y Patagonia Argentina. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata. 195 pp.
- Giraud A. 2005. Dinâmica da perda da biodiversidade na Mata Atlântica argentina: uma introdução. In: Mata Atlântica, biodiversidade, ameaças e perspectivas, 137-140. Galindo Leal, C. & Gusmão Câmara, I (Eds). Belo Horizonte: Conservação Internacional.
- Gosner KL. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica 16: 183-190.
- Gutierrez RF, Arellano ML, Moreno LE & Natale GS. 2010. *Batrachochytrium dendrobatidis* in Argentina: First record of infection in *Hypsiboas cordobae* and *Odontophrynus occidentalis* tadpoles, in San Luis province, Argentina. Herpetological Review 41(3): 323-325.
- Haering R, Wellington R. 2000. New South Wales. National Parks and Wildlife Service and New South Wales. National Parks and Wildlife Service. Threatened Species Unit Hygiene protocol for the control of disease in frogs. NSW National Parks and Wildlife Service, [Hurstville, N.S.W.].

- Halloy SRP, Seimon A, Yager K et al. 2005. Multidimensional (climate, biodiversity, socioeconomics, agriculture) context of changes in land use in the Vilcanota Watershed, Peru. En: Spehn EM, Liberman Cruz M, Koerner C (Eds.) Land Use Changes and Mountain Biodiversity, pp. 323-337. CRC Press LLC, Ft. Lauderdale.
- Hanselmann R, Rodriguez A, Lampo M, Fajardo-Ramos L, Aguirre AA, Kilpatrick AM, Rodriguez JP, Daszak P. 2004. Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs (*Rana catesbeiana*) in Venezuela. *Biological Conservation* 120: 115-119.
- Harris RN, James TY, Lauer A, Simon MA, Patel A. 2006. Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. *EcoHealth* 3:53-56.
- Harvell CD, Mitchell CE, Ward JR, Altizer S, Dobson AP, Ostfeld RS & Samuel MD. 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* 296: 2158-2162.
- Hayes RB, Wu RH & Gill TN. 1997. DDT like effects as a result of corticosterone treatment in an anuran amphibian: Is DDT a corticoid mimic or a stressor? *Environmental Toxicology and Chemistry* 16(9): 1948-1953.
- Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH & Laurenson MK. 2002. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging Infectious Diseases* 8:1468-1473.
- Herrera RA, Steciow MM & Natale GS. 2005. Chytrid fungus parasitizing the wild amphibian *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae) in Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms* 64: 247-252.
- Heyer R, Langone J, La Marca E, Azevedo-Ramos C, di Tada, Baldo D, Lavilla E, Scott N, Aquino L, Hardy J. 2010. *Leptodactylus latrans*. En: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 21 September 2012.
- Hopkins S, Channing A. 2002. Chytridiomycosis in Northern and Western Cape frog populations, South Africa. *HerpDigest* 3: 334-336.

- Houlahan JE, Findlay CS, Schmidt BR, Myer AH, Kuzmin SL. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404: 752-755.
- Jaeger GR. 2001. Técnicas Estándar para Inventarios y Monitoreos; Muestreos por Transectas. En: *Medición y Monitoreo de la Diversidad Biológica, Métodos Estandarizados para Anfibios*, 98-102. Heyer W.R., Donnelly M.A., McDiarmid R.W., Hayek L.C. y Foster M.S (Eds.). Smith. Inst. Press, Editorial Universitaria de la Patagonia. 349pp.
- IUCN SSC. Invasive Species Specialist Group. Symptoms of the disease caused by *Batrachochytrium dendrobatidis*. Disponible en: http://www.issg.org/database/species/reference_files/batden/Symptoms.rtf
- James TY, Litvintseva AP, Vilgalys R, Morgan JAT, Taylor JW, et al. 2009. Rapid Global Expansion of the Fungal Disease Chytridiomycosis into Declining and Healthy Amphibian Populations. *PLoS Pathogens* 5(5): e1000458.
- Johnson M. 2003. Working With *Batrachochytrium dendrobatidis*, the amphibian chytrid fungus. Disponible en: <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/protocol/Bd-protocols.pdf>
- Johnson ML, Speare R. 2003. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: Quarantine and disease control implications. *Emerging Infectious Diseases* 9: 922-925.
- Johnson ML, Speare R. 2005. Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment, *Diseases of Aquatic Organisms* 65:181-186.
- Kilpatrick AM, Briggs CJ, Daszak P. 2010. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology and Evolution*. 25(2): 109-118.
- Kruger KM & Hero JM. 2006. Survivorship in wild frogs infected with chytridiomycosis. *EcoHealth* 3: 171-177.
- Kruger KM & Hero JM. 2007. Large-scale seasonal variation in the prevalence and severity of chytridiomycosis. *Journal of Zoology* 271: 352-359.

- Krigger KM, Pereoglou F & Hero JM. 2007. Latitudinal Variation in the Prevalence and Intensity of Chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) Infection in Eastern Australia. *Conservation Biology* 21(5): 1280-1290.
- Krigger KM & Hero JM. 2007. The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is non-randomly distributed across amphibian breeding habitats. *Diversity and Distributions* 13: 781-788.
- Krigger KM & Hero JM. 2008. Altitudinal distribution of chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) infection in subtropical Australian frogs. *Austral Ecology* 33: 1022-1032.
- Kwet A, Aquino L, Lavilla EO, di Tada I. 2004. *Hypsiboas pulchellus*. En: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 25 October 2012.
- Lajmanovich RC. 2000. Interpretación ecológica de una comunidad larvaria de anfibios anuros. *Interciencia*. 25(2): 71-79.
- La Marca E, Lips KR, Lötters S, Puschendorf R, Ibañez R, Ron S. 2005. Catastrophic population declines and extinctions in neotropical harlequin frogs (Bufonidae: *Atelopus*). *Biotropica* 37:190-201.
- Lam BA, Walke JB, Vredenburg VT & Harris RN. 2010. Proportion of individuals with anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* skin bacteria is associated with population persistence in the frog *Rana muscosa*. *Biological Conservation* 143: 529-531.
- Lamirande EW & Nichols DK. 2002. Effects of host age on susceptibility to cutaneous chytridiomycosis in blue-and-yellow poison dart frogs (*Dendrobates tinctorius*). In *Proceedings of the Sixth International Symposium on the Pathology of Reptiles and Amphibians* (eds R.G.McKinnell, D.L. Carlson) pp. 3-13. Saint Paul, Minnesota.
- Lavilla EO. 2009. Declinaciones poblacionales y extinciones en Anfibios de Argentina. *Anticipo de Anales de la Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires*. 7 pp.
- Lavilla EO. 2004a. *Telmatobius atacamensis*. En: IUCN 2011. IUCN Red List of

