



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE LICENCIATURA EN
BIOTECNOLOGÍA**

**Caracterización y cambios estacionales de la
comunidad de hongos asociada a la piel de
Ambystoma dumerilii en el lago de Pátzcuaro**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener

El título profesional de

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta

Alicia Pérez Vieyra

Director de tesis:
Dr. Luis H. Escalera Vázquez

Co-Director de tesis:
Dra. Nancy Calderón Cortés



Morelia, Michoacán, Noviembre 2021

Agradecimientos Institucionales

Agradezco a las siguientes instituciones que financiaron este proyecto:

Conservation and long-term management of the Achoque (*Ambystoma dumerilii*) and its habitat. Zoológico de Chester UK.

Determinación del estado actual de las poblaciones de *Ambystoma dumerilii* en el lago de Pátzcuaro para la implementación de planes de manejo. Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP-UMSNH-PTC-406).

Ciencia Básica CONACyT 2015-253420.

DGAPA-PAPIIT-UNAM IN217420.

A los miembros de comité sinodal: Dr. Luis H. Escalera Vázquez, Dra. Nancy Calderón Cortés, Dra. Yurixhi Maldonado López, y Dr. Horacio Cano Camacho, por los comentarios y sugerencias brindados los cuales mejoraron de manera significativa este trabajo. En especial al Dr. Escalera y a la Dra. Calderón por su asesoría en el área experimental, analítica y a lo largo del desarrollo de mi tesis.

Al Dr. Jesús Llanderal Mendoza por el apoyo técnico recibido en la realización del trabajo de laboratorio, y a la Sra. Claudia Brenes por apoyo logístico con preparación de material de laboratorio.

Agradecimientos

Agradezco infinitamente a mis padres, a mi hermano Manuel, por apoyarme en todo a la distancia, sin ellos no habría cumplido este logro, por confiar en que podía cumplir una de mis metas.

A mis hermanas por estar en todo momento conmigo y guiarme.

A mi cuñado Antonio por la computadora para facilitar mis estudios.

A mis compañeros y amigos de clases, por sus consejos y apoyo.

CONTENIDO

RESUMEN 1

ABSTRACT 2

1.- INTRODUCCIÓN 3

2.- ANTECEDENTES..... 6

2.1.- Anfibios 6

2.2.- Interacciones del microbioma con la piel de anfibios 7

2.3.- Comunidades de hongos en anfibios..... 7

2.4.- El caso de *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) y *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal) 9

2.5.- Género Ambystoma 11

2.6.- Cuenca endorreica..... 12

3.- HIPÓTESIS..... 14

4.- OBJETIVOS 15

4.1.- Objetivo general..... 15

4.2.- Objetivos específicos 15

5.- CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO 16

5.1.- Características abióticas 16

5.2.- Geología y Suelos..... 16

5.3.- Fisiografía 17

5.4.- Morfometría..... 17

6.- MATERIALES Y MÉTODOS..... 18

6.1.- Colecta de individuos y toma de muestras..... 18

6.2.- Purificación y evaluación de ADN 20

6.3.- Amplificación, construcción de librerías y secuenciación..... 21

6.4.- Análisis de datos..... 21

7.- RESULTADOS..... 22

7.1.-Temperatura en las diferentes temporadas 22

7.2.- Diversidad de la micobiota 23

7.3.- Variación temporal de la micobiota 26

8.- DISCUSIÓN 31

9.- CONCLUSIONES 36

10.- LITERATURA CITADA..... 37

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1 *Ambystoma dumerilii* capturado para toma de muestras. 12

Figura 2 Localización del Lago de Pátzcuaro. El color azul representa el espejo del lago, el color café las localidades con mayor población y el naranja el estado de Michoacán..... 19

Figura 3 Toma de muestras de secreción de la piel de *A. dumerilii* usando la técnica de frotis con hisopos estériles. 20

Figura 4 Gráfica de caja y bigotes de las temperaturas obtenidas en las diferentes temporadas.. 22

Tabla 1 Lecturas totales de secuencias por muestra con valores de Q30 para la secuenciación de extremo emparejado de Illumina.. 23

Tabla 2 Especies identificadas a partir de los OTUs obtenidos con dominancia de los filos Ascomycota y Basidiomycota. 24

Figura 5 Abundancia relativa (%) de los diferentes grupos de hongos a nivel de division en las diferentes temporadas..... 26

Figura 6 Curva de rarefacción de hongos asociados a la piel de *A. dumerilii*. 27

Figura 7 Diversidad de hongos asociados a la piel de *A. dumerilii* en diferentes temporadas.. 28

Figura 8 Diversidad Beta de la comunidad de hongos asociados a la piel de *A. dumerilii*28

Tabla 3 Abundancia relativa los hongos asociados a la piel *A. dumerilii* a nivel de orden.29

Figura 9 Composición de la comunidad de hongos asociados a la piel de *A. dumerilii*. 30

RESUMEN

Las enfermedades por hongos en la fauna silvestre han incrementado en los últimos años, ocasionando una disminución drástica de las poblaciones y la extinción de especies a nivel local y regional. Las relaciones que existen entre los microorganismos y los ambientes en que se desarrollan juegan un papel fundamental en las propiedades y procesos de los ecosistemas. En anfibios, se ha reportado que los cambios ambientales están relacionados con las enfermedades fúngicas, ya que estos factores potencian el riesgo de infección. Sin embargo, la micobiota de la piel de los anfibios, también cumple una función de protección contra patógenos, por lo cual su estudio reviste importancia. *Ambystoma dumerilii* es una especie microendémica del Lago de Pátzcuaro amenazada por las actividades antropogénicas, para la cual no existe información sobre los microorganismos asociados a la piel, aunque existen reportes de la incidencia de hongos patógenos que amenazan a especies de este género. En el presente estudio se caracterizó la micobiota de la piel de *A. dumerilii*, con el objetivo de determinar la diversidad de hongos e incidencia de patógenos, mediante el análisis de la región que corresponde al ITS2 por secuenciación masiva. El análisis de las secuencias se llevó a cabo con el programa Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2. La asignación taxonómica se realizó con la base de datos UNITE. Los resultados obtenidos indican la presencia de 585 OTUs pertenecientes a 27 clados de hongos, de los cuales los *ascomycetos* representan el grupo más abundante. La presencia de *chytridiomicetos* se registró en algunos individuos, indicando que este grupo de hongos que incluye especies patogénicas, no se presenta de manera general en la piel de *A. dumerilii*. No se obtuvieron diferencias significativas en la composición de la comunidad de hongos a lo largo del año, aunque se detectaron cambios en la abundancia relativa de algunos taxa, indicando cambios estacionales en la micobiota. Estos resultados tienen implicaciones importantes para la conservación de la especie y para el estudio de enfermedades emergentes.

Palabras clave: hongos, *Ambystoma*, micobiota, OTUs.

ABSTRACT

Fungal diseases in wildlife have increased in recent years, causing a drastic decrease in populations and the extinction of species at the local and regional levels. The relationships that exist between microorganisms and the environments in which they develop play a fundamental role in the properties and processes of ecosystems. In amphibians, it has been reported that environmental changes are related to fungal diseases, as these factors enhance the risk of infection. However, the mycobiota of the skin of amphibians, also serves a function of protection against pathogens, so its study is important. *Ambystoma dumerilii* is a microendemic species from Lake Pátzcuaro threatened by anthropogenic activities, for which there is no information on microorganisms associated with the skin, although there are reports of the incidence of pathogenic fungi that threaten species of this genus. In the present study, the mycobiota of the skin of *A. dumerilii* was characterized, with the aim of determining the diversity of fungi and incidence of pathogens, by analyzing the region that corresponds to its 28S rDNA by massive sequencing. The analysis of the sequences was carried out with the Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2 program. The taxonomic assignment was made with the UNITE database. The results obtained indicate the presence of 543 OTUs belonging to 27 clades of fungi, of which *ascomycetes* represent the most abundant group. The presence of *chytridiomycetes* was recorded in some individuals, indicating that this group of fungi, which includes pathogenic species, does not occur generally in the skin of *A. dumerilii*. No significant differences were obtained in the composition of the fungal community throughout the year, although changes in the relative abundance of some taxa were detected, indicating seasonal changes in the mycobiota. These results have important implications for the conservation of the species and for the study of emerging diseases.

Keywords: fungi, *Ambystoma*, mycobiota, OTUs.

1.- INTRODUCCIÓN

El estudio de las diferentes funciones de microorganismos asociados a sus hospederos se ha incrementado de manera significativa en las últimas décadas, principalmente por el declive acelerado de poblaciones de vertebrados relacionadas a enfermedades emergentes causadas generalmente por hongos y bacterias (Fisher *et al.*, 2012). Esto ha promovido el estudio de los microorganismos y el papel que juegan no solo como agentes de enfermedades, sino también por la comunidad de microorganismos (microbiota) que se consideran un componente vital para la sobrevivencia de su hospedero y que puede variar a lo largo de la historia de vida de los hospederos, (McFall-Ngai *et al.*, 2013; Hird, 2017; Bordenstein y Theis, 2015). Las relaciones microorganismo-hospedero están relacionadas principalmente con la adecuación del hospedero, ya que modifican el almacenamiento y adquisición de energía (e.g. obtención de nutrientes), maduración del sistema inmune, comportamiento y protección contra patógenos (Hird, 2017).

En la última década, el estudio sobre las comunidades de microorganismos presentes en la piel de anfibios ha recibido gran atención, ya que presentan una función protectora contra patógenos, como el uso de algunas bacterias benéficas para mitigar infecciones (Medina *et al.*, 2019). Estas comunidades están compuestas por: bacterias, arqueas, hongos y eucariotas unicelulares, además de partículas virales; la composición y estructura de las mismas está altamente relacionada con la historia evolutiva, rasgos ecológicos y funciones fisiológicas vitales de sus hospederos (e.g. vertebrados; Hird, 2017).

La mayoría de los estudios sobre la relación microorganismo-hospedero se ha enfocado principalmente en bacterias, ya que se consideraban como principales agentes infecciosos, así como uno de los grupos históricamente más estudiados (Huffnagle y Noverr, 2013). Sin embargo, actualmente se reconoce que los hongos patógenos son una de las principales causas de declive de poblaciones animales, ya que al cambiar las condiciones ambientales, la abundancia de hongos patógenos puede aumentar del 1% al 28% de la abundancia total del microbioma (Jia *et al.*, 2018; Jousset *et al.*, 2017). Cabe mencionar que los hongos de vida libre son altamente diversos y se reporta que presentan papeles importantes en procesos ecológicos (e.g. mutualismo y antagonismos) en plantas (Peay *et al.*, 2016). También, existe evidencia de que generar simbiosis con animales-hospederos

promueve defensas a diferentes niveles (e.g. insectos cultivadores de hongos como hormigas, termitas y escarabajos descortezadores) (Ford y King, 2016). Por lo anterior, el estudio de especies y comunidades de hongos (patógenos y no patógenos) se ha incrementado considerablemente, enfocándose en la función que presenta con la relación de los hospederos (Meason-Smith *et al.*, 2015).

Estudios recientes sugieren que mientras el componente fúngico asociado a animales y a comunidades bacterianas son parte de la biósfera (<0.1% de células microbianas; Huffnagle y Noverr, 2013), la diversidad de hongos (incluyendo nuevos linajes) es más alta de lo esperado (Peay *et al.*, 2011). Aunado a lo anterior, se ha reportado que la respuesta de los hongos a cambios ambientales y antropogénicos (e.g. cambio climático global) es de manera diferencial, produciendo cambios en la comunidad de hongos en el hospedero, así como las funciones que dicha interacción genera (Virgin, 2014). Las modificaciones ambientales como el cambio de uso de suelo, la pérdida, fragmentación y contaminación del hábitat, son factores que promueven un incremento en la tasa de infección de hongos patógenos en vertebrados, ya que afectan de manera directa patrones reproductivos y el sistema inmune de los individuos, y de manera indirecta disminuyen la variabilidad genética e incrementan la probabilidad de extinción de poblaciones a nivel local y regional (Blaustein *et al.*, 1994; Daszak, y Hyatt, 2003; Lips *et al.*, 2008).

Dentro de los grupos de vertebrados altamente afectados por enfermedades emergentes producidas por hongos se encuentran los anfibios (Kilpatrick y Daszak, 2010). Una de las especies de hongos relacionadas al declive y extinción local de anfibios es *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd; filum *Chytridiomycota*), el cual afecta zonas queratinizadas (e.g. boca) de larvas y piel de adultos principalmente en dentículos y mandíbula, produciendo hiperqueratinización (engrosamiento de la piel) (Fellers y Green, 2001; Lips *et al.*, 2004). Dicha especie es cosmopolita, se presenta principalmente en hábitats acuáticos y en suelos húmedos. Son eficientes degradadores de celulosa, quitina y queratina; presentan un ciclo de vida de dos fases: una móvil acuática en la cual se dispersan las zoosporas; y la no móvil en la cual ocurre un enquistamiento como esporangio en el hospedero. (Berger *et al.*, 2005).

Lo anterior ha llevado a investigar el papel de las comunidades de hongos (micobiota) de la piel de anfibios (Kueneman *et al.*, 2015). Al contrario que en las bacterias, la diversidad de hongos asociada a vertebrados y las funciones que presentan son aún poco estudiadas en comparación con las comunidades bacterianas (Huffnagle y Noverr, 2013; Ford y King, 2016; Peay *et al.*, 2016).

Lo anterior cobra relevancia en el grupo de los anfibios, ya que a nivel mundial en las últimas tres décadas, este grupo presenta un declive en sus poblaciones y se reporta que ca. del 43% de las especies se encuentra en riesgo o en peligro de extinción a nivel local o regional (Lips *et al.*, 2008; NOM059-SEMARNAT-2001). Entre estas especies se encuentra el *Ambystoma dumerilii* (*Ambystomatidae*), la cual es una especie endémica del lago de Pátzcuaro, es conocida localmente como achoque y está catalogada en peligro crítico, principalmente a la degradación del hábitat (NOM059-SEMARNAT-2001; IUCN red list 2020).

