

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA DE LA ESPECIE AMENAZADA
ATELOPUS VARIUS: IMPLICACIÓN EN LA COEXISTENCIA CON EL LETAL
HONGO QUÍTRIDIO**

HANIA ARLETH NÚÑEZ PERALTA

**TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA EL GRADO DE
MAESTRÍA EN BILOGÍA MOLECULAR**

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2023

DEDICATORIA

A Dios por haberme dado salud y fortalezas para salir adelante. A mi familia por apoyarme, ser voz de aliento en los momentos difíciles de la carrera, por enseñarme que los estudios son la única manera de salir adelante, especialmente, a mi hermana Karla Núñez por estar presente en cada proceso de mis estudios dándome apoyo emocional. A mi madre Marigel Peralta por sus consejos y muestras de cariño.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a la persona que considero mi maestro, mi asesor, el Doctor Daniel Medina PhD, por acompañarme en cada paso que di para realizar esta tesis. Gracias por su dedicación, paciencia, guía y por todas las enseñanzas académicas que me transmitió durante estos últimos años, gracias por su arduo trabajo en formarme como una científica.

Agradezco al Doctor Eric Flores por permitirme realizar mi tesis en el marco del proyecto Prevalencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), microbioma y densidad poblacional de nuevas poblaciones de *Atelopus varius*. Agradezco al Doctor Guilherme Becker y su equipo por invitarme a su laboratorio para realizar una visita académica en The Pennsylvania State University y apoyarme en el análisis de muestras.

Agradezco a la secretaria nacional de Ciencia e Investigación (SENACYT) por proveerme los fondos y otorgarme la oportunidad de obtener la beca para poder estudiar en el programa de Maestría en Biología Molecular de la Universidad de Panamá.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	1
RESUMEN	2
SUMMARY	4
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS.....	13
GENERAL.....	13
ESPECÍFICOS.....	13
I. REVISIÓN DE LITERATURA O FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	14
II. MATERIALES Y MÉTODOS	19
Área de estudio.....	20
Especie.....	21
Toma de muestras.....	22
Datos ambientales a nivel de sitio	22
Datos asociados a cada hisopado de piel de anfibio	22
.....	23
Hisopado	23
Cuantificación de Bd y caracterización del microbioma de la piel	24
Electroforesis en gel	25
Secuenciación.....	25
Análisis bioinformático.....	25
Análisis de datos.....	27
III. RESULTADOS	30
1. Prevalencia y carga de infección por Bd.....	31
2. Diversidad Alpha	31
3. Diversidad Beta	34
IV. DISCUSIÓN	42
V. CONCLUSIONES	47

VI. RECOMENDACIONES	49
VII. LITERATURA CITADA.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa que muestra el área de estudio dentro del Parque Nacional Santa Fe.....	20
Figura 2. <i>Atelopus varius</i> (Liechtenstein & Martens, 1856).....	21
Figura 3. Toma de datos asociados a cada hispado.	22
Figura 4. Identificación de <i>Atelopus varius</i> mediante captura y recaptura: A. foto dorsal, B. foto ventral.	23
Figura 5. Diversidad alfa de las comunidades bacterianas asociadas a la piel de <i>A. varius</i> a nivel de sitio de muestreo y estado de infección por Bd está representada por la riqueza de ASVs (panel superior), y diversidad filogenética (panel inferior). Las figuras de caja representan la media, cuartil superior e inferior, y el valor máximo y mínimo de diversidad.	33
Figura 6. PCoA que muestra el patrón de variación en la estructura y composición de las comunidades bacterianas basado en la métrica de distancia de Bray-Curtis. Cada punto en la ordenación representa la estructura de la comunidad bacteriana de la piel de cada <i>A. varius</i>	34
Figura 7. Abundancias relativas de las ASVs diferencialmente abundantes entre los sitios/poblaciones de estudio. Las ASVs diferencialmente abundantes fueron identificadas utilizando el análisis de ANCOM II (basado en una proporción 0.7 de comparaciones significativas).....	35
Figura 8. Se muestran la variación en cuanto a la composición y estructura de las comunidades bacterianas en la piel de las especies simpátricas <i>Atelopus varius</i> y <i>Craugastor fitzingeri</i>	37

Figura 9. El gráfico de violín muestra la densidad de probabilidad de Kernel en la riqueza de la comunidad bacteriana potencialmente anti-Bd entre los tipos de muestra. 38

Figura 10. El análisis de coordenadas principales basada en la métrica de beta diversidad de Bray-Curtis. En esta ordenación cada punto pequeño representa una muestra única y los puntos grandes el centroide para el clúster de cada nivel presente en la variable tipo de muestra..... 39

Figura 11. Abundancias relativas de los phyla bacterianas con potencial rol inhibitorio más abundantes en *A. varius*, la especie simpátrica *Craugastor fitzingeri* y sustrato circundante (hojarasca, suelo, agua) muestreados..... 40

Figura 12. Abundancias relativas de las familias bacterianas con potencial rol inhibitorio más abundantes en *A. varius*, la especie simpátrica *Craugastor fitzingeri* y sustrato circundante (hojarasca, suelo, agua) muestreadas en el Parque Nacional Santa Fe, provincia de Veraguas. .. 41

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1 Prevalencia de Bd en *A. varius* Bd+ sobre el total de individuos muestreados y cargas de infección por el número de copias cuantificadas de la región ITS del genoma de Bd. La prevalencia y carga de infección por Bd se muestran de sitio. 31

ABREVIATURAS UTILIZADAS

Bd: *Batrachochytrium dendrobatidis*

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

F: cebador de PCR 'Forward'

R: cebador de PCR 'Reverse'

A.: *Atelopus*

ASVs: Amplicon sequence variants

ITS1: Espaciador transcrito interno 1

V4: Región hipervariable 4 del gen 16S rRNA

QIIME2: Quantitative Insights into Microbial Ecology II

LG: Sitio de muestreo 1

CL: Sitio de muestreo 2

DB: Sitio de muestreo 3

qPCR: Reacción en cadena polimerasa cuantitativa.

C: *Craugastor*

IUCN: Unión internacional para la conservación de la naturaleza

GLMs: Modelos lineales generalizados.

ANCOM: Análisis de composición microbiana.

PERMANOVA: Análisis de varianza multivariado con permutaciones.

RESUMEN

El sapo arlequín, *Atelopus varius*, actualmente es considerado en peligro crítico de extinción, debido a los drásticos declives de sus poblaciones por causa del hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). Sin embargo, en años recientes se han redescubierto poblaciones de esta especie a lo largo de su rango de distribución histórico, que parecen coexistir con el hongo Bd en un estado de infección enzootico.