- threatened Species. Version 2011.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 27 July 2011.
- Lavilla EO. 2004b. *Telmatobius pisanoi*. En: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 27 July 2011.
- Lavilla E, di Tada I, Langone J. 2004. *Elachistocleis bicolor*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 22 October 2012.
- Lavilla EO. 2003. Economía, Educación y Conservación. El costo de nuestra ignorancia. *Natura Neotropicalis*. 33: 95-101.
- Lavilla EO, Ponssa ML, Baldo D, Basso N, Bosso A, Céspedes J, Chebez JC, Aivovich JF, Ferrari L, Lajmanovich R, Langone JA, Peltzer P, Úbeda C, Vaira M & Vera Candiotti F. 2000. Categorización de los Anfibios de Argentina: 11-34. En: Lavilla EO, Richard E & Scrocchi GJ (Eds.) Categorización de los Anfibios y Reptiles de la República Argentina. Edición Especial Asociación Herpetológica Argentina.
- Lawler SP, Dritz D, Strange T & Holyoak M. 1999. Effects of introduced mosquitofish and bullfrogs on the threatened California red-legged frog. *Conservation Biology* 13: 613-622.
- Lenoir JS, McConnell LL, Fellers GM, Cahill TM & Seiber JN. 1999. Summertime transport of current-use pesticides from California's central valley to Sierra Nevada mountain range, USA. *Environmental Toxicology Chemistry* 18: 2715-2722.
- Letcher PM, Powell MJ, Churchill PF, Chambers JG 2006. Ultrastructural and molecular phylogenetic delineation of a new order, the Rhizophydiales (Chytridiomycota). *Mycological Research* 110: 898-915.
- Lips KR. 1998. Decline of a tropical montane amphibian fauna. *Conservation Biology* 12: 106-117.
- Lips KR. 1999. Mass mortality of the anuran fauna at an upland site in Panama.

- Conservation Biology 13: 117-125.
- Lips KR, Green DE, Papendick R, 2003. Chytridiomycosis in wild frogs from southern Costa Rica. *Journal of Herpetology* 37: 215–218.
- Lips K, Mendelson JI, Munoz-Alonso A, Canseco-Marquez L, Mulcahy D. 2004. Amphibian population declines in montane southern Mexico: resurveys of historical localities. *Biological Conservation* 119: 555-564.
- Lips KR, Diffendorfer J, Mendelson JR, Sears MW. 2008. Riding the wave: Reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLoS Biology* 6: 441-454.
- Longcore JC, Pessier AP & Nichols DK. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91: 219-227.
- Longcore J. 2000. Culture technics for amphibian chytrids: Recognizing, isolating, and culturing *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. *Proceedings of Getting the Jump! On Amphibian Diseases Conference / Workshop*. Cairns, Australia, 26-30 August: 52-54.
- Longo MS, Lescano JN, Robledo G. 2010. Presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anuros endémicos de Pampa de Achala, Córdoba. XI Congreso Argentino de Herpetología. Libro de Resúmenes. p. 106.
- McDonald KR, Mendez D, Muller R, Freeman AB, Speare R. 2005. Decline in the prevalence of chytridiomycosis in upland frog populations in North Queensland, Australia. *Pacific Conservation Biology* 11(2): 114–120.
- Manzano AS, Baldo D & Barg M. 2004. Anfíbios del Litoral Fluvial Argentino. En: Aceñolaza, FG (Coordinador) *Temas de la Biodiversidad del Litoral fluvial argentino INSUGEO Miscelánea* 12: 271-290, Tucumán.
- Marantelli G, Berger L, Speare R, Keegan L. 2004. Distribution of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin during tadpole development. *Pacific Conservation Biology* 10: 173–179.
- Merino-Viteri AR. 2001. Análisis de las posibles causas de las disminuciones de las poblaciones de anfibios en los Andes de Ecuador. Tesis de Licenciatura,

Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

- Mitchell KM, Churcher TS, Garner TWJ & Fisher MC. 2008. Persistence of the emerging pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* outside the amphibian host greatly increases the probability of host extinction. *Proceedings of the Royal Society-B* 275: 329-334.
- Mittermeier RA, Myers N, Thomsen JB, Da Fonseca GAB, Olivieri S. 1998. Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. *Conservation Biology* 12: 51.
- Moorehouse EA, James TY, Ganley ARD, Vilgalys R, Berger L, Murphy PJ. 2003. Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone. *Molec Ecol.* 12:395-403.
- Morgan JAT, Vredenburg VT, Rachowicz LJ, Knapp RA, Stice MJ, et al. 2007. Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 104: 13845-13850.
- Muths E, Stephen CP, Pessier AP & Green DE. 2003. Evidence for disease-related amphibian decline in Colorado. *Biological Conservation* 110: 357-365.
- Muths E, Pilliod DS & Livo LJ. 2008. Distribution and environmental limitations of an amphibian pathogen in the Rocky Mountains, USA. *Biological Conservation* 141: 1484-1492.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Da Fonseca GAB & Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Natale GS. 2006. Tesis Doctoral: Analisis Ecotoxicologico de una Comunidad de Anuros de la Región Pampeana. Efecto del Cr (VI) sobre embriones y larvas de distintas especies de una taxocomunidad. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata.
- Nichols DK, Lamirande EW, Pessier AP & Longcore JE. 2001. Experimental transmission of cutaneous chytridiomycosis in dendrobatid frogs. *Journal of Wildlife Diseases* 37: 1-11.
- Ouellet M, Mikaelian I, Pauli BD, Rodrique J, Green DM. 2003. Historical evidence of