En las últimas cuatro décadas, la cuenca del lago de Pátzcuaro ha presentado una tasa acelerada de evapotranspiración, lo que promueve un descenso en el nivel de agua del lago (Chacón-Torres *et al.*, 2004). Aunado a lo anterior, actividades antropogénicas como el crecimiento de las zonas urbanas, la deforestación y la erosión de los suelos promueven contaminación y eutrofización del cuerpo de agua, modificando la permanencia y ciclos de vida de las diferentes especies que habitan en el lago (Ramírez y Domínguez, 2012).

De manera indirecta, los diferentes cambios en el hábitat relacionados con actividades antropogénicas promueven la proliferación de enfermedades emergentes producidas por hongos o bacterias, así como producir cambios en el micobioma y las interacciones con el hospedero (Bird *et al.*, 2018).

Con base a lo anterior, en el presente estudio se caracterizó la micobiota presente en la piel de *A. dumerilii* en vida libre, y los cambios potenciales en un ciclo anual mediante el uso de Espaciadores Internos Transcritos 2 (ITS2, por sus siglas en inglés) e identificación taxonómica mediante secuenciación masiva.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Anfibios

Referirse a los anfibios implica hablar de uno de los grupos de fauna más diversos, siendo un amplio grupo de vertebrados el cual cuenta con cerca de 7,598 especies descritas en el mundo, y en México se distribuyen alrededor de 360, por lo que ocupa el quinto lugar entre los países con mayor diversidad de anfibios (Flores-Villela y Canseco-Márquez, 2004). Estos vertebrados se distinguen como un grupo monofilético por presentar características comunes en su morfología externa como piel lisa muy vascularizada sin protección que facilita el intercambio de gases y que incluye glándulas mucosas y lechosas que humectan la piel y secretan toxinas que funcionan como mecanismo de defensa y huevos sin membrana extraembrionaria, los cuales dependen de ambientes húmedos para evitar la desecación (Halliday y Adler, 2007; Vitt y Caldwell, 2009). Los anfibios presentan historias de vida altamente dinámicas y dependientes de manera simultánea tanto de ambientes acuáticos como terrestres; la mayoría de las especies presentan metamorfosis la cual está altamente relacionados con la dinámica ambiental (e.g. época de lluvias, cantidad de humedad, fases lunares, etc.) (Parra-Olea *et al.*, 2012). Los anfibios tienen funciones ecológicamente importantes, tales como la participación en procesos ecológicos reguladores del ecosistema, jugando un papel importante en las diferentes interacciones ecológicas (e.g. depredación, competencia, mutualismo, etc.) y actúan como mecanismos reguladores de la población de insectos (Young *et al.*, 2004).

Por lo anterior, se sugiere que este grupo de vertebrados es altamente sensible a cambios o perturbaciones naturales y antrópicas, tanto en ecosistemas acuáticos como terrestres, por lo que generalmente son utilizados como indicadores de cambios ambientales a escala local y regional (Hof *et al.*, 2011; Escalera-Vázquez *et al.*, 2018; Duellman y Trueb, 1986). En general la antropización tiene impacto negativo, afectando la abundancia y amplitud de distribución de las especies (Dirzo *et al.*, 2014). Aunque también hay casos donde este impacto ha producido efectos positivos sobre la variabilidad y persistencia de especies en ambientes modificados (Vallan, 2002), al igual que se podrían tener efectos sobre el sistema inmune innato y adquirido como el aumento de su respuesta actuando en sinergia con el microbioma (Young *et al.*, 2016a). Entre los ajustes asociados a las especies resilientes en

ambientes modificados se encuentran la atenuación de la respuesta al estrés y cambios en el microbioma, ya que una de las funciones del microbioma es entrenar y alertar la respuesta del sistema inmunológico para favorecer la sobrevivencia (resistencia a patógenos en poblaciones naturales) (Romero, 2004).

2.2.- Interacciones del microbioma con la piel de anfibios

El microbioma hace referencia a las comunidades de microorganismos que coexisten con un hospedero y que participan en diversos procesos que pueden ser vitales para el hospedero, las cuales pueden ir desde adquirir nutrientes, protección contra patógenos, entrenamiento del sistema inmune, correcto desarrollo y mantenimiento de varios tejidos (Huffnagle y Noverr, 2013). La interacción huésped-microorganismo a largo plazo depende de la transmisión o adquisición exitosa de los microorganismos en cada generación, dado que en algunos sistemas puede ocurrir predominantemente por transmisión vertical de padres a hijos (e.g. simbiosis; Hosokawa *et al.*, 2007).

La microbiota constituye un complejo ecosistema en permanente interacción con el huésped. Este ecosistema participa activamente en la doble función protectora de la piel, como barrera física e inmunológica. Por lo tanto, cuando el equilibrio del ecosistema se altera, se generan consecuencias negativas que predisponen y causan la aparición de enfermedades (Ackerman y Underhill, 2017).

2.3.- Comunidades de hongos en anfibios

En los últimos años, el papel de los microorganismos en los hospederos y las funciones que desempeñan desde una perspectiva ecofisiológica, ha generado cambios en los paradigmas sobre la importancia de la diversidad de microorganismos a diferentes escalas ambientales, ya que anteriormente, se consideraban principalmente como agentes causales de enfermedades, y en la actualidad se consideran como un componente vital para la sobrevivencia de su hospedador (Flórez *et al.*, 2015). Con este cambio de papel funcional de los microorganismos se han generado los términos como: holobionte/hologenoma que hace referencia a las comunidades de microorganismos que pueden actuar como una unidad de

selección, y microbioma (Bordenstein y Theis, 2015); que hace referencia a todas las comunidades de microorganismos que coexisten en un hospedero y participan en diversos procesos vitales (Hird, 2017). El estudio del microbioma tiene como objetivo principal comprender la función de las comunidades de microorganismos y su composición. Al día de hoy, para los anfibios, así como para otros huéspedes, es importante saber si los microorganismos asociados a los microbiomas de un hospedero cambian temporalmente y en qué medida, dado su papel defensivo contra los patógenos, y así comprender cuál es el papel que tienen en la salud de los anfibios (Bletz *et al.*, 2013).

La dinámica temporal de los microbiomas se encuentra ligada a la relación estructura-función, debido a que se reconoce que las relaciones entre un hospedero y el microbioma están influenciadas por distintas variables como la historia evolutiva, el genotipo, el comportamiento e historia de vida del hospedero (Ding y Schloss, 2014). Además de la alteración de las comunidades microbianas más allá del rango natural (disbiosis) asociada con el estrés ambiental, los cambios ambientales desfavorables causados por actividades antropogénicas pueden conducir a una mayor incidencia de ciertas enfermedades al hospedador (Bird *et al.*, 2018).

Hird, (2017) menciona que el estudio de los microbiomas de animales en vida silvestre es fundamental para entender la historia evolutiva de los organismos debido a las múltiples funciones que las comunidades de microorganismos llevan a cabo y que son vitales para la supervivencia de su hospedero. El microbioma de la piel de anfibios se está estableciendo como un sistema modelo para comprender las relaciones tripartitas entre el huésped, el microbioma y los patógenos. Un ejemplo es la producción de metabolitos por bacterias asociadas a la piel, ya que es un componente crucial de la defensa inmunológica contra patógenos fúngicos letales como *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) y *Batrachochytrium salimandrivorans* (Bsal) (Longo *et al.*, 2015).

Los anfibios tienen inmunidad innata, así como resistencia adicional a través de comunidades microbianas cutáneas. A pesar de que las bacterias se reconocen como posibles probióticos, se desconoce el papel de los hongos en la protección contra la infección por *Bd*. Por ejemplo, en un estudio se usó un enfoque de cuatro partes, incluida la secuenciación de alto rendimiento de las comunidades bacterianas y fúngicas, el cultivo de hongos, los ensayos de desafío con *Bd* y las adiciones experimentales de probióticos a los sapos partera (*Altyes obstetricans*) para examinar las funciones superpuestas de la microbiota bacteriana y fúngica en la defensa de patógenos en ranas flecha venenosas (*Dendrobates* sp.) mantenidas en cautiverio. Los resultados revelaron que los taxa de hongos cutáneos diferían de la microbiota ambiental en tres especies y una subespecie de *Dendrobates* spp. El cultivo de hongos ambientales y asociados con el hospedero proporcionó numerosos taxa con la capacidad de inhibir o facilitar el crecimiento de *Bd*. La abundancia de hongos cutáneos contribuyó más a la defensa contra *Bd* (~ 45% de la comunidad de hongos), que las bacterias (~ 10%), y las especies de ranas albergaron distintas comunidades inhibidoras que eran distintas del medio ambiente. En este estudio, además se demostró que una terapia con probióticos fúngicos no inducía una reacción endocrino-inmune, en contraste con los probióticos bacterianos que estresaron a los anfibios hospederos y suprimieron las respuestas de péptidos antimicrobianos, limitando su potencial de colonización a largo plazo (Kearns *et al.*, 2017).

2.4.- El caso de *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) y *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal)

Las enfermedades infecciosas ocasionadas por hongos han incrementado en los últimos años en los anfibios, principalmente las causadas por *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) y *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*), conocidas como quitridiomycosis, las cuales se han asociado a la disminución de poblaciones y extinción de especies (Martel *et al.*, 2013). Se ha comprobado que la quitridiomycosis actúa en sinergia con características ambientales (actividad antropogénica) y la historia de vida de los anfibios (Brem y Lips, 2008). En ambas especies de quitridios, la capacidad de infección está altamente relacionada a que son hongos activos en ambientes acuáticos y terrestres e infectan tanto la piel de individuos adultos por

contacto directo entre huéspedes, como mediante zoosporas presentes en el agua, así como partes bucales de larvas. Los quitidrios presentan formas de vida saprófita o parasítica y se caracterizan por tener una fase móvil infectiva y una fase sésil (Longcore *et al.*, 1999; Voyles *et al.*, 2011). Se alimentan de celulosa, quitina o queratina; ésta última presente en abundancia en la piel de anfibios, principalmente en dentículos y mandíbula, produciendo hiperqueratinización (engrosamiento de la piel) (Lips *et al.*, 2004). *Bd* se desarrolla principalmente en zonas templadas (a. 23 °C), y se ha reportado que crece más lentamente a menores temperaturas (Carey, 2000); mientras que la temperatura de desarrollo para *Bsal* ronda los 15 °C, y se ha reportado que no coloniza a temperaturas superiores a 25 °C (Blooi *et al.*, 2015a).

Con respecto a *Bd*, la prevalencia de la infección y la carga de infección exhiben una variación temporal y tal variación probablemente también caracteriza la dinámica de la enfermedad *Bsal*. (Kinney *et al.*, 2011). Un factor muy importante que impulsa esta variación es la temperatura, pero en general no se han comprendido bien los factores que impulsan esta variación debido al papel defensivo de la microbiota (Rohr *et al.*, 2008; Bustamante *et al.*, 2010). En cuanto a la epidemiología de estos dos patógenos, se sabe que *Bd* es capaz de infectar a especies pertenecientes a los tres órdenes de anfibios que se conocen, mientras que *Bsal* solo infecta a anfibios del orden caudata y está restringido a Europa y Asia (Kilpatrick *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta el papel defensivo de la microbiota cutánea, la variabilidad temporal de estas comunidades también puede ser un factor importante en la dinámica de dicha enfermedad, especialmente si se considera que la supervivencia de la población está relacionada con la proporción de anfibios con bacterias inhibidoras de *Bd*. (Lam *et al.*, 2010). Se ha demostrado que diversos compuestos químicos producidos por bacterias que forman parte del microbioma cutáneo de diversas especies de anfibios, son capaces de inhibir el crecimiento de zoosporas de *Bd*, tanto en ensayos in vitro como en ensayos donde se realizaron infecciones experimentales (Woodhams *et al.*, 2015). Hasta la fecha se han identificado y caracterizado cinco compuestos sintetizados por bacterias del microbioma cutáneo de diversas especies de anfibios, los cuales son: violaceina e indol-3-carboxialdehído (I3C) que son producidos por distintas cepas de *Janthinobacterium lividum* (Brucker *et al.*,

2008a), 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG) identificado en sobrenadantes de la bacteria *Lysobacter gummosus* (Brucker *et al.*, 2008b), triptofol es un metabolito producido únicamente en cocultivos de *Bacillus sp.* y *Chitinophaga arvensicol* (Loudon *et al.*, 2014b) y prodigiosina sintetizada por distintas cepas de *Serratia marcescens* (Woodhams *et al.*, 2018).

Los primeros registros de quitridiomycosis en México comenzaron en la década de 1980, cuando Scott, (1993) observó una mortalidad masiva en individuos postmetamórficos de la especie de rana *Lithobates tarahumare* distribuidos desde Arizona hasta Sonora, los cuales presentaron síntomas producidos por chitridios (Bd). Por otro lado, un declive dramático de las poblaciones de salamandras de los géneros *Bolitoglossa*, *Thorius*, *Pseudoeurycea* y *Chiropterotriton* en los estados de Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Hidalgo y Nuevo León, con síntomas de quitridiomycosis fue documentado por Parra-Olea *et al.*, (1999) y Rovito *et al.*, (2009).

2.5.- Género *Ambystoma*

Los anfibios del orden caudata (salamandras) dependiendo de la etapa de su ciclo de vida pueden ser terrestres o acuáticos, cuentan con diferentes rasgos morfológicos caracterizándose por presentar un cuerpo cilíndrico, surcos laterales cola larga y 4 extremidades de un tamaño similar, aunque en algunas especies existe la pérdida o reducción de las extremidades posteriores (Halliday y Adler, 2007). Dentro de este orden se encuentra la familia *Ambystomatidae*, la cual se compone únicamente del género *Ambystoma* que incluye 35 especies con distribución desde el sur de Canadá y Alaska, hasta el límite sur del altiplano Mexicano (Casas-Andreu *et al.*, 2004). En México se distribuyen 17 especies, de las cuales 16 son endémicas; a diferencia de lo que les ocurre a las salamandras y otros anfibios metamórficos, los *Ambystomas* no presentan muda de piel y en algunas especies los adultos son paedomórficos o neoténicos, es decir, que alcanzan la madurez sexual con características larvarias, por ejemplo, la retención de branquias y la permanencia de su forma acuática (Ortega, 1999).