De esta manera, en este estudio exploramos el potencial rol que la comunidad bacteriana de la piel de *A. varius* podría estar teniendo en la persistencia de tres de estas poblaciones en Panamá. De modo general, encontramos una baja prevalencia (12.86%; n = 70) de infección por Bd en las poblaciones de estudio, aunque con intensidades de infección moderadas (promedio = 286,516.8 copias/individuo). En relación con la comunidad bacteriana de *A. varius*, basado en la secuenciación del gen bacteriano 16S rRNA (región V4), no determinamos diferencias en la riqueza bacteriana asociadas a cambios en la temperatura corporal de los individuos, estado de infección por Bd (con la excepción de en una población) o entre las poblaciones de estudio. No obstante, sí determinamos una variación en la composición y estructura de la comunidad bacteriana entre las poblaciones de estudio.

Además, nuestros resultados indican que *A. varius* posee una riqueza relativamente mayor (y distinta composición) de bacterias potencialmente inhibitorias de Bd comparado con la comunidad bacteriana del sustrato y de una especie tolerante al Bd (*Craugastor fitzingeri*) que co-ocurre con *A. varius* en el área de estudio. Nuestros resultados indican que la interacción entre Bd y la comunidad bacteriana de la piel de *A. varius* podría estar modulada por las condiciones ambientales a nivel local y que el bacterioma de esta especie

en estas localidades esta potencialmente dominado por bacterias con propiedades antimicrobianas.

SUMMARY

The harlequin toad, *Atelopus varius*, is currently considered critically endangered, in part, due to drastic population declines caused by the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). However, in recent years populations of this species have been rediscovered throughout its historical range, which appear to coexist with the fungus Bd in an enzootic infection stage. Thus, in this study we explore the potential role that the skin bacterial community of *A. varius* could be playing in the persistence of three of these population in Panama. Overall, we found a low prevalence (12.86%, n = 70) of Bd infection in the study population, although with moderate infection intensities (mean = 286,516.8 copies/individual). Regarding the bacterial community of *A. varius*, based on sequencing of the bacterial 16S rRNA gene (V4 region), we did not determinate differences in bacterial richness associated with changes in individual body temperature, Bd infection status (except in one population) or between study populations. However, we did determine variation in bacterial community composition and structure between study populations. Furthermore, our results indicate that *A. varius* has a relatively higher richness (and different composition) of putatively Bd-inhibitory bacteria compared to the bacterial communities of the sampled substrates and of a Bd-tolerant species (*Craugastor fitzingeri*) co-occurring with *A. varius* in the study area. Our results indicate that the interaction between Bd and the skin bacterial community of *A. varius* may be modulated by local environmental conditions, and that the bacteriome of this species in these localities is potentially dominated by bacteria with antimicrobial properties.

INTRODUCCIÓN

Los servicios de los ecosistemas naturales son definidos como los beneficios provenientes de estos para la salud y persistencia de la vida humana. Sin embargo, la capacidad de los ecosistemas para proveer dichos servicios ambientales generalmente está ligada a su biodiversidad, la cual es frecuentemente reducida por las actividades antropogénicas. Por ejemplo, al modificar procesos de los ecosistemas tales como la producción de biomasa, el ciclo del agua y la integridad de los suelos contribuimos a la pérdida de la biodiversidad. De esta manera, se reduce o eliminan muchos de los beneficios innatos de la biodiversidad como, por ejemplo, la polinización y dispersión de semillas y organismos con propiedades medicinales para los seres humanos (Díaz *et al.*, 2006).

Se ha estimado que actualmente la tasa de extinción de la biodiversidad es 10,000 veces mayor a la estimada en el registro fósil (Collins, 2009). Entre las amenazas más prominentes a la biodiversidad están la fragmentación, la pérdida del hábitat, el cambio climático acelerado por las actividades antropogénicas y las enfermedades infecciosas emergentes. Inclusive, en los últimos 30 años aproximadamente la disminución de la biodiversidad se ha considerado alarmante, siendo los anfibios uno de los grupos taxonómicos más afectados (Collins, 2009) y, por lo tanto, considerados un ícono de la actual crisis de la biodiversidad (Wake & Vredenburg, 2008).

La quitridiomycosis, causada por el patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), es una enfermedad infecciosa emergente que ha causado el declive de alrededor de 700 especies en todos los continentes en donde los anfibios ocurren (Scheele *et al.*, 2019 y Lips, 2016). Cabe resaltar que la gran parte de los declives más drásticos y extinciones

tuvieron lugar en el este de Australia, América del Sur, el oeste de los Estados Unidos, África, oeste y centro de Europa, y particularmente América Central (Fisher & Garner, 2020).

El hongo Bd se reproduce mediante zoosporas, las cuales infectan la piel queratinizada de los anfibios. El ciclo de vida de Bd es una progresión que va desde el estadio infeccioso llamado zoospora a la formación del talo, el cual se desarrolla para dar origen a un zoosporangio ubicado dentro la célula del hospedero (Berger *et al.*, 2015). Una vez formado el zoosporangio, el mismo descarga zoosporas a través de una abertura, las cuales pueden ser liberadas al ambiente o re-infectar al mismo hospedero. Durante la infección, la capacidad osmoreguladora de la piel del anfibio se ve afectada, lo cual resulta en un desbalance electrolítico que produce la muerte por medio de un paro cardíaco asistólico (Voyles *et al.*, 2009). También, cabe mencionar que la intensidad de la infección por Bd puede ser influenciada por el genotipo, en donde el linaje Bd-GPL (linaje panzootico global) es el más virulento (Fisher & Garner, 2020).

Los sapos arlequín del género *Atelopus* (Clase Anura, familia Bufonidae) han sufrido grandes declives en sus poblaciones y se les considera el grupo de anfibios más amenazado. Hace aproximadamente 35 años las especies de este grupo fueron muy abundantes a lo largo de todo su rango de distribución en el Neotrópico. Sin embargo, a finales de la década del 1980 sufrieron drásticos declives, incluyendo extinciones a nivel local (La Marca *et al.*, 2005). Actualmente, existen evidencias de que estas disminuciones pudieron estar asociadas a la presencia/llegada del Bd, considerando que las la especie del género *Atelopus* son muy susceptible a la quitridiomycosis (Ramírez *et al.*, 2020).