- widespread chytrid infection in North American amphibian populations. Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists, 26 June–1 July 2003, Manaus, Amazonas, Brazil [cited 2004 April 10]. Disponible en: http://lists.allenpress.com/asih/meetings/2003/abstracts_IV_2003.pdf.
- Parker JM, Mikaelian I, Hahn N, Diggs HE. 2002. Clinical diagnosis and treatment of epidermal chytridiomycosis in African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). *Comparative Medicine* 52(3):265-268.
- Parmesan C, Yohe G. 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 421: 37-42.
- Parris MJ, Baud DR. 2004. Interactive effects of a heavy metal and chytridiomycosis on gray treefrog larvae (*Hyla chrysoscelis*). *Copeia* 2: 344–350.
- Peltzer PM, Lajmanovich RC, Beltzer AH. 2003. The effects of habitat fragmentation on amphibian species richness in the floodplain of the middle Parana River. *Herpetological Journal* 13(2): 95-98.
- Pedersen AB, Jones KE, Nunn CL, Altizer S. 2007. Infectious diseases and extinction risk in wild mammals. *Conservation Biology* 21: 1269-1279.
- Pessier AP, Nichols DK, Longcore JE, Gary MF. 1999. Cutaneous chytridiomycosis in Poison Dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's Tree Frogs (*Litoria caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11: 194-199.
- Phillips S, Anderson R, Schapire R. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231-259.
- Piotrowski JS, Annis SL & Longcore JE. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96(1): 9-15.
- Pough FH. 1980. The advantages of ectothermy for tetrapods. *The American Naturalist* 115: 92–112.
- Pounds JA & Crump ML. 1994. Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Conservation Biology* 8:72–85.
- Pounds JA, Fogden MPL & Campbell JH. 1999. Biological response to climate change

- on a tropical mountain. *Nature* 398:611–615.
- Pounds JA., Bustamante MR, Coloma LA, Consuegra AJ, Fogden MPL, Foster PN, La Marca E, Masters KL, Merino -Viteri A, Puschendorf R, Ron SR, Sánchez-Azofeifa GA, Still CJ & Young BE. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 439:161–167.
- Puschendorf R, Carnaval ACOQ, VanDerWal J, Zumbado-Ulate H, Chaves G, Bolaños F, Alford RA. 2009. Distribution models for the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in Costa Rica: proposing climatic refuges as a conservation tool. *Diversity and Distributions* 15: 401-408.
- Puschendorf R, Bolaños F & Chaves G. 2006. The amphibian chytrid fungus along an altitudinal transect before the first reported declines in Costa Rica. *Biological Conservation* 132: 136-142.
- Puschendorf R. 2003. *Atelopus varius* (harlequin frog) fungal infection. *Herpetological Review* 34: 355.
- Rachowicz LJ. 2002. Mouthpart pigmentation in *Rana muscosa* tadpoles: seasonal changes without chytridiomycosis. *Herpetological Review* 33: 263-265.
- Rachowicz LJ, Vredenburg VT. 2004. Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Diseases of Aquatic Organisms* 61(1-2): 75-83.
- Rachowicz LJ, Hero JM, Alford RA, Taylor JW, Morgan JAT, Vredenburg VT, Collins JP, Briggs CJ. 2005. The novel and endemic pathogen hypotheses: Competing explanations for the origin of emerging infectious diseases of wildlife. *Conservation Biology* 19: 1441–1448.
- Raffel T, Rohr J, Kiesecker J & Hudson P. 2006. Negative effects of changing temperature on amphibian immunity under field conditions. *Functional Ecology* 20: 819-828.
- Reeder NMM, Pessier AP, Vredenburg VT. 2012. A Reservoir Species for the Emerging Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* Thrives in a Landscape Decimated by Disease. *PLoS ONE* 7(3): e33567.

- Retallick RWR, Miera V. 2007. Strain differences in the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and non-permanent, sub-lethal effects of infection. *Diseases of Aquatic Organisms*; 75:201-207.
- Retallick RW, McCallum RH & Speare R. 2004. Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community post-decline. *PLoS Biology* 2: e351.
- Rödger D, Kielgast J, Bielby J, Schmidlein S, Bosch J, Garner TWJ, Veith M, Walker S, Fisher MC, Lötters S. 2009. Global amphibian extinction risk assessment for the panzootic chytrid fungus. *Diversity*. 1: 52-66.
- Rodrigues DDJ, Lopes FS & Uetanabaro M. 2003. Padrão reprodutivo de *Elachistocleis bicolor* (Anura, Microhylidae) na Serra da Bodoquena, Mato Gorrso do Sul, Brasil. *Iheringia*, 93 (4) :365-371.
- Rollins-Smith LA, King JD, Nielsen PF, Sonnevend A, Conlon JM, 2005. An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura: Leptodactylidae). *Regul. Pept.*, 124173–124178.
- Rollins-Smith LA, Reinert LK, Miera V, Conlon JM. 2002. Antimicrobial peptide defenses of the Tarahumara frog, *Rana tarahumarae*. *Biochem Biophys Res Comm.* 297:361–7.
- Ron SR & Merino A. 2000. Declinación de anfibios del Ecuador: Información general y primer reporte de Chytridiomycosis para Sudamérica. *Froglog* 42: 2.
- Ron SR, Duellman WE, Coloma LA & Bustamante MR. 2003. Population decline of the Jambato toad *Atelopus ignescens* (Anura: Bufonidae) in the Andes of Ecuador. *Journal of Herpetology* 37: 116–126.
- Ron SR. 2005. Predicting the Distribution of the Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica* 37(2):209-221.
- Ronco AE, Camilion C, Manassero M. 2001. Geochemistry of heavy metals in bottom sediments from streams of the western coast of the Rio de la Plata Estuary, Argentina. *Environ. Geochem. Health*, 23:89-103.
- Rosenblum EB, James TY, Zamudio K, Poorten TJ, Rodriguez D, Ilut D, Toledo F, Arellano ML, Medina E, Jenkinson TS, Richards-Hrdlicka K, Joneson S,