El *Ambystoma dumerilii* (achoque; figura 1) es endémico del lago de Pátzcuaro, esta especie es de talla mediana (con alrededor de 25 cm) la cabeza esta redondeada y se

presenta aplanada dorsoventralmente, presenta un color verde claro, con tonalidades violeta y café, tiene un color más claro en las extremidades y en la región ventral; en los costados presenta manchas blanquecinas, en cabeza y dorso se pueden presentar depresiones por la presencia de glándulas en la piel y su pliegue gular es visible (Aguilar-Miguel, 2005). Es utilizado como alimento por tener un alto contenido energético, como medicina en tratamientos de vías respiratorias y asma, siendo estas sus principales amenazas debido a la sobre explotación de las poblaciones de achoque para su venta y consumo (Frías-Álvarez *et al.*, 2010).



Figura 1 *Ambystoma dumerilii* capturado in situ para la toma de muestras.

2.6.- Cuenca endorreica

El lago de Pátzcuaro pertenece a la cuenca endorreica del mismo nombre, en la cual la dinámica hídrica está altamente relacionada con la precipitación, la evaporación, y presenta un alto contenido de oxígeno disuelto, desde la superficie del agua hasta el fondo (Chacón, 1993); presenta una clara heterogeneidad en sus características físicas y químicas (Sánchez-Chávez *et al.*, 2011). Permitiendo clasificar el lago en tres zonas distintas; La zona sur, la zona centro y la zona norte (Zambrano *et al.*, 2011). La zona sur es la región más somera (hasta 0.15 metros) y perturbada del lago, pues posee el asentamiento humano más importante de la cuenca (la ciudad de Pátzcuaro) y recibe tres descargas municipales que no cuentan con un tratamiento adecuado (Pátzcuaro, Janitzio y Erongarícuaro) (Chacón-Torres *et al.*, 2004; Sánchez-Chávez *et al.*, 2011). En esta zona, las actividades humanas son muy frecuentes, sobre todo las turísticas en la isla de Janitzio. El combustible de las embarcaciones y la resuspensión de sedimento a causa de los motores son factores que alteran la calidad del

agua en esta zona somera (Lindig-Cisneros y Zambrano, 2007). La zona norte del lago es la más profunda y se caracteriza por el uso de suelo agrícola en las riberas. Esta zona recibe el impacto de las poblaciones de Quiroga, Santa Fe de la Laguna, Tzintzuntzan y San Jerónimo. La calidad del agua, con base en los valores ICA de Sanchez-Chavez, (2011) es intermedia (63.73 ± 1.81 , unidades ICA) entre la zona sur (60.33 ± 1.70 , unidades ICA) y centro (68.86 ± 1.16 , unidades ICA). La descarga municipal más importante es la de Tzintzuntzan, cuyo tratamiento también es deficiente (Sánchez-Chávez *et al.*, 2011). La zona centro se considera la región más conservada del lago. El uso de suelo predominante es el forestal y los poblados aledaños (Tarerio, Ucasanastacua y Oponguio) son los que cuentan con un menor número de habitantes (INEGI, 2010). El índice de la calidad del agua en esta zona presenta los valores más altos en comparación con las demás zonas (Sánchez-Chávez *et al.*, 2011).

Como ya sabemos tanto factores biológicos y ambientales como pueden ser el hábitat, la variación temporal y la historia de vida del hospedero influyen sobre la composición del microbioma, cada uno en diferente medida. Por lo tanto, en este estudio analizamos el micobioma del *A. dumerilii* en el lago de Pátzcuaro para determinar cambios en la diversidad de hongos relacionados a la dinámica estacional al igual que la presencia de hongos patógenos.

3.- HIPÓTESIS

La diversidad de hongos asociados a la piel de *Ambystoma dumerilii* en el lago de Pátzcuaro presentará cambios relacionados a la dinámica estacional favoreciendo la presencia de hongos patógenos en temporada cálida.

4.- OBJETIVOS

4.1.- Objetivo general

Determinar la diversidad y variación temporal de hongos asociados a la piel de *Ambystoma dumerilii* en el Lago de Pátzcuaro.

4.2.- Objetivos específicos

Identificar los grupos taxonómicos de hongos asociados a la piel de *Ambystoma dumerilii*, así como su variación estacional.

Identificar la presencia de hongos potencialmente patógenos asociada a la piel de *Ambystoma dumerilii*.

Analizar la presencia de hongos patógenos asociada a la piel de *Ambystoma dumerilii* y su actividad infecciosa potencial relacionada a la dinámica ambiental.

5.- CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

El lago de Pátzcuaro es un lago de alta montaña localizado en la región sur del Altiplano Mexicano, situado en la parte centro norte del estado ($19^{\circ}31'$ y $19^{\circ}42'$ N, $101^{\circ}43'$ Y $101^{\circ}43'$ O). Pertenece a una Cuenca endorreica donde el balance hidrológico se encuentra controlado por la diferencia entre precipitación y evaporación, siendo un sistema bien mezclado y con alto contenido de oxígeno disuelto, desde la superficie del agua hasta el fondo (Chacón, 1993). Presenta un clima templado con lluvias en verano - C(w2)(w)b(e)g -, una oscilación térmica de 7 a 14°C , la temperatura y precipitación promedio anual son de 16.4°C y 1041.2 mm respectivamente (García, 1973).

5.1.- Características abióticas: La cuenca del lago de Pátzcuaro es cerrada de dimensiones pequeñas, teniendo en la dirección este-oeste una longitud de 50 km y en dirección norte-sur una longitud de 33 km (Garduño, 2000). Colinda al oriente con la Cuenca del Río Grande de Morelia, al poniente con el Río Lerma y al sur con la Cuenca del Lago de Zirahuén. El lago no cuenta con efluentes ni ríos tributarios importantes, siendo alimentado por arroyos temporales durante la temporada de lluvias; las entradas de agua al vaso lacustre derivan exclusivamente de la lluvia estacional y la infiltración, por lo que las variaciones de nivel son continuas. Sin embargo, se ha registrado un promedio de altitud de 2035 metros sobre el nivel del mar (Chacón *et al.*, 1991).

5.2.- Geología y Suelos: El lago de Pátzcuaro forma parte del Corredor Tarasco el cual alberga más de mil conos volcánicos de tipo monogénico con una composición calccalcalina formada por rocas volcánicas del Cenozoico y de sedimentos lacustres de origen fluvial (Garduño, 2000). Las rocas de la era Terciaria son principalmente andesitas que contienen olivina, albita, biótita, augita e hiperstenos. (Chacón, 1993). Los suelos andosoles son originados a partir de cenizas volcánicas, con un alto contenido en fósforo, siendo muy susceptibles a la erosión (Toledo y Barrera-Bassols, 1984; Chacón *et al.*, 1991). También, se presentan luvisoles localizados en las regiones con mayor actividad volcánica en la cuenca, los cuales son muy susceptibles a la erosión. También se pueden encontrar suelos Acrisoles, Vertisoles y Gleysoles, éste último es un componente geológico primario de las riberas del lago (Chacón, 1993).

5.3.- Fisiografía: La Cuenca del lago de Pátzcuaro forma parte de un sistema de cuencas lacustres enclavado en el Cinturón Volcánico Transmexicano que es una amplia franja que va del Océano Pacífico al Golfo de México constituida por materiales ígneos de finales del Mesozoico y principios del Cenozoico. Caracterizada por ser una altiplanicie situada a más de 2000 m.s.n.m de la que sobresalen numerosos cerros de varios cientos de metros de altura como el Cerro de San Andrés (2400 m.s.n.m), San Isidro (3200 m.s.n.m), Grande (2800 m.s.n.m), Tingambato (2550 m.s.n.m), San Miguel (2500 m.s.n.m), El Frijol (3150 m.s.n.m), El Zirate (3340 m.s.n.m), y El Umbicho (m.s.n.m) (Garduño, 2000).

5.4.- Morfometría: Se considera a la morfometría como un factor determinante en la productividad de un cuerpo de agua ya que el análisis de sus diferentes magnitudes proporciona información que puede ser relacionada con los nutrientes y la energía que recibe el sistema. El lago tiene forma de “C”, con un perfil básicamente homogéneo, con una pendiente de relieve suave en zonas litorales y más abruptas en las zonas limnéticas y con una rugosidad del fondo media característica de una región volcánica (Chacón-Torres, 1992). La batimetría del lago realizada por Chacón-Torres *et al.*, (1989), registra que las profundidades máximas se encuentran en la parte norte y las más someras en el sur. Las profundidades máximas registradas son 15 m (De Buen, 1944), 12 m (Chacón-Torres, 1992), 10.25 m (Chacón, 2000). La profundidad media del lago de Pátzcuaro es de 4.9 m y el volumen total de lago fue estimado en un total de 628.4 millones de metros cúbicos (Chacón-Torres *et al.*, 1989). El lago posee ocho islas, la más grande de ellas conectada a tierra firme por un camino de terracería, mientras que otras dos se encuentran separadas por pantanos y angostos canales artificiales.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.- Colecta de individuos y toma de muestras

Se determinaron tres sitios de muestreo dentro del lago de Pátzcuaro situados en la parte norte, entre las localidades de San Jerónimo, Quiroga y Ojo de agua (figura 2). En cada sitio de muestreo se colocó una línea de 250m con 70 trampas artesanales tipo nasa. Se consideró una separación de 3-5m de distancia entre cada trampa y una profundidad de 5-8m en la columna de agua, con coordenadas en la Línea 1 = 19°39'49"N 101°35'23"O; 19°39'45"N 101°35'39"O Línea 2 = 19°40'11.6"N 101°35'47.4"O; 19°40'01.6"N 101°36'01.5"O Línea 3 = 19°39'54.8"N 101°35' 53.3"O; 19°39'51"N 101°35'59"O. Los muestreos se realizaron mensualmente de febrero 2018 a noviembre 2018 en los tres sitios, con la ayuda de los pescadores de la localidad. Simultáneamente se colocaron dispositivos de medición de temperatura y penetración de la luz (HOBO Pendant 64k) a lo largo de la línea de pesca entre 1 y 3 m de profundidad.

A cada individuo capturado, se le tomaron tres muestras de secreciones de la piel, utilizando la técnica de frotis con hisopos estériles. Para lo cual se tomó al achoque con guantes y se froto varias veces el hisopo sobre toda la superficie del cuerpo, incluyendo branquias y extremidades (figura 3). Los palillos de soporte de los hisopos se cortaron y se conservaron en microtubos estériles con etanol al 70% teniendo cuidado de que el palillo de cada hisopo no toque la tapa del microtubo y se transportaron al laboratorio donde se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

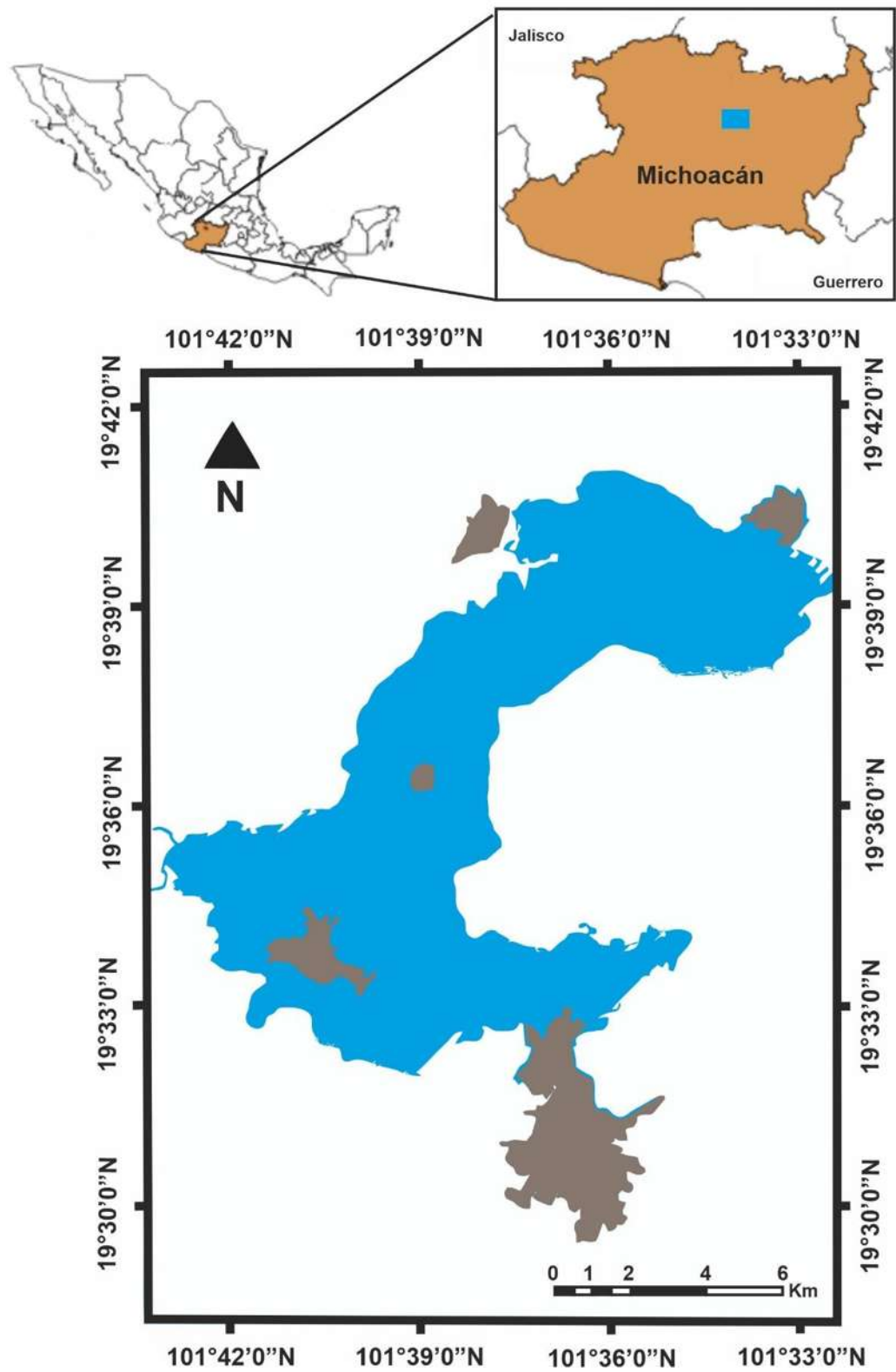


Figura 2 Localización del Lago de Pátzcuaro. El color azul representa el espejo del lago, el color café las localidades con mayor población y el naranja el estado de Michoacán.