Dentro de las especies que sufrieron grandes declives a causa de la quitridiomycosis, se encuentra la especie *Atelopus varius*. Esta especie mantenía poblaciones en Costa Rica y Panamá (Savage 1972) y actualmente, para Costa Rica sólo se reporta la existencia de aproximadamente dos poblaciones discretas (Barrio-Amoros and Abarca, 2016; González- Maya *et al.* 2018). En cuanto a Panamá, reportes recientes indican la existencia de la especie en la zona montañosa del centro de Panamá (Hertz *et al.* 2012; Perez *et al.* 2014), la cual incluye al Parque Nacional Santa Fe, ubicado a lo largo de la cordillera central y que tiene una extensión de unas 72,000 Ha (CODESA 2008). De esta manera, los sitios con poblaciones de *A. varius* en el Parque Nacional Santa Fe podrían ser considerados como refugios para la especie, por lo que su identificación y estudio son de suma importancia para los esfuerzos de conservación (Woodhams *et al.* 2011).

El continuo aumento de nuestro conocimiento sobre la diversidad y función del microbioma de los animales ha planteado un desafío a nuestro conocimiento actual sobre la historia de vida y evolución de estos organismos (McFall-Ngai *et al.*, 2013). El microbioma es una frontera relativamente nueva en la biología evolutiva y cuyo estudio ha sido impulsado por la creciente accesibilidad a la secuenciación del ADN. Dicha accesibilidad a técnicas de secuenciación (e.g., secuenciación en Illumina) ha permitido impulsar algunos de los objetivos principales de la biología evolutiva, tales como la caracterización de la diversidad y de los mecanismos ecológicos y evolutivos que han dado su origen. El microbioma, de esta manera, representa una excelente oportunidad para conocer la evolución y los factores que afectan la eficacia biológica de sus hospederos (Hird, 2017).

Las bacterias simbióticas juegan un rol importante en la protección del hospedero (Rebollar *et al.*, 2014); el microbioma se considera como la primera línea de defensa del hospedero, el cual puede inhibir el crecimiento de patógenos mediante la producción de metabolitos antimicrobianos y la competencia directa con los patógenos (Turnbaugh *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2012; Florez *et al.*, 2015; Rollins-Smith *et al.*, 2011; Bernardo Cravo *et al.*, 2020 y Medina *et al.*, 2021). Se ha demostrado que el microbioma asociado a la piel de los anfibios puede conferir protección al anfibio contra infecciones por Bd (Rebollar *et al.*, 2018). El microbioma de la piel de los anfibios y, de manera general, se define como el conjunto de microorganismos (i.e., bacterias, virus, hongos y otros eucariotas), y su material genético, asociados a un hospedero, cuya composición y estructura es influenciada por factores bióticos y abióticos (Rebollar *et al.*, 2016).

En relación a la ecología de las comunidades bacterianas asociadas a la piel de anfibios, Rebollar *et al.* (2016) determinaron que las comunidades bacterianas de la piel de los anfibios tropicales están constituidas por taxones bacterianos que presentan abundancias relativas bajas en el ambiente, lo cual es consistente con previos estudios de anfibios de climas templados (Walke *et al.* 2014). Adicionalmente, y en términos de la potencial interacción con Bd, Rebollar *et al.* (2016) también determinaron que las comunidades bacterianas asociadas a la piel de una especie tolerante al Bd (i.e., *Craugastor fitzingeri*) eran menos diversas y estaban dominadas por bacterias de los géneros *Acinobacter* y *Pseudomonas*, en poblaciones de ésta especie que han coexistido con Bd por mayor tiempo. En general, los resultados de ese estudio, el cual tuvo lugar en Panamá, demostraron que la estructura bacteriana de la piel está potencialmente relacionada con la

susceptibilidad al Bd, y la presencia histórica de Bd en estas localidades. Sin embargo, no se tiene claro como el microbioma de la piel de los anfibios tropicales está influenciado por los reservorios de bacterias en el ambiente y por los factores intrínsecos del huésped (e.g., sistema inmune innato: péptidos antimicrobianos).

El microbioma de la piel de los anfibios está compuesto por taxones bacterianos únicos con funciones metabólicas involucradas en la defensa y comunicación microbiana (Rebollar *et al.*, 2018). En una revisión realizada por Rebollar *et al.* (2020), se concluye que se desconocen aspectos importantes sobre el microbioma de los anfibios, tales como los mecanismos bajo los cuales interactúa con el hospedero y su función. Por último, cabe resaltar que el estudio de la diversidad y estructura del microbioma de los anfibios se ha convertido en un tema central para entender la dinámica de sus enfermedades emergentes, su historia natural y ecología (Assis *et al.*, 2017).

Dentro de un contexto ecológico, un estudio global sobre las comunidades bacterianas de la piel de los anfibios se analizaron los factores bióticos y abióticos que estructuran estas comunidades; ese estudio demostró que la riqueza bacteriana de la piel de los anfibios está correlacionada con la variación en la temperatura a lo largo de un gradiente latitudinal. Dicho de otra manera, este estudio determinó que las características temporales y espaciales del macro-ambiente del anfibio dictan la diversidad bacteriana (Kueneman *et al.*, 2019).

El hongo Bd ha infectado a una gran cantidad de especies de anfibios (más de 500; Sheele *et al.*, 2019), y de otros organismos (e.g., macro-invertebrados acuáticos), sin

embargo, no todas las especies son igualmente susceptibles (MacMahon, 2013). Dentro de este contexto, cuando las especies tolerantes o resistentes son simpátricas con especies altamente susceptibles éstas actúan como reservorios del patógeno. Por ejemplo, Brannelly *et al.* (2017) encontraron que individuos de la especie *Crinia signífera* que coexisten con especies amenazadas actúan como un reservorio que incrementan la probabilidad de infección por Bd en las otras especies y esto a su vez resulta en altos niveles de prevalencia e intensidad de infección en la naturaleza. De manera importante, en otro estudio realizado por Flechas *et al.* (2019), quienes estudiaron dos especies (*Dendropsophus labialis* y *Rheobates palmatus*) que coexisten con Bd para comprender cómo algunas especies no son susceptibles a la infección; se demostró que las bacterias simbióticas y los péptidos antimicrobianos pueden co-seleccionarse para incrementar la función inhibitoria contra Bd, específicamente contra el linaje Bd-GPL.

En un estudio realizado por Belden *et al.* (2015) en especies de anfibios de Panamá, se determinó que estas especies albergan comunidades únicas de bacterias en su piel, las cuales son sumamente diversas y contienen una gran variedad de grupos de taxones con propiedades inhibitorias contra Bd (Becker *et al.*, 2015). Otro estudio reciente, el cual evaluó la capacidad del microbioma de los anfibios para predecir la gravedad de la infección por Bd, sugiere que el éxito del patógeno está influenciado por las bacterias de la piel (Chen *et al.*, 2022). Sin embargo, Chen *et al.* (2022) indica que se desconoce el grado de variación que la comunidad microbiana puede mostrar sin perder la capacidad ‘predictora’ del riesgo de infección por Bd.