- Longcore J, Stajich J. 2012. Resolving the history of the emerging chytrid pathogen with whole genome data. In prep.
- Rowe CL, Kinney OM, Fiori AP & Congdon JD. 1996. Oral deformities in tadpoles (*Rana catesbeiana*) associated with coal ash deposition: effects of grazing ability and growth. *Freshwater Biology* 36:723–730.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4): 406-25.
- Sánchez Riera A, Daud A, Gallo A, Genta S, Aybar M & Sánchez S. 2003. Antibacterial activity of lactose-binding lectins from *Bufo arenarum* skin. *BIOCELL* 27(1): 37-46.
- Scarabotti PA. 2009. Pulso de inundación y la coexistencia de larvas de anfibios con peces en ambientes leníticos del valle de inundación del río Salado, (Santa Fe). Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba. 102pp.
- Searle CL, Gervasi SS, Hua J, Hammond JI, Relyea RA, Olson DH & Blaustein AR. 2011. Differential host susceptibility to *Batrachochytrium dendrobatidis*, an emerging amphibian pathogen. *Conservation Biology* 25:965–974
- Searle CL, Belden LK, Bancroft BA, Han BA, M.Biga L & Blaustein AR. 2010. Experimental examination of the effects of ultraviolet-B radiation in combination with other stressors on frog larvae. *Oecologia* 162:237–245.
- Seimon TA, Seimon A, Daszak P, Halloy SRP, Schloegel LM, Aguilar CA, Sowell P, Hyatt AD, Konecky B, Simmons JE. 2007. Upward range extension of Andean anurans and chytridiomycosis to extreme elevations in response to tropical deglaciation. *Global Change Biology* 13:288–299.
- Seimon TA, Hoernig G, Sowell P, Halloy S & Seimon A. 2005. Identification of chytridiomycosis in *Telmatobius marmoratus* at 4,450 m in the Cordillera Vilcanota of southern Peru. En: *Studies on the Andean frogs of the genera Telmatobius and Batrachophrynus*, 275–283. Lavilla, E.O. & de la Riva, I. (Eds.). *Monografías de Herpetología* 7. Asociación Herpetológica Española, Valencia.

- Siano AS, Zerbini E, Imaz S, Lajmanovich R, Tonarelli GG. 2010. Antimicrobial Peptides From *Leptodactylus Latrans* Skins Inhibit The Growth Of mycobacterium tuberculosis H37Rv STRAIN. 1° Reunión internacional de Ciencias Farmaceuticas. Cordoba 24-25 de junio de 2010. Accesible en: <http://www.fbioyf.unr.edu.ar/ricifa/Resumenes2010/Microbiologia/Siano,%20A.S.pdf>.
- Shapard EJ, Moss AS, San Francisco MJ. 2011. *Batrachochytrium dendrobatidis* can infect and cause mortality in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Mycopathologia [Epub ahead of print]
- Skerratt LF, Berger L, Speare R, Cashins S, McDonald KR, Phillott AD, Hines HB, Kenyon N. 2007. Spread of chytridiomycosis has caused rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth* 4, 125–134.
- Smith KG, Acevedo-Whitehouse K, Pedersen AB. 2009. The role of infectious diseases in biological conservation. *Animal Conservation* 12: 1-12.
- Smith KG, Weldon C, Conradie W & Du Preez LH. 2007. Relationship among size, development, and *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in African tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms* 74:159–164.
- Speare R, Core Working Group of Getting the Jump on Amphibian Disease. Nomination for listing of amphibian chytridiomycosis as a key threatening process under the Environment Protection and Biodiversity Conservation Action. 2001. En: Speare R, Steering Committee of Getting the Jump on Amphibian Disease, editors. Developing management strategies to control amphibian diseases: decreasing the risks due to communicable diseases. Townsville, Australia: School of Public Health and Tropical Medicine, James Cook University. p. 163–84. Available from <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/adms/attach7.pdf>.
- Speare R, Berger L, Skerratt LF, Alford RA, Mendez D, Cashins S, Kenyon N, Hauselberger K & Rowley JLL. 2004. Hygiene protocol for handling amphibians in field studies. Amphibian Disease Group, James Cook University, Townsville 4811, Australia. <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/field-hygiene.pdf>.

- Stallard RF. 2001. Possible environmental factors underlying amphibian decline in eastern Puerto Rico: analysis of U.S. government data archives. *Conservation Biology* 15:943–953.
- Stewart MM & Woolbright LL. 1996. Amphibians. In: Reagan DP and Waide RP (Eds). *The food web of a tropical rainforest*. Chicago, IL: University of Chicago Press.
- Stebbins RC and Cohen NW. 1995. *A natural history of amphibians*. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Stewart MM. 1995. Climate driven population fluctuations in rain forest frogs. *Journal of Herpetology* 28:369–378.
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, Waller RW 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306 1783–1786.
- Symonds EP, Hines HB, Bird PS, Morton JM, Mills PC. 2007. Surveillance for *Batrachochytrium dendrobatidis* using *Myxophyes* (Anura: Myobatrachidae) larvae. *Journal of Wildlife Diseases* 43:48–60.
- Swofford DL. 2003. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Toledo LF, Britto FB, Araújo OGS, Giasson LMO & Haddad CFB. 2006. The occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil and the inclusion of 17 new cases of infection. *South American Journal of Herpetology* 1: 185-191.
- Úbeda C, Lavilla E, Basso N. 2010. *Atelognathus patagonicus*. In: IUCN 2012. *IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2012.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 25 October 2012.
- Vaz-Ferreira R, Gehrau A. 1975. Comportamiento epitelético de la rana común *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia, Leptodactylidae) Atención de la cría y actividades alimentarias y agresivas relacionadas. *Physis. Sección B* 34(88): 1-14.
- Vredenburg VT, Knapp RA, Tunstall TS, Briggs CJ (2010) Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *PNAS* 107:9689-9694.