Figura 3 Toma de muestras de secreción de la piel de *A. dumerilii* usando la técnica de frotis con hisopos estériles.

6.2.- Purificación y evaluación de ADN

A partir de una muestra de frotis por individuo se realizó la purificación de DNA mediante el uso del sistema comercial Tissue and Blood DNeasy (QIAGEN) de acuerdo a las instrucciones sugeridas por el fabricante, con una modificación en el paso de lisis celular, para la cual se usaron microperlas de zirconio (QIAGEN) y un homogenizador de tejido (Tissue Lyser, QIAGEN). Para la purificación de DNA, inicialmente se removió el hisopo y se conservaron las fibras de algodón. Las muestras se sometieron a evaporación del etanol en un ultracondensador de vacío a 40°C (CENTRIVAP) durante 15-25 minutos. Posteriormente se agregó el buffer de extracción y las microperlas de zirconio a cada muestra y se sometieron a 2 ciclos de lisado celular durante 30 segundos seguidos por incubación en hielo 30 segundos. Concluida la lisis celular se continuo con el protocolo de extracción siguiendo las instrucciones del fabricante (Tissue and Blood DNeasy, QIAGEN).

Para evaluar la integridad del DNA purificado, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con el fluoróforo SYBR safe (Invitrogen) a 80V durante 30 minutos.

La concentración del DNA purificado se determinó mediante un fluorómetro Qubit (Invitrogen).

6.3.- Amplificación, construcción de librerías y secuenciación

El análisis de la microbiota presente en la piel de *Ambystoma dumerilii* se realizó mediante la amplificación y secuenciación de la región ribosomal de DNA conocido como espaciador interno transcrito (ITS2) usada como marcador universal o "barcode" para la identificación taxonómica de especies de hongos (Schoch, 2012; <https://unite.ut.ee/>), usando los primers: 3F: 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3' y 4R: TCCTCCGCTTATTGATATGC. La amplificación del ITS2, así como la generación de las librerías y secuenciación masiva del amplicón se llevó a cabo mediante el servicio comercial Macrogen usando la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq con lecturas pareadas de 300 bp, con un total de 100,000 lecturas por muestra.

6.4.- Análisis de datos

Para determinar diferencias en temperatura entre las distintas temporadas, se utilizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA). Previo al ANOVA, se realizaron pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk's) y homocedasticidad (Bartlett) tomando como nivel de significancia $p \leq 0.05$. Si los datos de temperatura presentaron diferencias significativas en las pruebas de normalidad y homocedasticidad se realizaron ANOVAs no paramétricos. En los casos que presentaron diferencias significativas, se llevaron a cabo comparaciones pareadas (e.g. Tukey-Kramer HSD o Wilcoxon, según sea el caso).

El preprocesamiento de secuencias (trimming, demultiplexing, remoción de químeras y emparejamiento) se llevó a cabo con el programa Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2 (QIIME2, ver. 2018.8.0, <https://qiime2.org/>), usando el algoritmo DADA2. Para la asignación taxonómica se utilizó la base de datos UNITE (<https://unite.ut.ee/>) utilizando la última versión de la base de datos liberada con criterios de asignación dinámicos (97%, 99% y 100%). Los análisis de diversidad se llevaron a cabo mediante el algoritmo `core_diversity_analyses.py` disponible en QIIME2.

7.- RESULTADOS

7.1.-Temperatura en las diferentes temporadas

Los datos obtenidos de temperatura no presentaron una distribución normal ($W = 0.947$, $P < 0.001$) y no se ajustaron al modelo de homocedasticidad ($K^2 = 452.22$, $gl = 2$, $P < 0.001$), por lo que se realizó un ANOVA no paramétrico. Dicho análisis mostró diferencias significativas entre las temporadas (Kruskal-Wallis: $\chi^2 = 1577.5$, $gl = 2$, $P < 0.001$). La mayor temperatura se registró en la temporada cálida ($\bar{x} = 20.13 \pm DE 1.40$), seguida de la temporada templada (20.78 ± 1.20) y la temporada fría (17.64 ± 2.07).

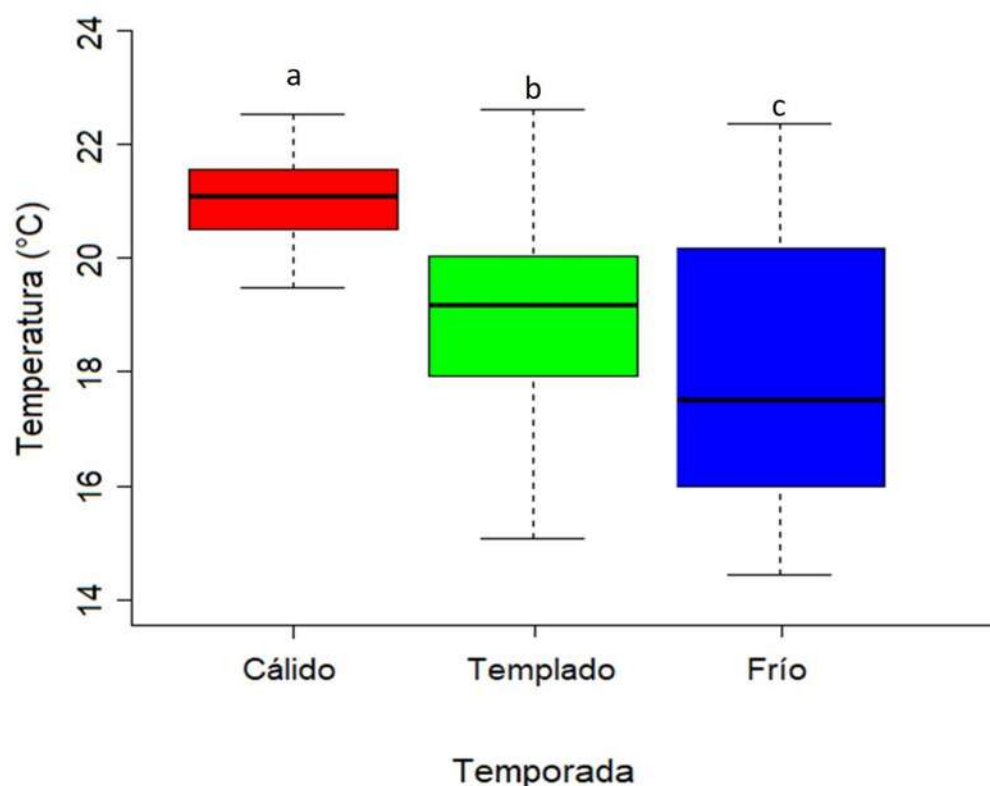


Figura 4 Gráfica de caja y bigotes de las temperaturas obtenidas en las diferentes temporadas. La cajas y líneas punteadas verticales representan los cuartiles y las líneas verticales la mediana. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.2.- Diversidad de la micobiota

Con base en los resultados, se obtuvieron 389,000- 542,000 lecturas totales de secuencias por muestra con valores de Q30 mayores al 86.5% (tabla 1) y se identificó un total de 585 OTUs. De manera general, se identificaron 97 OTUs asociados a hongos, de los cuales 44 OTUs fueron asignados a nivel de especie (tabla 2). Estas comunidades de hongos asociados a la piel de *A. dumerilii* están constituidas por un porcentaje variable de hongos no identificados, con mayor predominancia del filo Ascomycota, seguido por el filo Basidiomycota y Chytridiomycota, el cual presenta una baja abundancia (figura 5). Es importante resaltar que los Chytridiomycetes estuvieron presentes sólo en 2 individuos de la temporada templada, equivalente al 14.44% de las muestras analizadas. Sin embargo, la especie no se identificó con las secuencias de ITS disponibles en la base de datos UNITE.

Tabla 1 Lecturas totales de secuencias por muestra con valores de Q30 para la secuenciación de extremo emparejado de Illumina. Este valor se refiere a la suma de leer 1 y leer 2. **GC (%)**: Contenido de GC, **AT (%)**: Contenido de AT, **Q20(%)**: Proporción de bases que tienen un puntaje de calidad phred superior a 20, **Q30(%)**: Proporción de bases que tienen un puntaje de calidad phred superior a 30.

ID de la muestra	Total bases de leídas (bp)	Lecturas totales	GC (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
C-xx245OH1	136,274,138	452,738	46.15	53.85	93.04	86.75
C004OH1	158,115,902	525,302	47.95	52.05	93.48	87.93
C004OH2	155,739,206	517,406	47.44	52.56	93.24	87.59
L-Am-1	117,272,008	389,608	47.31	52.69	93.13	86.84
OH2	132,683,810	440,810	45.51	54.49	93.9	88.09
OHC1	119,832,916	398,116	46.05	53.95	93.91	88.24
OHC3	163,167,886	542,086	47.44	52.56	93.05	87.24
C-001VL	87,479,630	290,630	44.81	55.19	95.19	89.22
CAI2JOC	102,715,046	341,246	56.64	43.36	93.07	84.95
CHCBJOC	102,393,578	340,178	56.67	43.33	93.05	85.0
L-Am2	75,832,134	251,934	53.54	46.46	91.61	84.55
L-Am3	100,520,154	333,954	48.11	51.89	94.34	88.74
OH1	74,104,394	246,194	46.58	53.42	94.95	89.54
OH3	106,099,490	352,490	47.5	52.5	94±.5	89.0
S-Am1	64,377,278	213,878	56.07	43.93	89.01	80.59
S-Am2	72,815,512	241,912	52.01	47.99	92.11	84.86

Tabla 2 Especies identificadas a partir de los OTUs obtenidos con dominancia de los filos Ascomycota y Basidiomycota.

Ascomycota	Basidiomycota
<i>Fusarium acutatum</i>	<i>Malassezia arunalokei</i>
<i>Fusarium solani</i>	<i>Malassezia globosa</i>
<i>Penicillium coffeae</i>	<i>Tylospora fibrillosa</i>
<i>Penicillium hetheringtonii</i>	<i>Schizophyllum commune</i>
<i>Penicillium kongii</i>	<i>Udeniomyces pyricola</i>
<i>Aspergillus caesiellus</i>	<i>Kockovaella sacchari</i>
<i>Aspergillus cibarius</i>	<i>Malassezia restricta</i>
<i>Aspergillus penicillioides</i>	<i>Symmetrospora foliicola</i>
<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Wallemia canadensis</i>
<i>Microdochium paspali</i>	<i>Wallemia tropicalis</i>
<i>Simplicillium lamellicola</i>	<i>Peniophora albobadia</i>
<i>Zasmidium dalbergiae</i>	<i>Paraphoma fimeti</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Tomentella sublilacina</i>
<i>Roussoella solani</i>	<i>Irpex hydroides</i>
<i>Candida sake</i>	<i>Sebipora aquosa</i>
<i>Scopulariopsis candida</i>	<i>Lepista personata</i>
<i>Engyodontium album</i>	<i>Papiliotrema flavescens</i>
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Amphinema byssoides</i>
<i>Exophiala mesophila</i>	<i>Puccinia oxalidis</i>
<i>Westerdykella nigra</i>	
<i>Paraphaeosphaeria parmeliae</i>	
<i>Aureobasidium namibiae</i>	
<i>Devriesia fraseriae</i>	
<i>Coniothyrium dolichi</i>	
<i>Ascotricha chartarum</i>	

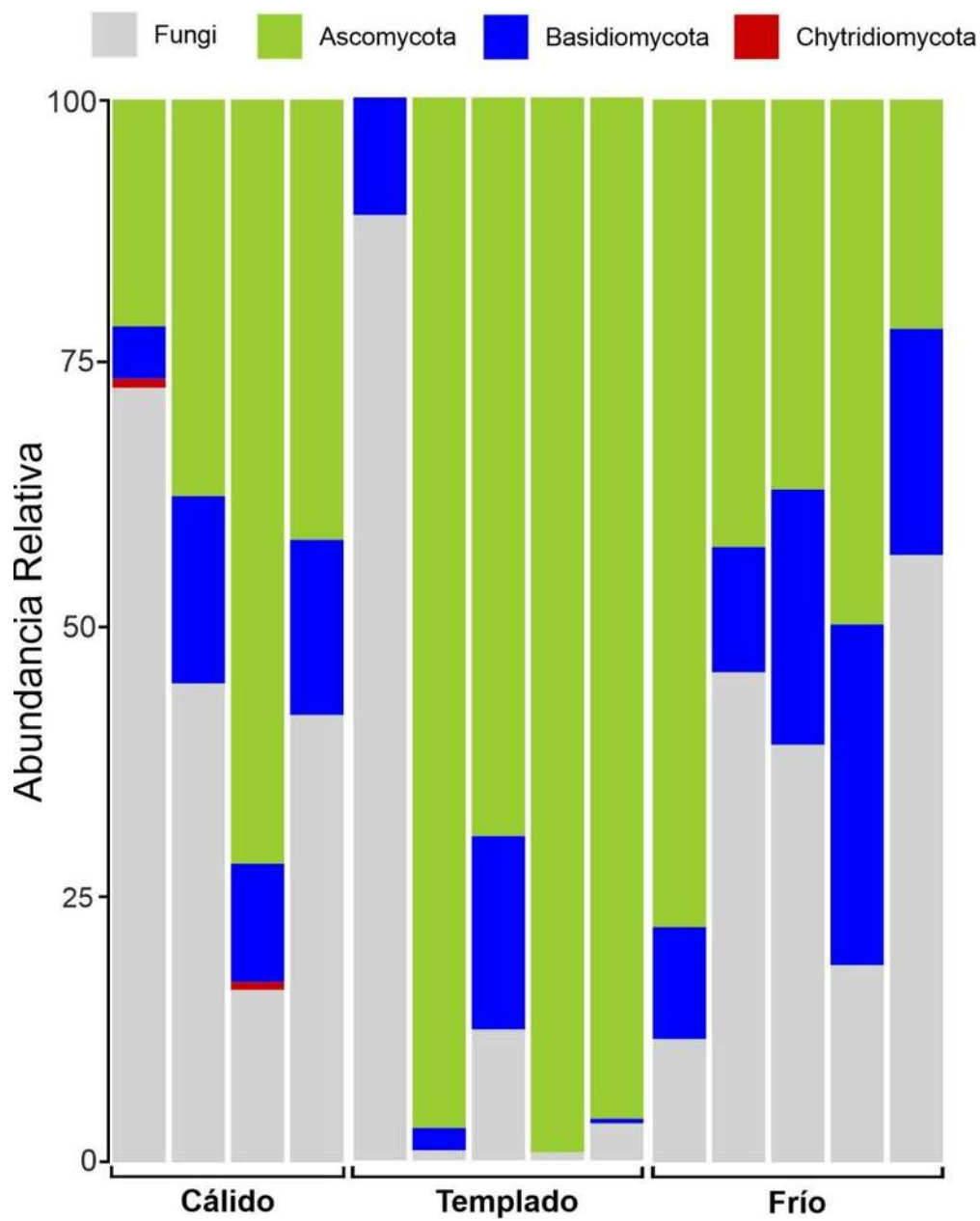


Figura 5 Abundancia relativa (%) de los diferentes grupos de hongos a nivel de división en las diferentes temporadas.