De esta forma, la inclusión de un enfoque en el microbioma de los anfibios nos permitirá dilucidar la ecología de las comunidades bacterianas y la relación huésped-patógeno en especies y poblaciones de interés para la conservación, tales como aquellas de *A. varius* recién descubiertas en Panamá y que carecen de información relevante. En este estudio, realizamos una caracterización molecular de las comunidades bacterianas asociadas a la piel de *A. varius* en Panamá y evaluamos su potencial rol protector contra Bd, además de determinar la incidencia de este hongo patógeno en estas poblaciones.

OBJETIVOS

GENERAL

- Caracterizar las comunidades bacterianas asociadas a la piel de *A. varius* en poblaciones que coexisten actualmente con el hongo Bd en un estado de infección enzootico.

ESPECÍFICOS

- Determinar la prevalencia y cargas de infección por Bd en las poblaciones de estudio de *A. varius* mediante la cuantificación del número de copias de la región ITS1 usando la técnica de qPCR .
- Determinar el patrón de diversidad y los cambios en la estructura de las comunidades bacterianas de *A. varius* asociados a infecciones por Bd mediante la amplificación y secuenciación de la región V4 del gen 16S rRNA.
- Evaluar el rol protector contra Bd de las bacterias de la piel de *A. varius* mediante una comparación con aquellas de una especie (i.e., *Craugastor fitzigeri*) simpátrica que es tolerante a este patógeno.

I. REVISIÓN DE LITERATURA O FUNDAMENTACIÓN
TEÓRICA

1. Quitridimicosis: amenaza a la biodiversidad de anfibios

En las décadas de 1970 y 1980 biólogos percibieron disminuciones y desapariciones ‘enigmáticas’ de especies de anfibios en sus áreas de estudio. Sin embargo, no fue hasta 1989 en el Congreso Mundial de Herpetología en Canterbury (Inglaterra) en donde finalmente estas disminuciones fueron reconocidas como un fenómeno de gran escala global (Green *et al.* 2020). Estas disminuciones y desapariciones de anfibios eran sorprendentes para la comunidad científica, ya que dichos fenómenos estaban ocurriendo en áreas protegidas y en bosques en buen estado de conservación (Green *et al.*, 2020). Seguido al congreso, los anfibios se convirtieron en noticias, destacando al New York Times como uno de los portavoces sobre el fenómeno de las disminuciones y extinciones de este grupo taxonómico. En 1991 se realizó la conferencia internacional sobre los anfibios en declive en Irvine California (EUA), la cual resultó en la formación de varios grupos de trabajo (e.g., Declining Amphibian Population Task Force, DAPTF) para facilitar y promover proyectos de investigación para determinar los factores ecológicos potencialmente asociados con las pérdidas de anfibios (Barinaga,1990; Wake,1991; Yoffe,1992; Wake y Morowitz,1991).

Diez años después, al cabo de muchos esfuerzos de investigación, se identificó y describió al patógeno asociado con las disminuciones y extinciones de anfibios alrededor del mundo, el hongo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) (Longcore y Pessier, 1999), el cual causa la enfermedad llamada quitridiomycosis.

Se ha encontrado que Bd infecta a 1,015 de 1,854 especies a nivel global, lo que representa el 54% de las especies. El hongo Bd infecta principalmente a las especies pertenecientes al orden Anura, al 55% de salamandras y tritones pertenecientes al orden Caudata y al 29% de las especies de cecilias (orden: Gimnofiona) (Fisher y Garner, 2020).

La dinámica de la interacción anfibio-Bd es compleja, y las respuestas de algunas especies de anfibios al Bd depende de varios aspectos ecológicos, tales como, las condiciones ambientales, historia de vida de la especie de anfibio, y del genotipo o fenotipo del Bd. De esta forma, determinar los factores críticos que modulan la interacción entre el anfibio y Bd es clave para poder predecir el patrón de incidencia de este patógeno y la intensidad de los brotes de quitridiomycosis.

La quitridiomycosis puede ser causada por dos tipos de hongos: *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) y *B. salamandrivorans* (Bsal). Ambos tienen origen potencialmente asiático y los cuales se han expandido a otros continentes. Bsal fue asociado a declives masivos de anfibios alrededor del 2010, particularmente de poblaciones de salamandra de fuego (*Salamandra salamandra*) en Europa. Pero a diferencia de Bd, Bsal tiene un mayor impacto en los anfibios de la orden caudata, especialmente en el género Salamandra (Journal *et al.*, 2020).

Nuestro entendimiento con respecto a esta enfermedad infecciosa ha cambiado desde su descripción al final de los años 90. Desde entonces se pensaba que Bd posiblemente era un organismo clonal que se había propagado y que observaríamos más

eventos de manera epizoótica. Sin embargo, a pesar de la presencia de Bd en todos los continentes, se ha determinado que en muchos lugares no ha habido disminuciones evidentes de las poblaciones de anfibios, lo que sugiere una contexto-dependencia ecológica y una posible variación en la virulencia de este patógeno. Dentro de este contexto, estudios recientes han determinado que Bd está compuesto por linajes genéticamente diferentes, los cuales pueden variar en virulencia (Fisher & Garner, 2020). Entre los linajes conocidos del Bd, el Linaje Panzootico Global (GPL) es el más virulento y al que se la han asociado las disminuciones drásticas y extinciones de anfibios a nivel global (Farrer *et al.*, 2011). También, se ha determinado que la respuesta de especies de anfibios a Bd presentan variación, en donde las especies que son consideradas más susceptibles son aquellas asociadas a arroyos de montañas y que poseen tamaños relativamente grandes (Lips *et al.*, 2003; Lips, 2016).

2. Bacterias simbiotes asociadas al hospedero como unidad evolutiva

Cuando el término holobionte fue introducido se refería a una sola entidad biológica que involucraba el huésped y su simbiote heredado. Sin embargo, este término fue ampliado para incluir la interacción de los microorganismos simbióticos con su hospedero, la que pueden ser tanto mutualista como antagonista (Simon *et al.*, 2019).

Un hospedero es cualquier ser vivo que alberga una comunidad microbiana. Por ejemplo, Hird (2017) define al microbioma como el conjunto de microorganismos que viven en un ambiente determinado (e.g. como aquella comunidad compleja de

microorganismos asociados a la piel de los anfibios) El microbioma juega un papel importante en los vertebrados debido a que facilita la captación y almacenamiento de energía, facilita el desarrollo del sistema inmunológico y puede influir en su comportamiento, incluyendo la selección de pareja y éxito reproductivo. (Hird, 2017).