- Vredenburg VT, Summers AP. 2001. Field identification of chytridiomycosis in *Rana muscosa* (Camp 1915). *Herpetological Review* 32:151-152.
- Waldman B, Van de Wolfshaar KE, Klena JD, Andjic V, Bishop PJ, Norman RJB. 2001. Chytridiomycosis in New Zealand frogs. *Surveillance* 28:9-11.
- Walker SF, Bosch J, Gomez V, Garner TWJ, Cunningham AA, Schmeller DS, Ninyerola, M, Henk DA, Ginestet C, Arthur CP & Fisher MC. 2010. Factors driving pathogenicity vs. prevalence of amphibian panzootic chytridiomycosis in Iberia. *Ecology Letters* 13: 372-382.
- Weldon C. 2002. Chytridiomycosis survey in South Africa. *Froglog*. 51:1-2.
- Weldon C, du Preez HL, Hyatt A, Muller R & Speare R. 2004. Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases* 10: 2100-2105.
- Weldon CH & du Preez LH. 2004. Decline of the Kihansi spray toad, *Nectophrynoides asperginis*, from the Udzungwa Mountains, Tanzania. *Froglog* 62: 2-3.
- Wells KD. 1977. The social behavior of anuran amphibians. *Animal Behaviour*, 25:666-693.
- Whiles MR, Lips KR, Pringle CM, Kilham SS, Bixby RJ, Brenes R, Connelly S, Colon-Gaud JC, Hunte-Brown M, Huryn AD, Montgomery C & Peterson S. 2006. The effects of amphibian population declines on the structure and function of Neotropical stream ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment* 4(1): 27-34.
- Williams SE, Hero JM. 1998. Rainforest frogs of the Australian wet tropics: Guild classification and the ecological similarity of declining species. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 265(1396): 597-602.
- Woodhams DC, Bosch J, Briggs CJ, Cashins S, Davis LR, Lauer A, Muths E, Puschendorf R, Schmidt BR, Sheafor B & Voyles J. 2011. Mitigating amphibian disease: strategies to maintain wild populations and control chytridiomycosis. *Frontiers in Zoology* 8:8.
- Woodhams DC, Ardipradja K, Alford RA, Marantelli G, Reinert LK & Rollins-Smith LA. 2007a. Resistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and

- is correlated with skin peptide defenses. *Animal Conservation*, 10(4): 409-417.
- Woodhams DC, Vredenburg VT, Simon MA, Billheimer D, Shakhtour B, Yu Shyr, Briggs CJ, Rollins-Smith LA, Harris RN. 2007b. Symbiotic bacteria contribute to innate immune defences of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*. *Biological Conservation*. 138 (3-4):390-398.
- Woodhams DC, Voyles J, Lips K, Carey C, Rollins-Smith LA. 2006. Predicted disease susceptibility in a Panamanian amphibian assemblage based on skin peptide defenses. *Journal of Wildlife Diseases* ; 2(42): 207-218.
- Woodhams CD & Alford RA. 2005. Ecology of Chytridiomycosis in Rainforest Stream frog Assemblages of Tropical Queensland. *Conservation Biology* 19: 1449-1459.
- Woodhams DC, Alford RA, Marantelli G. 2003. Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Dis Aquat Org* 55:65–67.
- Young BE, Lips KR, Reaser JK, Ibanez R, Salas AW, Cedeno JR, Coloma LA, Ron S, La Marca E, Meyer JR, Munoz A, Bolanos F, Chaves G, Romo D. 2001. Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conservation Biology* 15(5): 1213-1223.
- Young S, Speare R, Berger L, Skerratt L & Mendez D (2007). Emerging Amphibian Diseases and Disease Surveillance in Queensland – Stage 1 (January 2006 – January 2007). Final report for the project Emerging Amphibian Diseases and Disease Surveillance in Queensland to the Australian Government Department of the Environment and Water Resources.
- Yumi U, Kadokaru S, Tamukai K, Goka K & Kuroki T. 2008. First report of spontaneous chytridiomycosis in frogs in Asia. *Diseases of Aquatic Organisms*. 82: 157-160.

ANEXO I

Tabla 1. Tabla 1. Ejemplares de anfibios analizados en el área de muestreo para la presencia de *Bd*. A: adulto; L: larva; Mt: muestreo por transectas; TP: trampas de caída; C. Hist: corte histológico. GSN: Guillermo S. Natale; MLA: María Luz Arellano.

Especies	Estadio	Fecha	Lugar	Coordenadas	msnm	Estado	Muestreo	<i>Bd</i>	Técnica	° de infección	n° ind.	Colector
<i>H. pulchellus</i>	A	26/08/2002	A. de muestreo, charca B	35° 1'15.63"S; 57°51'25.32"O	8	vivo	MT	-	C Hist.	—	303	GSN
<i>P. minutus</i>	A	26/08/2002	A. de muestreo charca B	35° 1'15.63"S; 57°51'25.32"O	8	vivo	MT	+	C Hist.	leve	304	GSN
<i>S. squalirrostris</i>	A	26/08/2002	A. de muestreo charca B	35° 1'15.63"S; 57°51'25.32"O	8	vivo	MT	-	C Hist.	—	305	GSN
<i>H. pulchellus</i>	L	22/10/2002	A. de muestreo charca O	35° 0'55.14"S; 57°51'31.48"O	7	vivo	MT	+	C Hist.	grave	306	GSN
<i>P. minutus</i>	L	04/11/2002	A. de muestreo charca B	35° 1'15.63"S; 57°51'25.32"O	8	vivo	MT	-	C Hist.	—	307	GSN
<i>P. minutus</i>	L	04/11/2002	A. de muestreo charca B	35° 1'15.63"S; 57°51'25.32"O	8	vivo	MT	-	C Hist.	—	308	GSN
<i>P. minutus</i>	A	15/10/2006	A. de muestre charca B	35° 1'15.63"S; 57°51'25.32"O	8	vivo	MT	-	C Hist.	—	170	MLA
<i>P. minutus</i>	A	15/10/2006	A. de muestreo charca B	35° 1'15.63"S; 57°51'25.32"O	8	vivo	MT	-	C Hist.	—	171	MLA
<i>P. minutus</i>	A	15/10/2006	A. de muestreo charca B	35° 1'15.63"S; 57°51'25.32"O	8	vivo	MT	-	C Hist.	—	172	MLA
<i>L. latrans</i>	J	26/06/2007	A. de muestreo	35° 1'4.99"S; 57°51'33.71"O	7	vivo	TP	+	C Hist.	leve	197	MLA
<i>L. latrans</i>	J	04/07/2007	A. de muestreo	35° 1'4.99"S; 57°51'33.71"O	7	muerto	TP	-	C Hist.	—	198	MLA
<i>L. latrans</i>	J	04/07/2007	A. de muestreo	35° 1'4.99"S; 57°51'33.71"O	7	muerto	TP	-	C Hist.	—	199	MLA
<i>L. latrans</i>	A	11/07/2007	A. de muestreo	35° 1'4.45"S; 57°51'28.56"O	8	muerto	TP	+	C Hist.	moderada	200	MLA