7.3.- Variación temporal de la micobiota

Con base en el análisis de rarefacción, utilizando los diferentes OTUs de hongos identificados, se obtuvo que en las tres temporadas se alcanza la asíntota, lo que sugiere que con base en la técnica de secuenciación utilizada, la riqueza de OTUs está representada en su totalidad. Además, el análisis de rarefacción muestra que en la temporada cálida hay una mayor riqueza de OTUs (90 OTUs), seguida de la temporada fría (65 OTUs) y por último la temporada templada (57 OTUs) (figura 6).

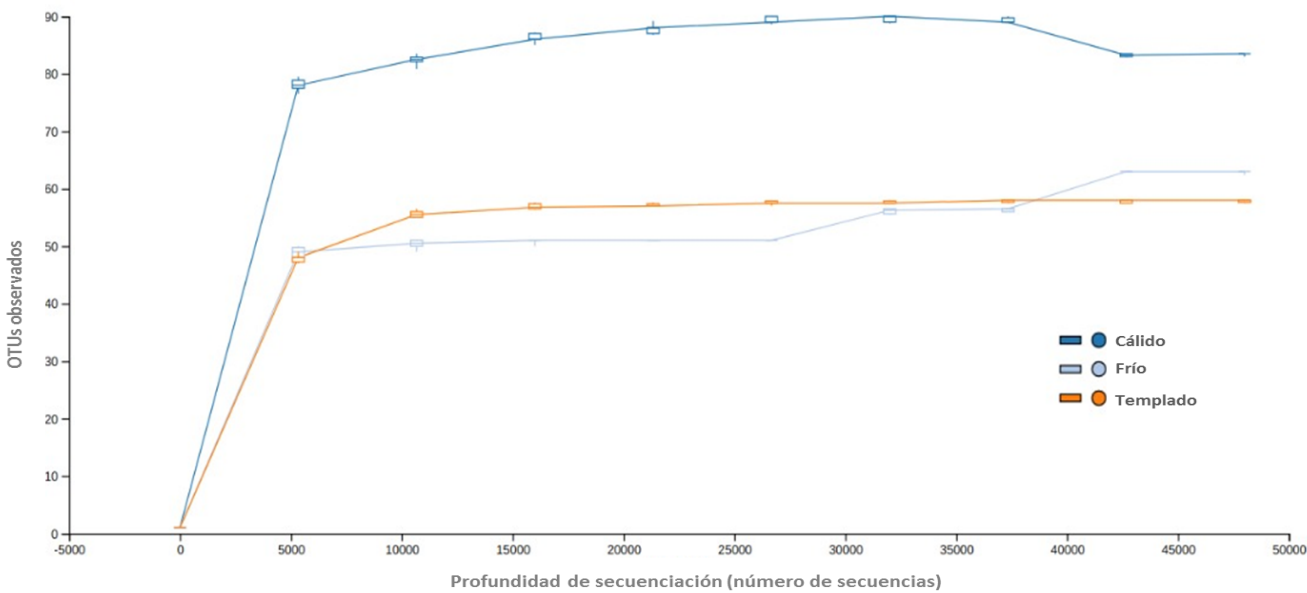


Figura 6 Curva de rarefacción de hongos asociados a la piel de *A. dumerilii*. La curva de rarefacción se generó en QIIME2 utilizando la estimación del número de OTUS por temporal.

Los resultados de diversidad alfa para la riqueza de OTUs de hongos asociados a la piel de *A. dumerilii* indican que existe diferencia significativa entre las temporadas ($F=8,85$, $P=0.005$), mostrando al igual que el análisis de rarefacción que la temporada cálida es la que presenta mayor promedio en el número de OTUs (90 ± 25.5), seguida de la temporada fría (54 ± 9.35) y templada (52.6 ± 10.64 ; figura 7A).

Respecto a la variación temporal en términos de diversidad alfa estimada mediante el índice de Shannon, se obtuvo que la temporada cálida es la que presenta un mayor promedio en la diversidad de OTUs (3.96 ± 0.66), seguida de la fría (3.40 ± 0.24) y por último la templada (3.13 ± 1.42). Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas ($F=1.103$, $P=0.366$) entre temporadas (figura 7B), posiblemente debido a la variación entre muestras encontrada en la temporada templada.

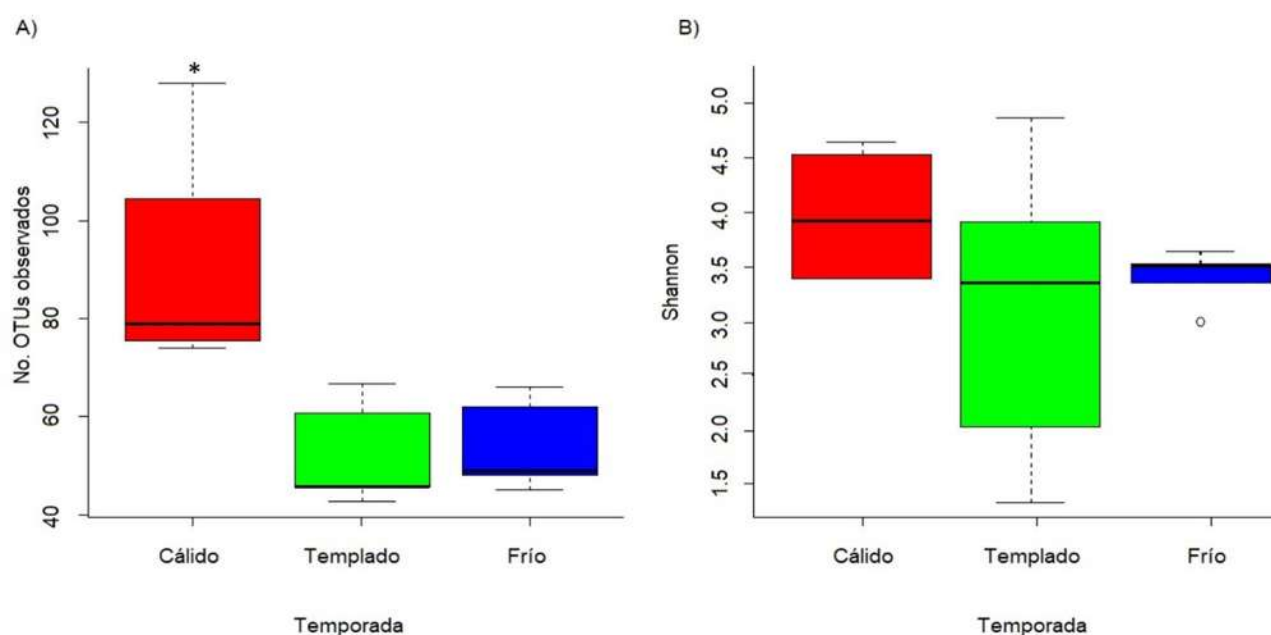


Figura 7 Diversidad de hongos asociados a la piel de *A. dumerilii* en diferentes temporadas. A) Número de OTUS observados. B) Índice de Shannon. Los análisis estadísticos se realizaron mediante comparaciones por pares de Kruskal-Wallis en QIIME 2. El asterisco indica diferencia significativa ($P<0.02$).

Con base en el análisis de PCOA, se sugiere que la diversidad beta de hongos asociados a la piel de *A. dumerilii* en la temporada templada presenta un agrupamiento (de muestras) más claro que en las otras temporadas, lo que sugiere diferencias en la composición y estructura de las comunidades entre temporadas (figura 8).

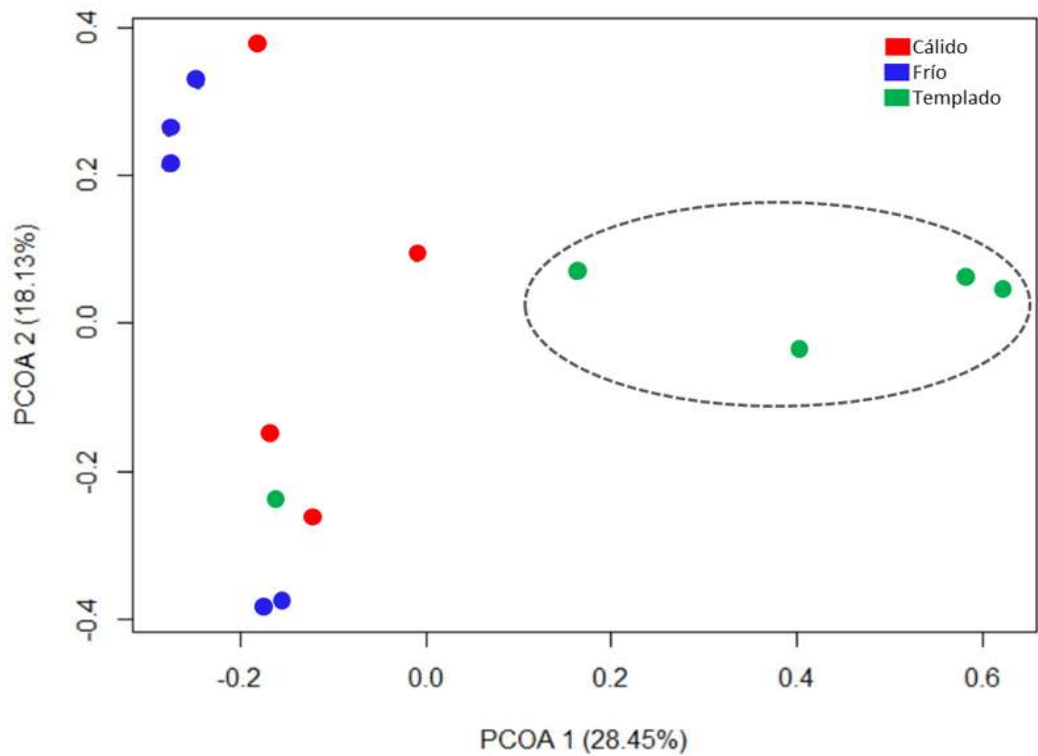


Figura 8 Diversidad Beta de la comunidad de hongos asociados a la piel de *A. dumerilii*. Análisis de Coordenadas Principales (QIIME2) basado en matriz de disimilitud de Bray Curtis.

Esta diferencia en la estructura de la comunidad está relacionada con cambios en la abundancia relativa de diferentes órdenes que incluyen: Pleosporales, Eurotiales, Chaetothyriales, Saccharomycetales e Hypocreales dentro de los Ascomycota; y Malasseziales dentro de los Basidiomycota (tabla 3). En específico, los cambios de la temporada templada pueden estar asociados al incremento en la abundancia relativa de *Fusarium* (Hypocreales) y *Penicillium* (Eurotiales), y la disminución de la abundancia de Pleosporales y Malasseziales (tabla 3; figura 9).

Tabla 3 Abundancia relativa los hongos asociados a la piel de *Ambystoma dumerilii* a nivel de orden en las temporadas de muestreo. La abundancia relativa se expresa en porcentaje. Los cambios más importantes entre temporadas se resaltan con negritas.

Orden	Temporada cálida				Temporada templada				Temporada Fría					
ASCOMYCOTA														
Capnodiales	4.69	8.65	33.31	13.54	0.00	0.88	26.54	0.14	0.95	44.38	23.50	8.87	21.24	6.45
Dothideales	0.00	0.00	0.00	0.84	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Pleosporales	2.52	16.40	9.47	13.18	0.00	1.85	0.55	0.41	0.00	3.80	4.43	15.02	5.42	4.66
Chaetothyriales	5.04	4.44	0.00	3.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Eurotiales	3.04	2.39	6.35	6.25	0.00	14.99	28.18	2.16	32.20	0.00	9.19	0.00	5.37	0.00
Erysiphales	0.00	0.00	9.83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Helotiales	1.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.02	0.00	0.00	9.24	0.00	5.04
Saccharomycetales	2.62	0.00	2.40	1.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.48	0.00
Diaporthales	0.00	0.00	2.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Hypocreales	0.00	3.92	1.80	0.00	0.00	78.91	14.23	96.47	61.91	11.28	2.64	3.57	5.71	0.00
Microascales	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.52	0.00
Xylariales	0.00	1.52	3.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
BASIDIOMYCOTA														
Agaricales	0.00	0.00	1.44	0.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.10	0.00	0.00	9.66	0.00
Atheliales	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	16.83	0.00	0.00	0.00	0.00	11.82	12.87	9.40
Cantharellales	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polyporales	0.00	2.40	0.00	1.53	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Russulales	0.00	2.61	0.00	1.94	0.00	0.36	0.00	0.00	0.00	2.28	0.00	0.00	0.00	0.00
Thelephorales	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	12.19	0.00	0.00
Trechisporales	0.71	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Cystobasidiomycetes	2.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Malasseziales	0.00	10.37	7.01	0.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.14	2.68	0.00	9.53	6.54
Sporidiobolales	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Pucciniales	0.00	0.00	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Cystofilobasidiales	0.00	0.00	0.00	10.61	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Filobasidiales	0.00	0.00	0.00	0.97	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.34
Tremellales	2.00	2.24	0.00	0.00	0.00	0.00	1.37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ustilaginales	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.09	0.00	0.00	0.00
Wallemiales	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.73	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
CHYTRIDIOMYCOTA	0.85	0.00	0.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