La teoría de la evolución del hologenoma considera al holobionte como una unidad de selección y define al hologenoma como la suma de toda la información genética del hospedero y su microbioma. La teoría es basada en que todos los animales y plantas establecen una relación simbiótica con microorganismos, los cuales son transmitidos entre generaciones, y cuya interacción con el hospedero influye en la eficacia biológica del holobionte dentro de su ambiente. Estas premisas sugieren que la riqueza genética de los microbios simbiotes juega un papel importante en la adaptación y evolución de sus hospederos (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Este estudio se realizó en la República de Panamá, específicamente, dentro del Parque Nacional Santa Fe (provincia de Veraguas; coordenadas: 8°37'38" N, 80°58'45" O). Dentro del área de estudio se escogieron tres sitios de muestreo (Sitio 1, Sitio 2, Sitio 3); el 'sitio 1 (LG)' estaba a una elevación media de 641 msnm, el 'sitio 2' a 155 msnm y el 'sitio 3' a 177 msnm. En cada sitio se encontraron individuos de la especie de estudio *Atelopus varius* y de la especie *Craugastor fitzingeri*, que es tolerante al Bd y se usó en nuestro estudio con el propósito de realizar análisis comparativos.



Figura 1. Mapa que muestra el área de estudio dentro del Parque Nacional Santa Fe.

Especie

Se utilizo la especie *Atelopus varius* (familia: Bufonidadae), actualmente considerada críticamente amenazada (IUCN, 2020), y la especie simpátrica *Craugastor fitzingeri* (familia: Craugastoridae).



Figura 2. *Atelopus varius* (Liechtenstein & Martens, 1856)

Toma de muestras

Datos ambientales a nivel de sitio

Se tomaron datos ambientales a nivel de sitio, tales como temperatura del aire, temperatura del agua, humedad relativa, descripción del hábitat y elevación.

Datos asociados a cada hisopado de piel de anfibio

A cada muestra de hisopado de anfibio se le asignó un código único de identificación (Figura 4), así como los respectivos datos morfométricos del anfibio, temperatura corporal y género (Figura 3).



Figura 3. Toma de datos asociados a cada hisopado.

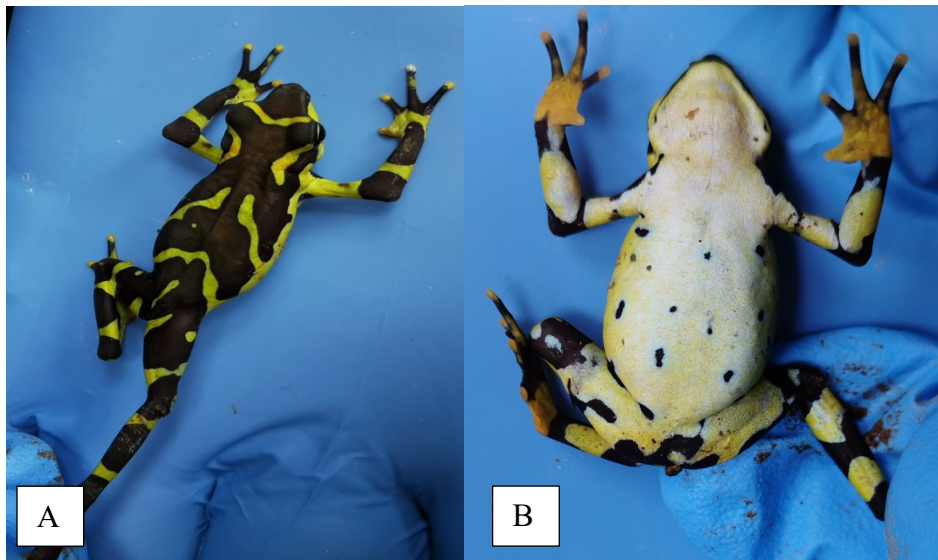


Figura 4. Identificación de *Atelopus varius* mediante captura y recaptura: A. foto dorsal, B. foto ventral.

Hisopado

Cada individuo fue atrapado con un par de guantes nuevos de nitrilo y colocado en una bolsa estéril Whirl-pak® donde permanecería hasta el momento de ser procesado (menos de 30 minutos); posteriormente, previo al el hisopado, los individuos fueron enjuagados con 50 ml de agua destilada estéril para remover bacterias transitorias de su piel. Los hisopados cutáneos se realizaron con hisopos estériles ‘rayon swabs’ (MW113, Medical Wire Equipment & Co. Ltd., Corsham, UK) en individuos de *A. varius* y *C. fitzinger*, los cuales consistieron en frotar el hisopo de algodón 20 veces en la región ventral, también se frotó 5 veces en una sola dirección cada pata trasera y 5 veces la región ventral de cada muslo (Belden *et al.*, 2015; Rebollar *et al.*, 2014). Los hisopados colectados se mantuvieron en nitrógeno líquido durante el trabajo de campo y posteriormente fueron

depositados a -80 °C en el laboratorio de biología del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología de Panamá (INDICASAT-AIP).

Cuantificación de Bd y caracterización del microbioma de la piel

Se extrajo el ADN bacteriano y del Bd de los hisopados de la piel siguiendo el protocolo de fábrica del kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Valencia, USA), se incluye un periodo de incubación de cuatro horas para romper la pared celular de las bacterias. Para determinar la prevalencia y carga de infección por Bd en *A. varius*, amplificamos y cuantificamos el número de copias de la región ITS1 del genoma de Bd usando la técnica de PCR cuantitativo (qPCR) y basándonos en el protocolo de Boyle *et al.* (2004).

Para caracterizar las comunidades bacterianas asociadas a la piel de *A. varius*, y determinar los patrones de diversidad asociados a la infección por Bd, se amplificó y secuenció la región hipervariable V4 del gen 16S rRNA. Para amplificar la región V4 utilizamos cebadores universales 515F y 806R (Caporaso *et al.*, 2012). Preparamos la reacción de PCR (20µl) para cada muestra agregando 12.2µl de agua ultrapura (Invitrogen), 4µl de 5X Phire reaction buffer (Finnzyme, Espoo, Finland), 0.4 µl de 2.5 mM dNTP mix (Invitrogen), 0.4µl de Phire Hot Start II (Finnzyme, Espoo, Finland), 0.5 µl de cada primer y 2µl de DNA molde. También homogenizamos y transferimos (10 µl) de la mezcla a otra placa de 96 pocillos (se incluyó un control negativo a cada placa de 96 pocillos). Para realizar el paso de desnaturalización usamos 38 ciclos de 5 segundos a 98°C, hibridación usamos 5 segundos a 50°C y para la elongación usamos 15 segundo a 72°C.