Tabla 2. Ejemplares de anuros de distintas regiones analizados para la presencia de *Bd*. A: adulto; J: juvenil; L: larva; RNI: Reserva Natural Integral; Ca. I. Santiago: camino a la Isla Santiago; al/d.epi: aletargado con descamación del epitelio; C. Hist: corte histológico; M: muda; Mic: visualización directa al M. óptico; DF: Daiana Ferraro; GA: Gabriela Agostini; DBar: Diego Barrasso; MLA: María L. Arellano; DB: Diego Baldo; JMF: J. M. Ferro; MP: M. Pereyra; LC: L. Coticelli; CT: C. Tomatis; GSN: G. S. Natale; RH: R. Herrera; LP: L. Pagano.

Especies	Estadio	Fecha	Lugar	Localidad	Coordenadas	msnm	Estado	<i>Bd</i>	Técnica	° de infección	n° col.	Depositado	Colector
<i>E. bicolor</i>	A	26/11/2005	Ruta Nacional n°12	Posadas-Misiones	27°26'37.3"S; 56°01'43" O	122	muerto		C. Hist.	grave	169	MLP A. 4631	DF
<i>T. marmoratus</i>	A	06/01/2006	Río Santa Catalina	Sta.Catalina Jujuy	21° 56' 53.3"S; 66° 03' 05.7"O	3827	muerto		C. Hist.	-	166	MLP A. 4710	DF
<i>H. aff. riojanus</i>	J	06/01/2006	Río Santa Catalina	Sta.Catalina Jujuy	21° 56' 53.3"S; 66° 03' 05.7"O	3827	muerto		C. Hist.	-	167	MLP A. 4711	DF
<i>H. aff. riojanus</i>	J	07/01/2006	Río Santa Catalina	Sta.Catalina Jujuy	21° 56' 53.3"S; 66° 03' 05.7"O	3827	muerto		C. Hist.	leve	168	MLP A. 4712	DF
<i>L. latrans</i>	A	12/05/2006	Reserva N.I.Punta Lara	Ensenada-Bs. As.	34°49'1.6"S; 58°3'14.52"O	2	al/d.epi		C. Hist.	moderada	161	MLP A. 4936	GA,Dbar.
<i>L. latrans</i>	A	12/05/2006	Ca. Isla Santiago	Ensenada-Bs. As.	34°50'5.03"S; 57°55'7.47"O	4	al/d.epi		C. Hist.	moderada	162	MLP A. 4937	GA,Dbar.
<i>P. falcipes</i>	A	15/10/2006	Frente al A. muestreo	La Plata- Bs. As.	35° 0' 12.6"S; 57° 52'3.5"O	18	vivo		C. Hist.	-	173	no	MLA
<i>H. pulchellus</i>	A	02/03/2007	Charca Frizon	La Plata- Bs. As.	34°59'5.30"S; 57°51'21.78"O	19	vivo		C. Hist.	-	174	no	MLA
<i>R. fernandezae</i>	A	30/09/2007	Zanja en Los Hornos	La Plata- Bs. As.	34°57'3.83"S; 58° 0'58.85"O	20	muerto		C. Hist.	-	201	no	AM
<i>S. fuscovarius</i>	A	15/10/2007	RN n° 12, Km 1329	Posadas-Misiones	27° 26' 37,3"S; 56° 01' 46"O	141	muerto		C. Hist.	-	203	DB 6042	DB,JMF,LC,MP,CT
<i>M. atroluteus</i>	A	16/10/2007	RN n° 12, Km 1330	Posadas-Misiones	27° 26' 37,3"S; 56° 01' 46"O	141	muerto		C. Hist.	-	202	DB 6043	DB,JMF,LC,MP,CT
<i>L. latrans</i>	A	28/05/2010	La Balandra	Beriso- Bs. As.	34°57'14.38"S; 57°44'43.76"O	4	al/d.epi		Corte y muda	grave	309	no	Dbar.
<i>L. latrans</i>	A	28/05/2010	Reserva N.I.Punta Lara	Ensenada-Bs. As.	34°47'7,82"S; 58° 0'57,30"O	5	al/d.epi		M/C. Histol.	-	312	no	Dbar.
<i>L. latrans</i>	A	08/07/2010	Reserva N.I.Punta Lara	Ensenada-Bs. As.	34°48'30.44"S; 58° 2'26.06"O	3	al/d.epi		M/ C. Histol.	-	310	no	GSN
<i>L. latrans</i>	A	08/07/2010	Reserva N.I.Punta Lara	Ensenada-Bs. As.	34°48'27.21"S; 58° 2'23.24"O	4	al/d.epi		M/ C. Histol.	-	311	no	GSN
<i>L. latrans</i>	A	15/07/2010	Arturo seguí	La Plata- Bs. As.	34°53'15.21"S; 58° 7'40.70"O	24	al/d.epi		Corte y muda	moderada	313	no	RH
<i>Physalaemus sp.</i>	L	13/12/2009	Campo Cauzuti	San Martín-Salta	22°2'47.97"S; 63° 44'52.44"O	957	vivo		MIC	-	321	no	LP
<i>Rhinella sp.</i>	L	13/12/2009	Río Caraparí	San Martín-Salta	22°05'35.22"S; 63°46'24.96"O	612	vivo		MIC	moderada	322	no	LP