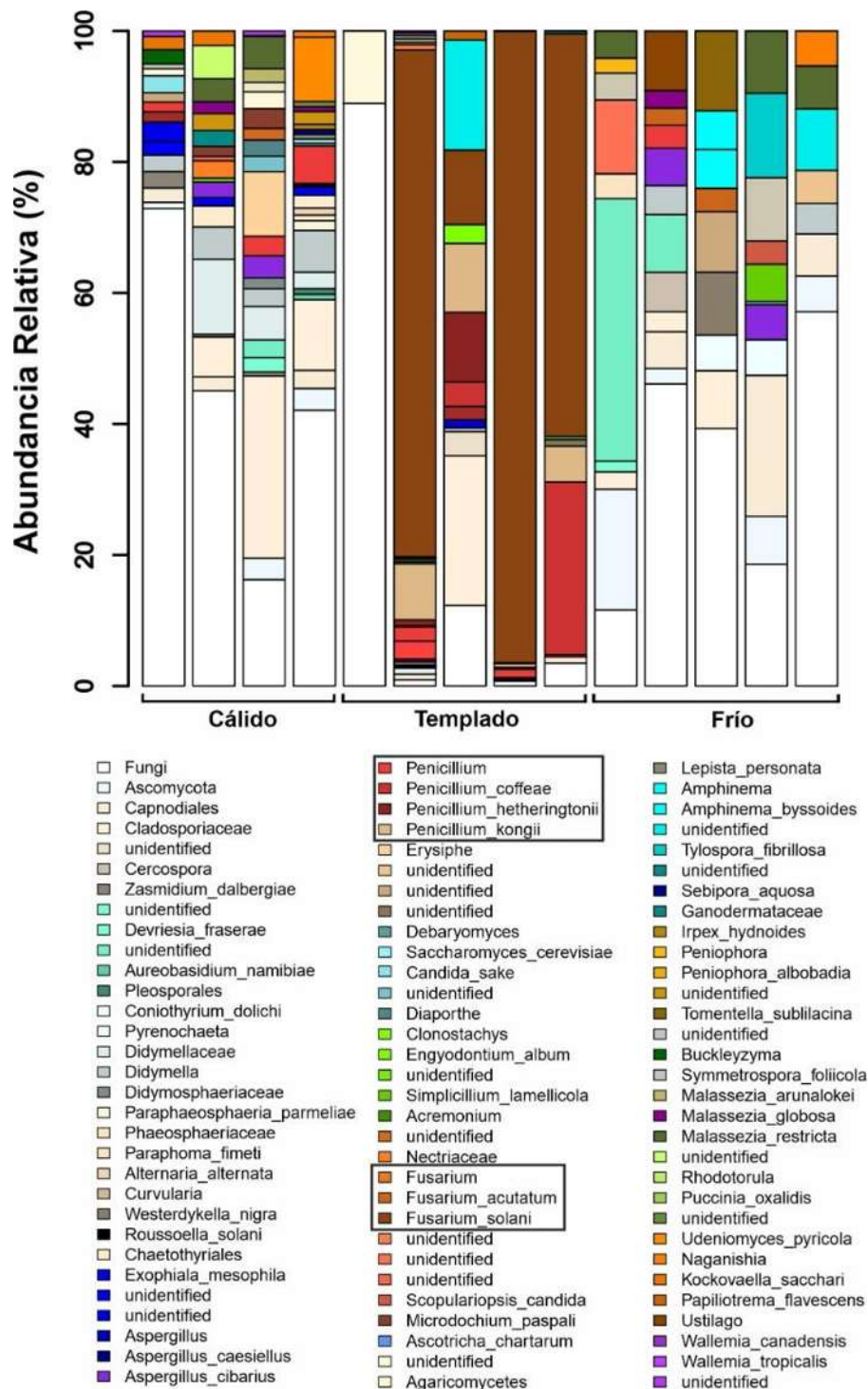


Figura 9 Composición de la comunidad de hongos asociados a la piel de *A. dumerilii*. Abundancia relativa de las categorías con el menor nivel taxonómico identificado mediante la base de datos UNITE para ITS de hongos.

8.- DISCUSIÓN

Actualmente es cada vez más aceptado que el microbioma de los animales participa en interacciones simbióticas con su hospedero en procesos vitales, que pueden ir desde adquirir nutrientes, protección a patógenos, hasta el desarrollo y mantenimiento de tejidos, y adecuación (Huffnagle y Noverr, 2013; Medina *et al.*, 2019). Para el establecimiento de estas interacciones se reportan factores como el genotipo, el comportamiento e historia de vida y evolutiva del hospedero (Ding y Schloss, 2014). Sin embargo, otros factores como las condiciones ambientales y la variación estacional también podrían determinar la estructura-función de diferentes interacciones microbioma-hospedero. Por lo anterior, en este trabajo se caracterizó la diversidad de hongos (micobiota) asociados a la piel de *A. dumerillii* en el lago de Pátzcuaro considerando tres temporadas a lo largo de un año de muestreo (época cálida, templada y fría).

De manera general, los resultados de este estudio muestran la presencia de OTUs identificados dentro de los filas Basidiomycota, Chytridiomycota y Ascomycota, con una mayor dominancia (en términos abundancia relativa) de éste último. Estos hongos son comunes en la mayoría de los sistemas naturales, y en el caso de los Ascomycota y Basidiomycota, diferentes especies están involucradas en interacciones bióticas en sistemas terrestres (*e.g.* simbiosis micorrízica y endofítica; Peay *et al.*, 2016), y en asociaciones con los seres humanos (Huffnagle y Noverr, 2013; Peay *et al.*, 2016). La mayoría de los OTUs identificados en este estudio corresponden a hongos asociados a la piel de anfibios involucrados en interacciones mutualistas, comensales, y en algunos casos con potencial infeccioso.

Los resultados del presente estudio, también muestran cambios estacionales en la presencia de diferentes especies de hongos, lo que sugiere que la composición de la micobiota de la piel de *A. dumerillii* está relacionada a cambios ambientales, y que dicha composición se modifica a lo largo del año conforme a los cambios en las variables fisicoquímicas del agua como es el caso de la temperatura (Muletz *et al.*, 2012; Loudon *et al.*, 2014a).

Estudios previos reportan que la diversidad del microbioma de anfibios promueve resistencia ante hongos y bacterias infecciosas, ya que se ha sugerido que la resistencia a patógenos (*e.g.* Bd), está altamente relacionada a que en la piel, los anfibios albergan taxa de hongos inhibidores o supresores de Bd del filo Ascomycota, en comparación con las especies

hospederas más susceptibles (Kearns *et al.*, 2017). Esto resalta el potencial de las simbiosis defensivas entre animales y hongos, lo que abre una ventana de investigación sobre las sustancias inhibidoras producidas por diferentes especies de hongos y bacterias presentes en diferentes hospederos ante el ataque potencial de enfermedades relacionadas con el declive de especies de anfibios (Flórez *et al.*, 2015). Con base en lo anterior, nuestros resultados muestran la presencia de hongos inhibidores de bacterias (e.g. *Penicillium coffeae*, *P. hetheringtonii*, *P. kongii*), que podrían ayudar al hospedero a reducir la abundancia y presencia de bacterias patógenas, además se ha demostrado que la terapia con prebióticos fúngicos no induce una reacción endocrino-inmune ya que inducen una menor tasa de secreción de corticosterona (como medida de estrés) y no suprimen la producción de péptidos antimicrobianos por parte del huésped (Kearns *et al.*, 2017). Esta respuesta se ha obtenido con *Penicillium expansum* en hospederos del género *Dendrobates* sp. en los cuales la abundancia de hongos presentes en la piel contribuye significativamente con la defensa de patógenos fúngicos (~45%), a diferencia de las bacterias (~10%), e inclusive pueden ser diferentes a las comunidades presentes en el microhábitat del ambiente (Kearns *et al.*, 2017).

El grupo de hongos en la piel de anfibios reportado mayormente para organismos tanto en cautiverio (ver Kearns *et al.*, 2017) como en vida libre (ver Flórez *et al.*, 2015) son los Ascomycota. Por ejemplo, las especies hospederas *Dendrobates leucomelas*, *D. auratus*, *D. tinctorious* “*azureus*” y *D. tinctorious* y *Anaxyrus (Bufo) boreas boreas*, presentan un gran número de especies de este grupo, y dentro de éstos se sugiere que, *D. leucomelas* y *A. boreas boreas* presentan resistencia a infecciones relacionadas a especies del grupo Chytridiomycota (e.g. Bd), ya que en comparación con especies hospederas más susceptibles, presentan taxa de hongos y bacterias (e.g. Betaproteobacteria, Bacteroidetes/Chlorobium; *Janthinobacterium lividum* y *flavobacterium johnsoniae*) en el microbioma implicados en la inhibición del Bd (Kearns *et al.*, 2017). En los individuos analizados en el presente estudio, se identificaron OTUs de los grupos Ascomycota con mayor abundancia relativa, seguida de Basidiomycota y con menor frecuencia Chytridiomycota, resaltando que el hospedero *A. dumerilii* no presentó síntomas de infecciones causadas por patógenos como (e.g. Bd), por lo que se sugiere que la micobiota de esta especie en vida libre, actúa como defensa a bacterias y hongos con potencial infeccioso, lo que promueve interacciones a través de

retroalimentaciones positivas o negativas sobre las especies microbianas involucradas (Faust y Raes, 2012; Kueneman *et al.*, 2017; Hird, 2017).

Para el género *Ambystoma*, particularmente para *A. dumerillii* en cautiverio, se han reportado pruebas positivas para Bd pero sin síntomas de enfermedad, por lo que se sugiere que la abundancia de Bd es baja y se encuentra en el límite inferior de detección (Michaels *et al.*, 2018). Por otro lado, en larvas de *A. opacum* que fueron inoculadas con Bd, se observaron síntomas leves de queratinización asociados a la enfermedad, sin llegar a ser mortal. Lo anterior sugiere que antes de la metamorfosis, las larvas de *A. opacum* pueden presentar bajas intensidades de infección por Bd pero sin resultados mortales (Venesky *et al.*, 2010). Lo anterior cobra relevancia para la especie *A. dumerillii*, ya que en vida libre no se reporta metamorfosis para esta especie, lo que puede estar relacionado a su historia de vida y características de hábitat como es: anfibio que completa su ciclo de vida en el agua y se encuentra principalmente a profundidades entre los 8 y 12 m y a temperaturas entre los 12 y 17°C (Escalera-Vázquez, datos sin publicar).

Cabe resaltar que la actividad de cada especie de hongo (infeccioso o no) presente en la piel de anfibios está en función de factores ambientales como los cambios en la temperatura. Nuestros resultados mostraron que el filo Basidiomycota predomina en la temporada templada, esto debido a que la temperatura óptima de desarrollo de este filo va de los 26° a 34°C. Por otro lado, Ascomycota predominó en la época fría ya que este filo se desarrolla entre temperaturas de -40° a 80°C (Gimeno, 2002); y Chitrydiomycota en la temporada cálida, siendo que las temperaturas óptimas de desarrollo de este filo van de los 23° y 30°C, reportándose en algunos casos en ambientes con temperaturas de hasta 40°C (Carey, 2000).

Uno de los géneros dominantes en términos de abundancia relativa que se encontraron en la época templada en el presente estudio fue *Fusarium* spp. Dicho género saprófito, está presente en suelos, aire y agua, y en muchas ocasiones son patógenos de plantas (Zhang *et al.*, 2006), animales terrestres y acuáticos incluyendo invertebrados (Burns *et al.*, 1979; Bian y Egusa, 1981; Santana-Neto *et al.*, 2010; Salter *et al.*, 2012), reptiles (Cabañes *et al.*, 1997; Rose *et al.*, 2001; Dadone *et al.*, 2010; Sarmiento-Ramírez *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2012), peces (Ostland *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1989; Crow *et al.*, 1995),

mamíferos marinos (Montali *et al.*, 1981; Frasca *et al.*, 1996; Clauss *et al.*, 2008; Staggs *et al.*, 2010; Naples *et al.*, 2012; Tanaka *et al.*, 2012) y anfibios (Perpiñán *et al.*, 2010). *Fusarium solani* tiene la capacidad de degradar la queratina (López-Jodra y Torres-Rodríguez, 1999; Oyeka y Gughani, 1998) y diferentes especies de *Fusarium* producen micotoxinas y proteasas con propiedades similares a las de la tripsina y la subtilisina, potencialmente tóxicas para la epidermis y la dermis (Hay, 2007; Oyeka y Gughani, 1998). Cabe mencionar que la patogenicidad de este hongo en anfibios ha sido reportada para *Bufo baxteri*, la cual es una especie altamente susceptible a dermatitis fúngica (Perpiñán *et al.*, 2010). Particularmente, para el género *Ambystoma* sp. no se encontraron reportes de enfermedad por este hongo, por lo que se sugiere que la abundancia de este hongo en la piel de *A. dumerillii* puede estar más relacionado a la presencia del mismo en el ambiente. Sin embargo, no podemos descartar que aun cuando no se observaron síntomas de infección en los individuos analizados, el sistema inmune no estuviera de alguna manera comprometido, ya que en diferentes especies animales este hongo se disemina de manera local provocando un sistema inmunocomprometido al huésped y aumentando la mortalidad (Hiemenz *et al.*, 1990; Gupta *et al.*, 2000; Anaissie *et al.*, 2001; Dignani y Anaissie, 2004; Gutiérrez *et al.*, 2011).

Por otro lado, en el presente estudio, los OTUs relacionados a los Chytridiomycetes presentaron bajas abundancias en las tres temporadas de muestreo y considerando que los individuos de *A. dumerillii* no presentaron síntomas de infección, se sugiere que la presencia y abundancia de *Penicillium* sp, puede inhibir el crecimiento de Chytridiomycetes, la cual fue mayor en las tres temporadas en comparación con la de Chytridiomycetes. En este sentido, es importante resaltar que en la temporada templada no se encontraron OTUs de Chytridiomycetes y fue la temporada con mayor abundancia de *Penicillium*. Lo anterior sugiere que la dinámica temporal está ligada a la relación estructura-función de la microbiota y a la susceptibilidad del huésped por enfermedades con relación a los cambios ambientales, ya sea de manera natural o por actividades antrópicas (Bird *et al.*, 2018). Cabe mencionar que en el lago de Pátzcuaro el rango de temperatura obtenido en el presente estudio es de 19° - 21°C, y que en general la temperatura óptima para el desarrollo de la mayoría de los hongos se encuentra entre los 25° a 45°C, pero se ha reportado especies con el potencial de crecer entre los 0°C y 55°C (Gimeno, 2002).