Electroforesis en gel

Se seleccionaron al azar dos filas de doce pocillos de cada placa de PCR en un gel con el fin de verificar el producto de la reacción de PCR. Para esto, se prepararon previamente 50 ml de gel de agarosa al 1% (usar 0,5 de agarosa). Con la intención de visualizar el producto de PCR de cada muestra se combinó 1,5µl de ADN amplificado con 2µl de colorante de carga diluido con (1:1 H₂O) en cada pocillo del gel. El gel fue corrido a 100 voltios durante 20 minutos, al cual se le tomó una foto en el transiluminador para verificar la presencia de bandas que confirmen la presencia de ADN amplificado y el tamaño del fragmento. Por último, los productos de PCR se cuantificaron en un Qubit 2.0 fluorómetro con el dsDNA Broad-Range Assay Kit (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA).

Secuenciación

La secuenciación tuvo lugar usando una plataforma de Illumina Miseq en el centro de secuenciación de Tuft University (TUCF Genomics) en Boston Massachusetts, USA.

Análisis bioinformático

Se importaron las lecturas forward de cada muestra al software de bioinformática Quantitative Insights Into Microbial Ecology II (QIIME 2 versión 2022.2) para procesar las secuencias. Para obtener la alpha y beta diversidad de la comunidad bacteriana de *A.*

varius, *C. fitzingeri* y muestras ambientales, primero recortamos la longitud de las secuencias a 250 pb, luego las filtramos según su calidad y las agrupamos en variante de secuencia de amplicon (sASVs) usando el método Deblur (Amir *et al.*, 2017). Para la asignación taxonómica se utilizó la base de datos de Greengenes (versión Greengenes 13.8). Seguidamente, se removieron los cloroplastos y mitocondrias, así como las secuencias asociadas a potenciales contaminantes (sASVs presentes en los controles de la extracción de ADN y PCR).

Las ASVs generada después de procesar las secuencias tuvo un total de 11777 de secuencias, con un rango de profundidad de secuencias por muestras de 4 a 36,401 (promedio de secuencias/muestras = 11,538.60). De esta manera, y considerando la variación en el número de secuencias entre las muestras, se procedió a rarificar a una de profundidad 1500 secuencias/muestras basado en las curvas de rarefacción con el propósito de balancear el ‘esfuerzo de muestro’ entre las muestras. Esto resultó en la pérdida de muestras con pocas secuencias y de los controles (promedio= 27,7589); quedando excluidas 23 muestras. La tabla de ASVs final se constituyó de 109 muestras y un total 5,890 ASVs, las cuales varían de 1 a 24,740.0 secuencias por muestras.

Para evaluar el potencial rol inhibitorio de la comunidad bacteriana presente en las muestras (*A. varius*, *C. fitzingeri* y muestras ambientales) utilizamos la base de datos desarrollada a partir de secuencias del gen 16S rRNA de bacterias aisladas de la piel de anfibios y que poseen rol inhibitorio al Bd (Woodhams *et al.*, 2015). Las secuencias fueron procesadas en QIIME 2 y se les asignó la taxonomía utilizando la base de datos Greengenes (versión 13.8).

Análisis de datos

Se examinó la variación en la diversidad alfa de las comunidades bacterianas de la piel de *A. varius* utilizando las métricas de riquezas de ASVs, índice de Shannon y diversidad filogenética de FAITH. Específicamente, se evaluó el efecto de la infección por Bd (i.e., estatus de infección) y de variables ecológica con relevancia para la interacción Bd-anfibio-bacteria (i.e., temperatura corporal y sitio/población) en el patrón de diversidad de las comunidades bacterianas.

Se usaron modelos lineares generalizados (GLMs), en donde la métrica de alfa diversidad de bacterias se incluyó como variable de respuesta y las otras variables, como predictores. Para el modelo de riqueza de ASV, se utilizó una distribución binomial negativa para controlar la dispersión de los datos usando la función “log link”. En cuanto a las métricas de índice de Shannon y diversidad filogenética se usó una distribución gamma (función “link inverse”) para generar los modelos. Los modelos fueron implementados utilizando a función “*glm*” del paquete de R *stats*.

Con la finalidad de determinar el grado de variación en la estructura y composición de las comunidades bacterianas de *A. varius* (y *C. fitzingeri*) con relación a las variables ecológicas de interés (e.g. sitio/población), se usaron las métricas de distancia de Bray-curtis, Jaccard y unfrac (“weighted” y “unweighted”). Adicionalmente, se evaluó estadísticamente la variación en las estructura y composición de las comunidades usando el análisis de varianza multivariado con permutaciones (PERMANOVA), el cual fue implementado utilizando la función “*adonis*” del paquete “*vegan*” (Oksanen *et al.*, 2022).

Adicionalmente, se realizaron comparaciones entre niveles de las variables (i.e., entre sitios) utilizando la función “*pairwise.adonis*”. Para visualizar el patrón de diversidad basado en las métricas de distancia se usó el análisis de coordenadas principales (PCoA).

Por último, con el propósito de identificar los taxones bacterianos que variaron drásticamente en abundancia relativa y/o presencia entre los niveles de las variables de interés, se usó el análisis de composición de microbiomas (ANCOM). Específicamente, se adoptó la metodología de ANCOM II desarrollada por Lin (2019), aplicando una proporción de 0.7 (estadístico $W \geq 140$ para nuestro estudio) para considerar a una ASVs como diferencialmente abundante entre grupos. Con el fin de visualizar claramente el patrón de variación de las ASVs que variaron diferencialmente entre grupos (i.e., sitios/poblaciones), se hizo un mapa de calor, el cuál fue generado usando la función *heatmap.2* del paquete *gplots* (Warnes *et al.*,2022).

En relación con las bacterias potencialmente inhibitorias de Bd (bacterias anti-Bd), se realizó GMLs (incluyendo una distribución binomial negativa y una función *log-link*) para determinar el efecto de las variables ecológicas mencionadas anteriormente en la riqueza de bacterias con posible rol inhibitorio a Bd.

Se evaluó la variación en la estructura y composición de las bacterias con potencial rol inhibitorio al Bd utilizando el análisis de PERMANOVA; y el patrón de diversidad se visualizó utilizando un PCoA. Para visualizar la variación en la composición taxonómica

de estas bacterias (a nivel de phylum y familia) entre los diferentes tipos de muestras se utilizó la función *Barplot* del paquete *ggplot2* en R.

III. RESULTADOS

1. Prevalencia y carga de infección por Bd

Tomando en consideración todos los *A. varius* muestreados en las tres poblaciones, determinamos una prevalencia de infección por Bd del 12.86% (9/70), y una carga de infección promedio de 286,516.8 copias por individuo (Tabla 1).