Tabla 3. Datos meteorológicos de los meses de muestreos. Información suministrada por el Departamento de Sismología e Información Meteorológica-FCAG- UNLP

Valores Mensuales				
	Temperatura		Lluvia	
	Máxima	Mínima	Cantidad	Días
jul-02	20,1	-0,8	96,5	13
ago-02	30,8	3,3	77,8	6
sep-02	22,9	3,3	92,3	8
oct-02	30,4	6,1	59,2	11
nov-02	31,2	7,5	91,9	12
nov-04	29,4	6,9	117,4	14
dic-04	33,3	14,1	120,0	9
ene-05	36,9	11,0	148,6	6
feb-05	32,7	9,7	52,0	7
mar-05	32,6	9,6	119,3	8
abr-05	28,4	3,9	69,5	7
may-05	25,8	3,3	19,0	10
jun-05	24,9	1,6	73,2	13
jul-05	22,2	1,2	122,8	10
mar-06	29,8	9,7	157,4	7
abr-06	27,8	6,1	69,4	8
may-06	22,9	3,8	7,4	4
jun-06	22,9	3,9	85,6	11
jul-06	22,9	0,8	79,8	10
ago-06	24,6	0,8	12,4	8

sep-06	24,6	1,5	30,6	6
oct-06	31,1	7,6	123,4	9
mar-07	29,3	10,7	284,6	18
abr-07	30,1	6,6	126,0	9
may-07	22,5	0,9	61,2	5
jun-07	20,0	0,4	43,6	5
jul-07	19,3	-0,5	20,0	7
ago-07	23,5	0,6	58,0	8
sep-07	27,4	4,3	124,2	11
oct-07	27,9	7,6	237,6	13

Tabla 4. Tabla 4. Datos meteorológicos coincidentes con los hallazgos de *Bd* en los ejemplares muestreados. s/r: sin registro. Información suministrada por el Departamento de Sismología e Información Meteorológica-FCAG- UNLP.

Fecha	Datos diarios		Lluvia
	Temp. Máx	Temp. Mín	
26/08/2002	27,6	14,9	s/r
22/10/2002	21,6	8,0	s/r
26/06/2007	15,5	4,7	s/r
11/07/2007	11,1	-0,5	s/r
28/05/2010	18,8	15,4	0,4
08/07/2010	16,8	5,3	s/r
15/07/2010	8,9	0,6	s/r

Tabla 5. Temperaturas medias mensuales de los años 2006 y 2007. Información suministrada por el Departamento de Sismología e Información Meteorológica-FCAG- UNLP.

Temperatura Media Mensual		
	2006	2007
Marzo	19,4	20,8
Abril	17,3	17,7
Mayo	12,5	11,4
Junio	11,6	9,1
Julio	12,6	7,4
Agosto	10,7	8,1
Septiembre	13,4	14,6
Octubre	17,9	18,0

ANEXO II

Tabla 1. Estrategias de desinfección adecuadas para eliminar a *Batrachochytrium dendrobatidis* y ranavirus en estudios de campo. Cuando las concentraciones y el tiempo están especificados, se refieren a los mínimos eficaces para *Bd*. **Tabla adaptada de Speare et al. 2004.**

Propósito	Desinfectante	Concentración	Tiempo	Patógeno eliminado
Desinfectar equipos quirúrgicos y otros instrumentos (ej. escalas)	Etanol	70%	1 min	<i>Bd</i> Ranavirus
	Vircon	1 mg/ml	1 min	<i>Bd</i> Ranavirus
	cloruro de benzalconio	1 mg/ml	1 min	<i>Bd</i>
Desinfectar equipos de colección y contenedores	Hipoclorito de Sodio (lavandina)	1%	1 min	<i>Bd</i>
	Hipoclorito de Sodio (lavandina)	4%	15 min	Ranavirus
	Cloruro de didecil dimetil amonio	dilución 1 en 1000	0.5 min	<i>Bd</i>
	Secado total		3 hrs o más	<i>Bd</i>
	Calor	60°C	5 min	<i>Bd</i>
			15 min	Ranavirus
	Calor	37°C	4 hrs	<i>Bd</i>
Esterilización con luz UV		1 min	Solo Ranavirus	
Desinfección de calzado	Hipoclorito de Sodio (lavandina)	1%	1 min	<i>Bd</i>
	Hipoclorito de Sodio (lavandina)	4%	15 min	Ranavirus
	Cloruro de didecil dimetil amonio	Dilución de 1 en 1000	1 min	<i>Bd</i>
	Secado total		3 hrs o más	<i>Bd</i>
Desinfección de vestimenta (bolsos, ropa)	Lavado en caliente	60°C o más	5 min	<i>Bd</i>
			15 min	Ranavirus

Análisis del agua utilizada en bioensayos



ib Laboratorio Central de Salud Pública
INSTITUTO BIOLÓGICO
Dr. Tomás Perón



Ministerio de
Salud **Buenos Aires**
LA PROVINCIA

ORIGINAL

Expediente N° 2906-005069/11
La Plata, 14/09/2011



ANÁLISIS DE AGUA

Solicitado por: Manantial SAISIF

Domicilio: 66N° 1925 e/ 133 y 134

Localidad: Los Hornos Partido: La Plata

Extrajo: El Interesado Acta N°: 21

Análisis Físico-Químico

Análisis Químico N°: 276 Foja N°: 56 Libro N°: 28

Fuente Extracción: Agua de Pozo

	Valor Observado	Valor Excedido	Valor Permitido		Valor Observado	Valor Excedido	Valor Permitido
Color	Incoloro		N.L.	Amonio	0,00 mg/l		N.L.
Olor	Inodoro		N.L.	Nitritos	0,00 mg/l		3.0
Aspecto	Limpido		N.L.	Cloruros	35 mg/l		250
Sedimento	No Contiene		N.L.	Fluoruros	0,1 mg/l		1.5
Valor pH	6,7 UpH		6.5-8.5	Nitratos	17 mg/l		50
Alc HO (CO3Ca)	0 mg/l		N.L.	Sulfatos	0 mg/l		250
Alc CO3 (CO3Ca)	0 mg/l		N.L.	Conductividad	305 µS/cm		N.L.
Alc CO3H (CO3Ca)	115 mg/l		N.L.	Sól. Disueltos	190 mg/l		1500
Dureza en CO3Ca	84 mg/l		N.L.	Arsénico	N.A. mg/l		0.05