Finalmente, los cambios en las variables ambientales, activadas por modificación en el hábitat, ya sea por actividades antrópicas (e.g. cambio de uso de suelo, aumento en la tasa de depósitos en el lago, extracción de agua, etc.) o cambio climático, modifican el microbioma, lo que puede resultar en la proliferación de especies relacionadas a temperaturas mayores y con potencial infeccioso. Esto cobra relevancia ya que tanto el lago de Pátzcuaro como la cuenca presentan pérdida y fragmentación de hábitat, contaminación, introducción de especies exóticas y cambio ambiental, generando una pérdida en el índice de calidad del agua en el lago de Pátzcuaro (Ramírez y Domínguez, 2012), incrementando el potencial de riesgo de infecciones fúngicas, e incrementando el riesgo de pérdida de especies nativas como *A. dumerilii*.

Este estudio representa una descripción de la diversidad de hongos en la piel de *A. dumerilii* considerando la dinámica temporal de un sistema acuático, esto no solamente contribuye al conocimiento de la variación estacional de la comunidad de hongos en la piel de anfibios, sino que los resultados también pueden ser útiles en la generación de planes de manejo y conservación a nivel local de la especie, considerando como prioritario el mantenimiento de la temperatura en el cuerpo de agua para evitar la proliferación de enfermedades infecciosas emergentes (e.g. Bd) que han relacionado al declive de los anfibios, utilizando a la especie *A. dumerilii* como especie bandera en la conservación y manejo de recursos en el Lago de Pátzcuaro.

9.- CONCLUSIONES

- Se determinó la diversidad y variación temporal de hongos asociados a la piel de *Ambystoma dumerilii* en el Lago de Pátzcuaro. La diversidad de hongos (basada en el índice de Shannon) presenta una mayor variación en la temporada templada. Sin embargo, no presentó diferencias significativas entre temporadas
- Se identificaron 97 grupos taxonómicos de hongos asociados a la piel de *Ambystoma dumerilii*, así como su variación estacional. El número de OTUs es significativamente mayor en la temporada cálida, mientras que para la temporada templada y fría fue menor. Éstas dos últimas no presentaron diferencias significativas en el número de OTUs.
- Dentro de la comunidad de hongos se identificó el grupo chytridiomycota, el cual presenta especies (no identificadas en este trabajo) potencialmente patógenos asociada a la piel de *Ambystoma dumerilii*.
- Analizar la presencia de hongos patógenos asociada a la piel de *Ambystoma dumerilii* y su actividad infecciosa potencial relacionada a la dinámica ambiental.

10.- Literatura citada

- Ackerman, A.L. y D.M. Underhill. 2017. The mycobiome of the human urinary tract: potential roles for fungi in urology. *Ann. Transl. Med.* 5, 31-31.
- Adair, K.L., y A.E. Douglas. 2017. Making a microbiome: the many determinants of host-associated microbial community composition. *Curr Opin Microbiol* 35
- Aguilar-Miguel, X. 2005. Algunas especies de anfibios y reptiles contenidos en el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-ECOL-2000. Facultad de Ciencias, Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Universidad Autónoma del Estado de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W035. México, D.F.
- Anaissie, E.J., R.T. Kuchar, J.H. Rex, A. Francesconi. 2001. Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. *Clin Infect Dis* 33: 1871–1878.
- Berger, L., R. Speare y A. Hyatt. 1999. Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. En: CAMPBELL, A. (Ed.) *Declines and Disappearances of Australian frogs*. Environmental Australia, Canberra, pp. 23-33.
- Berger, L., R. Speare, P. Daszak, D.E. Green, A.A. Cunningham, C.L. Goggin, R. Slocombe, M.A. Ragan, A.D. Hyatt, K.R. McDonald, H.B. Hines, K.R. Lips, G. Marantelli, y H. Parkes. 1998.
- Bian, B.Z., S. Egusa. 1981. Histopathology of black gill disease caused by *Fusarium solani* (Martius) infection in the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate. *J Fish Dis* 4: 195–201.
- Bird, A.K., S.R. Prado-Irwin, V.T. Vredenburg y A.G. Zink. 2018. Skin Microbiomes of California Terrestrial Salamanders Are Influenced by Habitat More Than Host Phylogeny. *Front. Microbiol.* 9.
- Blaustein, A. R. D.B. Wake, W.P. Sousa. 1994. Amphibian Declines: judging stability, persistence, and susceptibility of population to local and global extinctions. *Conservation Biology*; 1(8):60-71.

Bletz MC, A.H. Loudon, M.H. Becker, S.C. Bell, D.C. Woodhams, K.P.C. Minbiole. 2013. Mitigación de la quitridiomycosis de anfibios con bioaumentación: características de los probióticos efectivos y estrategias para su selección y uso. *Ecol Lett* **16**: 807–820.

Bletz, M.C., R.G.B. Perl, M. Vences. 2017. La microbiota de la piel difiere drásticamente entre las ranas coexistentes y los tritones. *Roy Soc Open Sci* **4**: 170107.doi.org/10.1098/rsos.170107

Blooi, M., A. Martel, F. Haesebrouk, F. Vercammen, D. Bonte y F. Pasmans. 2015a. Treatment of urodelans based on temperature dependent infection dynamics of *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Scientific Reports*, **5**, 8037

Bonaccorso, E., J.M. Guayasamin, D. Méndez y R. Speare. 2003. Chytridiomycosis in a Venezuelan amphibian (Bufonidae: *Atelopus cruciger*). *Herpetological Review* **34**: 331-334.

Bordenstein, S.R., y Theis, K.R. 2015. Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes. *PLOS Biol.* **13**, e1002226

Bosch, J., I. Martínez-Solano y M. García-París. 2000. Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation* **97**: 331-337.

Bradford, D. F. 1991. Mass mortality and extinction in a high-elevation population of *Rana muscosa*. *Journal of Herpetology*, **25**: 174-177.

Brucker, R.M., C.M. Baylor, R.L. Walters, A. Lauer, R.N. Harris y K.P.C. Minbiole. 2008b. The Identification of 2,4-diacetylphloroglucinol as an Antifungal Metabolite Produced by Cutaneous Bacteria of the Salamander *Plethodon cinereus*. *J. Chem. Ecol.* **34**, 39–43.

Brucker, R.M., R.N. Harris, C.R. Schwantes, T.N. Gallaher, D.C. Flaherty, B.A. Lam y K.P.C. Minbiole. 2008a. Amphibian Chemical Defense: Antifungal Metabolites of the Microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the Salamander *Plethodon cinereus*. *J. Chem. Ecol.* **34**, 1422–1429.

Burns, C.D., M.E. Berrigan, G.E. Henderson. 1979. *Fusarium* sp. infections in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Aquaculture* **16**: 193–198.

- Bustamante, H.M., L.J. Livo, C. Carey. 2010. Efectos de la temperatura y el ambiente hídrico sobre la supervivencia de la rana dorada panameña infectada por un hongo quítrido patógeno. *Integr Zool* 5: 143-153.
- Cabañes, F.J., J.M. Alonso, G. Castellá, F. Alegre, M. Domingo, S. Pont. 1997. Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Fusarium solani* in a loggerhead sea turtle (*Caretta caretta* L.). *J Clin Microbiol* 35: 3343-3345.
- Carey, C. 2000. Infectious disease and worlwide declines of amphibian populations, with comments on emerging diseases in coral ref. organisms and in humans. *Enviromental Health Perspectives* 108: 143-150.
- Casas-Andreu, G., R. Cruz-Aviña y X. Aguilar-Miguel. 2004. Un regalo poco conocido de México al mundo: el ajolote o axolotl (*Ambystoma*: Caudata: Amphibia). Con algunas notas sobre la crítica situación de sus poblaciones. *Ciencia Ergo Sum.* 10:304-308.
- Chacón, T. A. 2000. Proyecto rescate y restauración del sur del lago de Pátzcuaro: Calidad del agua e hidrodinámica en la zona sur del lago de Pátzcuaro, Michoacán. Informe del Instituto de Ecología de la UNAM (Campus Morelia), 28p.
- Chacón, T.A. 1993. Pátzcuaro un Lago amenazado, Bosquejo Limnologico. Univ. Mich. San Nicolás de Hidalgo. Ed. Universitaria.
- Chacón, T.A., M. R. Pérez y I.E. Musquiz. 1991. Biología Acuatica 1. Síntesis Limnológica del lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. UMSNH, 48p.
- Chacón-Torres, A, L.G. Ross y M.C.M. Beveridge. 1989. Lake Pátzcuaro, Mexico: results of a new morphometric study and its implications for prodyctivity assessments. *Hidrobiología*, 184:125-132.
- Chacón-Torres, A. 1992. El Ecosistema Lacustre En: Plan Pátzcuaro 2000. Investigación Multidisciplinaria para el desarrollo sostenido. Fundación Ebert Stiftung, México, 2000:11-35.
- Clark, H. F., J. C. Brennan, R. F. Zeigel y Karzon 1968. Isolation and characterization of viruses from the kidneys of *Rana pipiens* with renal adenocarcinoma before and after passage in red eft (*Triturus viridescens*). *Journal of Virology*, 2: 629-640.

Clauss, T.M., M.T. Walsh, A.C. Camus, A.D.M. Dove. 2008. Resolution of cutaneous *Fusarium solani* infection in a beluga whale (*Delphinapterus leucas*) following aggressive wound management, and oral voriconazole therapy. In: Proceedings of the 39th International Association of Aquatic Animal Medicine, 10–14 May 2008, Pomezia, Rome. Omnipress, Madison, WI (Abstract).

Crow, G.L., J.A. Brock, S. Kaiser. 1995. *Fusarium solani* fungal infection of the lateral line canal system in captive scalloped hammerhead sharks (*Sphyrna lewini*) in Hawaii. J Wildl Dis 31: 562–565.

Dadone, L.I., E. Klaphake, M.M. Garner, D. Schwahn. 2010. Pituitary cystadenoma, enterolipidosis, and cutaneous mycosis in an Everglades ratsnake (*Elaphe obsoleta rossalleni*). J Zoo Wildl Med 41: 538–541.

Daszak, P., A.A. Cunningham y A.D. Hyatt. 2003. Infectious disease and amphibian population declines. Diversity and Distributions, 9, 141–150.

Daszak, P., L. Berger, A. A. Cunningham, A. D. Hyatt, D. E. Green y R. Speare. 1999. Emerging infectious Diseases and amphibian population declines. Emerging infectious Diseases 5:735-748.

De Buen, F. 1944. Los lagos michoacanos. II. Pátzcuaro. Revista Sociedad Mexicana Historia Natural, México, 5:99-125.

Dignani, M.C., E. Anaissie. 2004. Human fusariosis. Clin Microbiol Infect 10: 67–75.

Ding, T., y P.D. Schloss. 2014. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. Nature 509, 357–360.

Duellman, W. E. y L. Trueb. 1986. Biology of Amphibians. McGraw-Hill, New York, U.S.-A. 670 pp

Escalera-Vázquez, L.H., R. Hernández-Guzmán, C. Soto-Rojas, I. Suazo-Ortuño. 2018. Predicting *Ambystoma ordinarius* Habitat in Central Mexico Using Species Distribution Models

- Faust, K., y J. Raes. 2012. Microbial interactions: from networks to models. *Nat Rev Microbiol* 10: 538–550.
- Fellers, D.E. J.E. Green. 2001. Longcore Oral chytridiomycosis in the mountain yellow-legged frog (*Rana muscosa*) *Copeia*, 4, pp. 945-953
- Fisher, M.C., D.A. Henk, C.J. Briggs, J.S. Brownstein, L.C. Madoff, S.L. McCraw y S.J. Gurr. 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484, 186–194.
- Fitzpatrick, B.M. y A.L. Allison. 2014. Similarity and differentiation between bacteria associated with skin of salamanders (*Plethodon jordani*) and free-living assemblages. *FEMS Microbiol. Ecol.* 88, 482–494.
- Flórez, L.V., P.H.W. Biedermann, T. Engl y M. Kaltenpoth. 2015. Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *Nat Prod Rep* 32: 904–936.
- Frasca, S. J.r., J.L. Dunn, J.C. Cooke, J.D. Buck. 1996. Mycotic dermatitis in an Atlantic white-sided dolphin, a pygmy sperm whale, and two harbor seals. *J Am Vet Med Assoc* 208: 727–729.
- Frías-Álvarez, P., J.J. Zúñiga-Vega y O. Flores-Villela. 2010. A general assessment of the conservation status and decline trends of Mexican amphibians. *Biodiversity and Conservation*, 19(13), 3699-3742.
- García, E.1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koopen. Instituto de Geografía. UNAM. 246p.
- Garduño, M. V. H. 2000. Proyecto rescate y restauración del sur del lago de Pátzcuaro: Estudio de los manantiales del sector sur del Lago de Pátzcuaro. Informe del instituto de Ecología UNAM (Campus Morelia), 32p.
- Gimeno, A. 2002. Principales factores condicionantes para el desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas.
- Gupta, A.K., R. Baran, R.C. Summerbell. 2000. *Fusarium* infections of the skin. *Curr Opin Infect Dis* 13: 121–128.