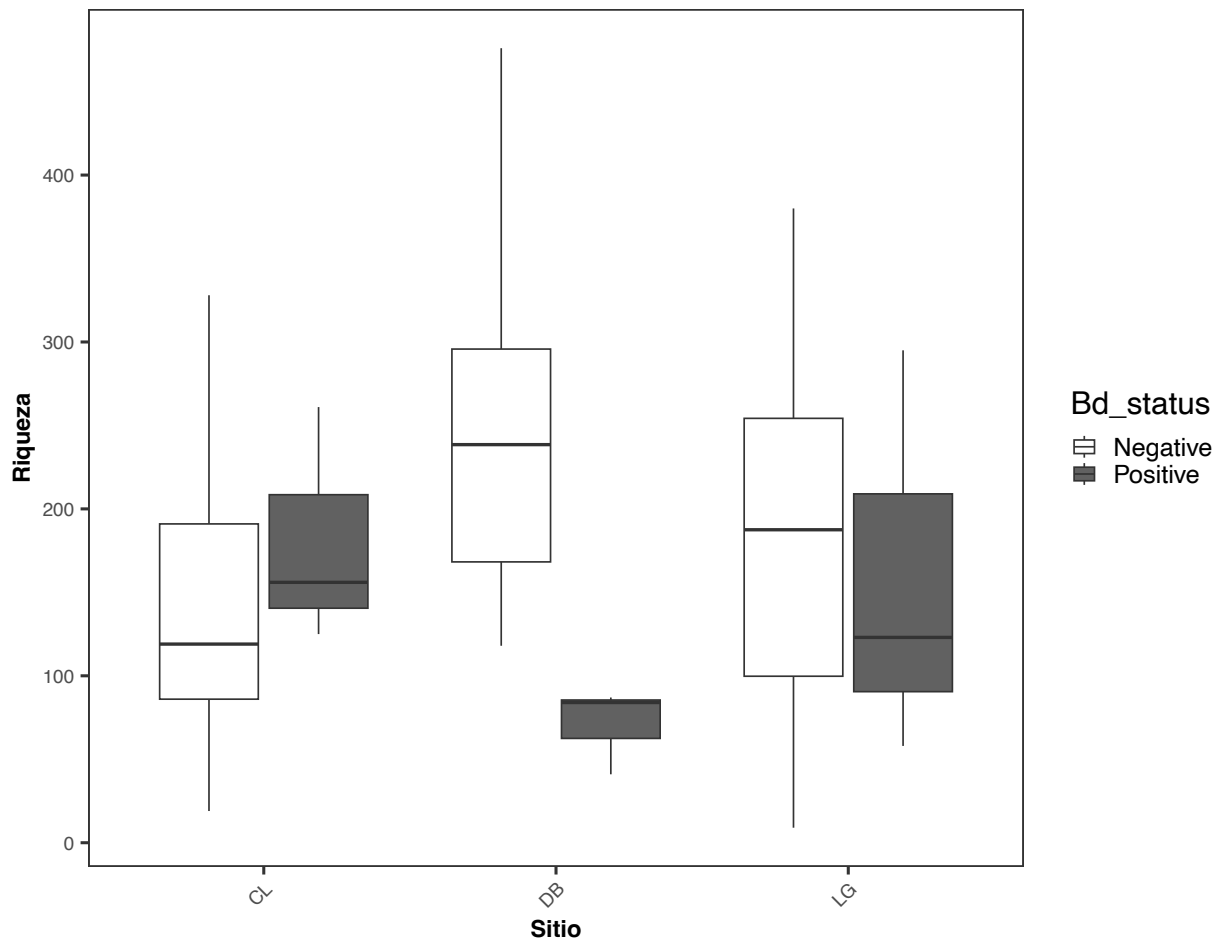
Tabla 1 Prevalencia de Bd en *A. varius* Bd+ sobre el total de individuos muestreados y cargas de infección por el número de copias cuantificadas de la región ITS del genoma de Bd. La prevalencia y carga de infección por Bd se muestran de sitio.

Sitio	Prevalencia (%)	Carga de infección (promedio)
CL	11.54 (3/26)	51658.667
DB	23.07 (3/13)	805479.000
LG	9.68 (3/31)	2412.617
Total	12.86 (9/70)	286516.8

2. Diversidad Alpha

En cuanto a la variación en la α diversidad bacteriana (Riqueza de ASVs, índice de Shannon y diversidad filogenética), no se encontró un efecto de la temperatura corporal (Riqueza de ASVs; $X^2_{(1,59)} = 0.06$, $p = 0.81$; Shannon Hill numbers: $X^2_{(1,59)} = 0.20$, $p = 0.64$; diversidad filogenética de faith: $F_{(1,59)} = 0.04$, $p = 0.83$). De la misma manera, tampoco se encontraron diferencias en α diversidad entre el estado de infección por Bd (Riqueza de ASVs: $X^2_{(1,59)} = 0.05$, $p = 0.35$; Shannon-Hill numbers: $X^2_{(1,59)} = 0.94$, $p = 0.33$; diversidad filogenética de faith: $F_{(1,59)} = 0.04$, $p = 0.83$) y entre sitio/población (Riqueza de ASVs: $X^2_{(2,59)} = 3.49$, $p = 0.17$, Shannon-Hill numbers: $X^2_{(2,59)} = 0.29$, $p = 0.86$; diversidad filogenética de faith: $F_{(2,59)} = 2.64$, $p = 0.07$). Cabe resaltar que, de manera cualitativa, se

observó una reducción drástica en la α diversidad bacteriana en los individuos infectados por Bd en la población 'DB' (e.g., media \pm desviación estándar: riqueza de ASVs en Bd+ 147.45 \pm 88.77 vs. Bd- 243.05 \pm 139.59; Figura 5).