Observaciones:

Análisis Bacteriológico

Análisis Bacteriol. N° 915 Foja N°: 162 Libro N°: 104

Fuente Extracción: Agua de Pozo

Fecha Extracción: 23/08/2011

	Valor Observado	Valor Excedido
Cloro Residual	0,0 mg/l	
Escherichia Coli o coliformes fecales (1 ó 2)	< 2.2 NMP / 100 ml.	
Bacterias coliformes totales (1 ó 2)	< 2.2 NMP / 100 ml.	
Pseudomona aeruginosa (2)	Ausencia en 100 ml.	

Medidas a Adoptar:

Observaciones:

NOTAS: N.A. No Analizado - N.L. No Legislado - Los Parámetros resaltados exceden el Valor Permitido

Límites Tolerables Ley 11.820

(1) Técnica estandarizada de fermentación de tubos múltiples 2.2 NMP/100 ml.

(2) Enriquecimiento en 100 ml durante 24 horas: Ausencia

De acuerdo a las determinaciones efectuadas, el Producto es **POTABLE**
según Ley Provincial 11.820

FO-MF-D-AA-FQ-O

V° B°:

Pro. Qca. CAROLINA SERRAVALLO
a cargo
Unid. Análisis del Medio Fluido

Calle 526 entre 10 y 11 (B1906AAP) - La Plata
Tel.: 0221. 421-1142/1357/424-6090 - Fax: 0221.421-7630
E-mail: lcspr@ms.gba.gov.ar - www.ms.gba.gov.ar/laboratorio/index.htm

Permiso de Captura de ejemplares de anuros

PROVINCIA DE BUENOS AIRES
PODER EJECUTIVO

7

LA PLATA, 19 DIC 2006

Visto el Expte 22228-30/06, mediante el cual la Lic. María Luz Arellano, becaria del CONICET, Instituto de Botánica Carlos Spegazzini, solicita permiso para realizar investigaciones científicas sobre enfermedades fúngicas en anfibios (Orden: *Anura*), en el partido de La Plata; y

CONSIDERANDO:

puramente científicos;

estudios sobre Enfermedades fúngicas en anfibios (Orden: *Anura*) de Argentina, con énfasis en la Provincia de Buenos Aires;

legislación vigente;

sobre especies de la fauna de nuestra provincia son importantes para el manejo y conservación de las mismas;

Que dicha actividad tiene fines

Que la misma tiene por objeto realizar

Que lo propiciado encuadra en la

Que las investigaciones científicas

Por ello,

EL DIRECTOR DE CONTRALOR Y USO DE LOS RECURSOS NATURALES Y PESQUEROS

DISPONE:

ARTICULO 1°: Autorizar a los licenciados María Luz Arellano (DNI 27.643.163);
----- María Celeste Scattolini (DNI 32.147.402; Laura Ramírez Barrios (DNI 29.179.125; Emiliano José Guerrero (DNI 31.073.862 y Facundo Garnis (DNI 31.552.516), a capturar cinco (5) ejemplares de cada una de las especies listadas en el anexo I.

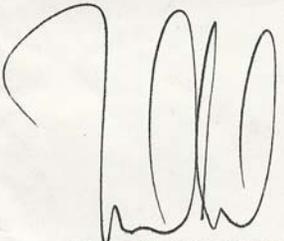
ARTICULO 2°: EL titular deberá contar con las medidas de bioseguridad pertinentes
----- para la realización de la actividad autorizada en la presente, siendo responsables de las consecuencias que pudieran derivar ante la falta de las mismas.

ARTICULO 3°: La Lic. María Luz Arellano deberá elaborar y girar al Departamento
----- Contralor de los Recursos Naturales un informe con el resultado de su investigación.

ARTICULO 4°: La presente Disposición tendrá validez hasta el 31 de diciembre de 2007.

ARTICULO 5°: Regístrese, comuníquese y pase al Departamento Contralor de los
----- Recursos Naturales, al interesado y archívese.

DISPOSICION DCyURNyP N° 7


 MANUEL ENRIQUE PEDREIRA
 DIRECTOR
 DIRECCION DE CONTRALOR Y USO
 DE LOS REC. NATURALES Y PESQUEROS
 MINISTERIO DE ASUNTOS AGRARIOS

PROVINCIA DE BUENOS AIRES
PODER EJECUTIVO

7

ANEXO I

Bufo arenarum arenarum
Bufo dorbignyi
Bufo fernandezae
Hyla nana
Hyla pulchela pulchela
Hyla sanborni
Scinax berthae
Scinax eringiophilus
Scinax nasicus
Scinax squalirostris
Ceratophrys ornate
Leptodactylus gracilis
Leptodactylus latinasus
Leptodactylus mystacinus
Leptodactylus ocellatus
Leptodactylus podicipinus
Odontophrynus americanus
Physalaemus albonotatus
Physalaemus biligonigerus
Physalaemus fernandezae
Physalaemus henselli
Pseudopaludicola falcipes
Elachistocleis aff. Bicolor
Lysapsus limeilus
Pseudis minutus

USO OFICIAL



MANUEL ENRIQUE PEDREIRA
DIRECTOR
DIRECCION DE CONTROL Y USO
DE LOS REC. NATURALES Y PESQUERIAS
MINISTERIO DE ASUNTOS AGRARIOS