- Gutiérrez, P.E.M., L.G. Pérez, A.J.G. Rodríguez, D.R. Quiles, C.M. Castro, E.J. Cuevas. 2011. Disseminated fusariosis in immunocompromised patients. *Eur J Dermatol* 21: 753–755.
- Hay RJ. 2007. *Fusarium* infections of the skin. *Curr Opin Infect Dis.* 20:115-7
- Hiemenz, J.W., B. Kennedy, K.J. Kwon-Chung. 1990. Invasive fusariosis associated with an injury by a stingray barb. *J Med Vet Mycol* 28: 209–213.
- Hird, S.M. 2017. Evolutionary Biology Needs Wild Microbiomes. *Front. Microbiol.* 8
- Hof, C., M. Araujo, W. Jetz, C. Rahbek. 2011 Additive threats from pathogens, climate and land-use change for global amphibian diversity. *Nature* 480:516-519.
- Hosokawa, T., Y. Kikuchi, T. Fukatsu. 2007. How many symbionts are provided by mothers, acquired by offspring, and needed for successful vertical transmission in an obligate insect-bacterium mutualism? *Mol Ecol* 16: 5316–5325.
- Huffnagle, G.B., y M.C. Noverr. 2013. The emerging world of the fungal microbiome. *Trends Microbiol.* 21, 334–341.
- INEGI, 2020. Marco Geoestadístico <https://www.inegi.org.mx/temas/mg/>
- Jia, X., F. Dini-Andreote y J. Falcão S. 2018. Community Assembly Processes of the Microbial Rare Biosphere. *Trends Microbiol.*
- Jousset, A., C. Bienhold, A. Chatzinotas, L. Gallien, A. Gobet, V. Kurm, K. Küsel, M.C. Rillig, D.W. Rivett, J.F. Salles. 2017. Where less may be more: how the rare biosphere pulls ecosystems strings. *ISME J.* 11, 853–862.
- Kearns, P.J., S. Fischer, S. Fernández-Beaskoetxea, C.R. Gabor, J. Bosch, J.L. Bowen. 2017. Fight fungi with fungi: antifungal properties of the amphibian mycobiome. *Front Microbiol* 8:32-12.
- Kilpatrick, A.M., C.J. Briggs y P. Daszak. 2010. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends Ecol. Evol.* 25, 109–118.

Kinney, V.C., J.L. Heemeyer, A.P. Pessier, M.J. Lannoo. 2011. Patrón estacional de infección y mortalidad por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Lithobates areolatus*: afirmación de la 'regla de las 10.000 zoosporas' de Vredenburg. *PLoS One* 6: e16708.

Kueneman, J.G., S. Weiss, and V.J. McKenzie. 2017. Composition of micro-eukaryotes on the skin of the cascades frog (*Rana cascadae*) and patterns of correlation between skin microbes and *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Front Microbiol* 8: 16050–16010.

Lam, B.A., J.B. Walke, V.T. Vredenburg, R.N. Harris. 2010. La proporción de individuos con bacterias cutáneas anti- *Batrachochytrium dendrobatidis* se asocia con la persistencia de la población en la rana *Rana muscosa*. *Biol Conserv* 143: 529-531.

Langdon, J. S. 1989 Experimental transmission and pathogenicity of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in red-fin perch, *Perca fluviatilis* L., and 11 other teleosts. *Journal of Fish Diseases*, 12: 295-310.

Lips, K. R., F. Brem, R. Brenes, J. D. Reeve, R. A. Alford, J. Voyles, C. Carey, L. Livo, A. P. Pessier y J. P. Collins. 2006. Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:3165-3170.

Lips, K. R., J. Diffendorfer, J.R. Mendelson III y M.W. Sears. 2008. Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *Plos Biology*, 6, e72.

Lips, K. R., J.R. Mendelson III, A. Muñoz-Alonso, L. Canseco M. y D. Mulcahy. 2004. Amphibian population declines in montane southern Mexico: Resurveys of historical localities. *Biological Conservation* 119: 555-564.

Longcore, J. E., A.P. Pessier y D.K. Nichols. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91: 219-227.

Longo, A.V., A.E. Savage, I. Hewson, K.R. Zamudio. 2015. Seasonal and ontogenetic variation of skin microbial communities and relationships with natural disease dynamics in declining amphibians. *R Soc Open Sci* 2: 140377.

López-Jodra O, J.M. Torres-Rodríguez. 1999. Especies fúngicas poco comunes responsables de onicomycosis. *Rev Iberoam Micol.* 16:11-5

- Loudon, A.H., D.C. Woodhams, L.W. Parfrey, H. Archer, R. Knight, V. McKenzie y R.N. Harris. 2014a. Microbial community dynamics and effect of environmental microbial reservoirs on redbacked salamanders (*Plethodon cinereus*). *ISME J.* 8, 830–840.
- Loudon, A.H., J.A. Holland, T.P. Umile, E.A. Burzynski, K.P.C. Minbiole y R.N. Harris. 2014b. Interactions between amphibians' symbiotic bacteria cause the production of emergent antifungal metabolites. *Front. Microbiol.* 5.
- Martel, A.A. Spitzen-van der Sluijs, M. Blooi, W. Bert, R. Ducatelle, M.C. Fisher. 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causa quitridiomycosis letal en anfibios. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 15325-15329.
- Martel, A.M. Blooi, C. Adriaensen, P. Rooij, W. Beukema, M.C. Fisher. 2014. Recent introduction of a chytrid fungus endangers western Palearctic salamanders. *Science* **6209**: 630–631.
- Meason-Smith, C., A. Diesel, A.P. Patterson, C.E. Older, J.M. Mansell, J.S. Suchodolski, y A. Rodrigues H. 2015. What is living on your dog's skin? Characterization of the canine cutaneous mycobiota and fungal dysbiosis in canine allergic dermatitis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, fiv139.
- Medina, D., J.B. Walke, K. Pontarelli, L.K. Belden, M.C. Hughey, M.H. Becker, S. Sun, B. Badgley. 2019. Amphibian skin fungal communities vary across host species and do not correlate with infection by a pathogenic fungus
- Michaels, C.J., M. Rendle, C. Gibault, J. Lopez, G. Garcia, M.W. Perkins, S. Cameron y B. Tapley. 2018. *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and treatment in the salamanders *Ambystoma andersoni*, *A. dumerilii* and *A. mexicanum*. *Herpetological Journal* 28: 87-92.
- Montali, R.J., M. Bush, J.D. Strandberg, D.L. Janssen, D.J. Boness, J.C. Whitla. 1981. Cyclic dermatitis associated with *Fusarium* sp infection in pinnipeds. *J Am Vet Med Assoc* 179: 1198–1212.
- Muletz, C.R., J.M. Myers, R.J. Domangue, J.B. Herrick, y R.N. Harris. 2012. Soil bioaugmentation with amphibian cutaneous bacteria protects amphibian hosts from infection by *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Biol Conserv* 152: 119–126

Naples, L.M., C.P. Poll, I.K. Berzins, 2012. Successful treatment of a severe case of fusariomycosis in a beluga whale (*Delphinapterus leucas leucas*). *J Zoo Wildl Med* 43: 596–602.

Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001 Protección ambiental-Especies nativas de México de Flora y Fauna Silvestres - Categorías de Riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio - Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. Marzo, 2002.

Nyman, S. 1986. Mass mortality in larval *Rana sylvatica* attributable to the bacterium, *Aeromonas hydrophilum*. *Journal of Herpetology*, 20: 196-201.

Oromí, D.J. 2000. Enfermedades emergentes y reemergentes: algunas causas y ejemplos. *Med. Integral* 79–82.

Ostland, V.E., H.W. Ferguson, R.D. Armstrong, A. Asselin, R. Hall. 1987. Case report: granulomatous peritonitis in fish associated with *Fusarium solani*. *Vet Rec* 121: 595–596.

Oyeka C, H. Gugnani. 1998. Keratin degradation by *Scytalidium* species and *Fusarium solani*. *Mycoses*. 41:73-6.

Parra-Olea, G. M. García-Paris y D.B. Wake. 1999. Status of some populations of Mexican salamanders (Amphibia: *Plethodontidae*). *Revista de Biología Tropical*, 47, 217–223.

Peay, K.G, P.G. Kennedy, y J.M. Talbot. 2016. Dimensions of biodiversity in the earth mycobiome. *Nat Rev Microbiol* 14: 434–447.

Perpiñán, D., J.G. Trupkiewicz, A.L. Armbrust, D.M. Geiser, S. Armstrong, M.M. Garner, D.L. Armstrong. 2010. Dermatitis in captive Wyoming toads (*Bufo baxteri*) associated with *Fusarium* spp. *J Wildl Dis* 46: 1185–1195.

Pessier, A. P., D.K. Nichols, J.E. Longcore y M.S. Fuller. 1999. Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates spp.*) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11: 194-199.

Qin, J., R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K.S. Burgdorf, C. Manichanh, T. Nielsen, N. Pons, F. Levenez, T. Yamada. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65.

Raffel, T.T., J.R. Rohr, J.M. Kiesecker, J.M. Husdon. 2006. Negative effects of temperature change on amphibian immunity under field conditions. *Funct Ecol* 20: 819-828. doi: 10.1111 / j.1365- 2435.2006.01159.x

Ramírez H.J.P. y O. Domínguez. 2012. El lago de Pátzcuaro, un lago en decadencia. Saber más.

Rohr, J.R., T.R. Raffel, J.M. Romansic, H. McCallum, P.J. Hudson. 2008. Assess the links between climate, disease spread, and amphibian declines. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 17436-17441.

Roper, M. C. Ellison, J.W. Taylor, N.L. Glass. 2011. Nuclear and genomic dynamics in multinucleated *ascomycete* fungi. *Curr Biol*. 2011; 21 (18).

Rose, F.L., J. Koke, R. Koehn, D. Smith. 2001. Identification of the etiological agent for necrotizing scute disease in the Texas tortoise. *J Wildl Dis* 37: 223–228

Rovito, S. M. G. Parra-Olea, C.R. Vásquez-Almazán, T.J. Papenfuss y D.B. Wake 2009. Dramatic declines in neotropical salamander populations are an important part of the global amphibian crisis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 3231–3236.

Salter, C.E., K. O'Donnell, D.A. Sutton, D.P. Marancik. 2012. Dermatitis and systemic mycosis in lined seahorses *Hippocampus erectus* associated with a marineadapted *Fusarium solani* species complex pathogen. *Dis Aquat Org* 101: 23–31.

Santana-Neto, P.L., C.M.R. Albuquerque, A.P.P. Silva, V.M. Svedese, E.A.L.A. Lima. 2010. Natural occurrence of the *Fusarium solani* on *Tityus stigmurus* (Thorell, 1876) (Scorpiones:Buthidae). *Braz J Biol* 70: 151–153.

Sarmiento-Ramírez, J.M., E. Abella, M.P. Martín, M.T. Tellería, L.F. López-Jurado, A. Marco, J. Diéquez-Uribeondo. 2010. *Fusarium solani* is responsible for mass mortalities in nests of

loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*, in Boa - vista, Cape Verde. FEMS Microbiol Lett 312: 192–200.

Schroeckh, V., K. Scherlach, H. Nützmann, E. Shelest, W. Schmidt-Heck, J. Schuemann. 2009. La interacción íntima bacteriano-fúngica desencadena la biosíntesis de policétidos arquetípicos en *Aspergillus nidulans*. Proc Natl Acad Sci EE. UU. 106: 14558 - 14563.

Scott, N. J. 1993. Post-metamorphic death syndrome. Froglog, 7, 1-2.

SEMARNAT, 2018. Programa de Acción para la Conservación de las Especies *Ambystoma* spp, SEMARNAT/CONANP, México

Smith, A.G., A.G. Muhvich, K.H. Muhvich, C. Wood. 1989. Fatal *Fusarium solani* infections in baby sharks. J Med Vet Mycol 27: 83–91.

Staggs, L., S.t. J. Leger, G. Bossart, F.I. J.r. Townsend, C. Hicks, M. Rinaldi. 2010. A novel case of *Fusarium oxysporum* infection in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). J Zoo Wildl Med 41: 287–290.

Tanaka, M., T. Izawa, M. Kuwamura, T. Nakao. 2012. Deep granulomatous dermatitis of the fin caused by *Fusarium solani* in a false killer whale (*Pseudorca crassidens*). J Vet Med Sci 74: 779–782.

Toledo, V. M. y N. Barrera–Bassols. 1984. Ecología y desarrollo rural en Pátzcuaro. Un modelo para el análisis interdisciplinario de comunidades campesinas. Instituto de Biología, UNAM. 224p.

Ursell, L. K., J.L. Metcalf, L.W. Parfrey, R. Knight. 2012. Definiendo el microbioma humano. Nutr Rev.

Venesky, M.D., M.J. Parris y R. Altig. 2010. Pathogenicity of *Batrachochytrium dendrobatidis* in larval *ambystomatid* salamanders. Herpetological Conservation and Biology 5(2): 174-182.

Virgin, H.W. 2014. The Virome in Mammalian Physiology and Disease. Cell 157, 142–150

Voyles, J., E.B. Rosenblum y L. Berger. 2011. Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity. Microbes and Infection, 13, 25–32.

Walke, J.B., M.H. Becker, S.C. Loftus, L.L. House, G. Cormier, R.V. Jensen, y L.K. Belden. 2014. Amphibian skin may select for rare environmental microbes. *ISME J.* 8, 2207–2217.

Weldon, C., L.H. du Preez, A.D. Hyatt, R. Muller y R. Speare. 2004. Origin of the Amphibian Chytrid Fungus. *Emerging Infectious Diseases* 10 (12): 2100-2105.

Williams, S.R., M.A. Sims, L. Roth-Johnson, B. Wickes. 2012. Surgical removal of an abscess associated with *Fusarium solani* from a Kemp's ridley sea turtle (*Lepidochelys kempii*). *J Zoo Wildl Med* 43: 402–406.

Woodhams, D.C., B.C. La Bumbard, K.L. Barnhart, M.H. Becker, M.C. Bletz, L.A. Escobar, S.V. Flechas, M.E. Forman, A.A. Iannetta, M.D. Joyce. 2018. Prodigiosin, Violacein, and Volatile Organic Compounds Produced by Widespread Cutaneous Bacteria of Amphibians Can Inhibit Two *Batrachochytrium* Fungal Pathogens. *Microb. Ecol.* 75, 1049–1062.

Woodhams, D.C., R.A. Alford, R.E. Antwis, H.M. Archer, M.H. Becker, L.K. Belden. 2015. Base de datos de aislamientos antifúngicos de bacterias asociadas a la piel de anfibios y función contra patógenos fúngicos emergentes. *Ecology* 96: 595.

Zhang, N., K. O'Donnell, D.A. Sutton, F.A. Nalim, R.C. Summerbell, A.A. Padhye, D.M. Geiser. 2006. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *J Clin Microbiol* 44: 2186–2190.