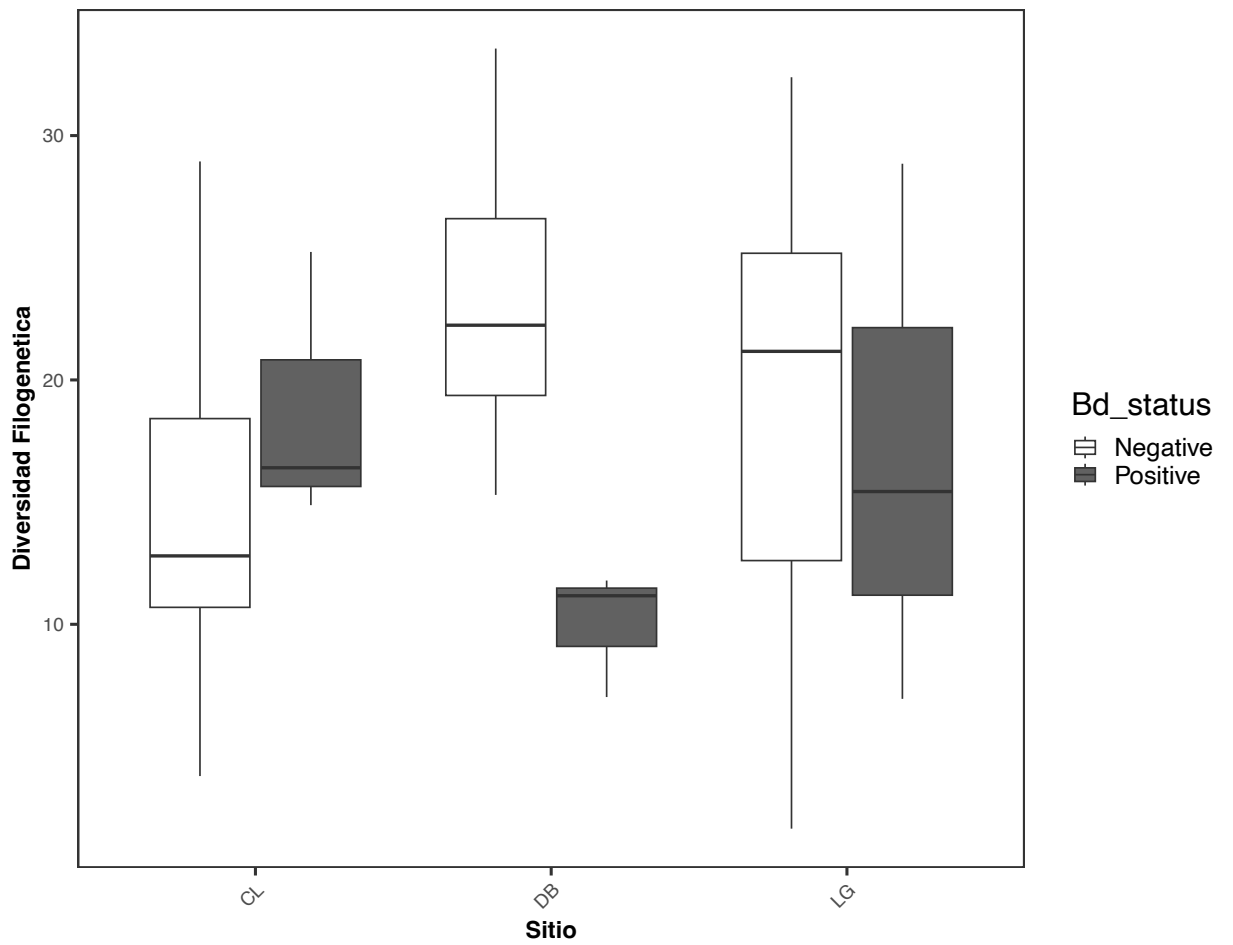


Figura 5. Diversidad alfa de las comunidades bacterianas asociadas a la piel de *A. varius* a nivel de sitio de muestreo y estado de infección por Bd está representada por la riqueza de ASVs (panel superior), y diversidad filogenética (panel inferior). Las figuras de caja representan la media, cuartil superior e inferior, y el valor máximo y mínimo de diversidad.

3. Diversidad Beta

En cuanto a la variación en la composición y estructura de la comunidad bacteriana de la piel de *A. varius* (β diversidad) se determinó que ésta varió entre las poblaciones (PERMANOVA: Bray-Curtis: Pseudo-F= 2.903, $R^2=0.082$, $p < 0.001$; Jaccard: Pseudo-F=2.37, $R^2=0.068$, $p < 0.001$; Unweighted unfrac: Pseudo-F=1.987, $R^2= 0.057$, $p < 0.001$; Weighted unfrac: Pseudo-F=1.987, $R^2=0.057$, $p < 0.001$; Figura 6). Específicamente, se encontraron diferencias significativas entre los sitios CL y DB ($F= 3.78$, $R^2=0.09$, $P= 0.002$) así como entre los sitios CL y LG ($F=3.22$, $R^2= 0.05$, $P= 0.004$). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los sitios DB vs LG ($F=2.15$, $R^2= 0.04$, $P= 0.018$; Figura 6).

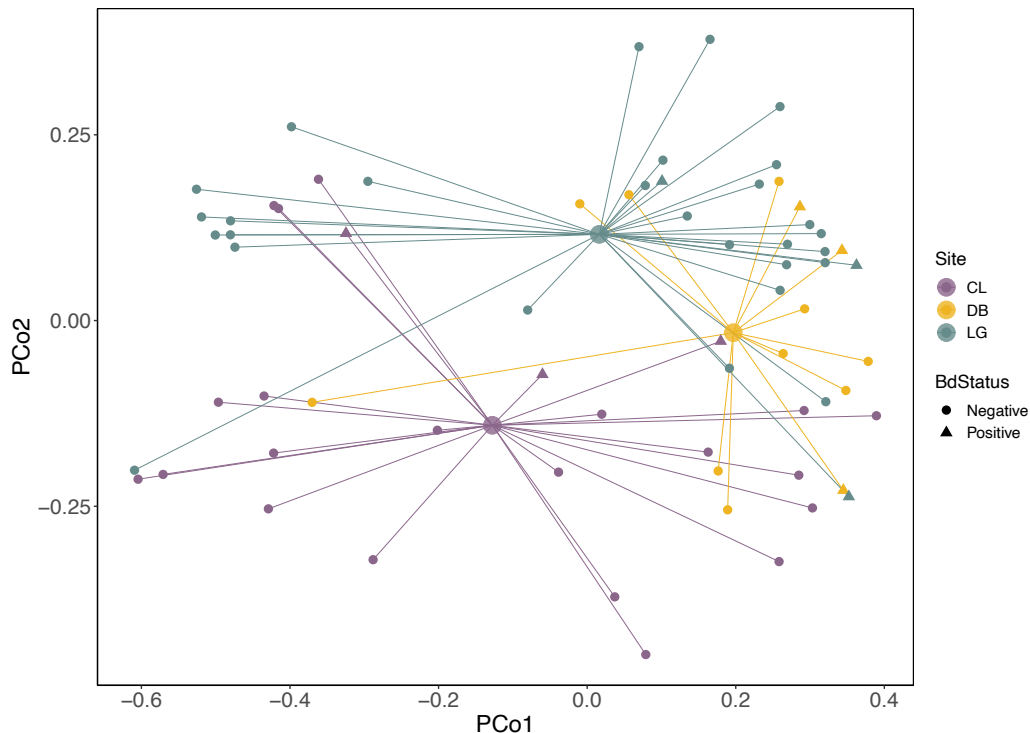


Figura 6. PCoA que muestra el patrón de variación en la estructura y composición de las comunidades bacterianas basado en la métrica de distancia de Bray-Curtis. Cada punto en la ordianación representa la estructura de la comunidad bacteriana de la piel de cada *A. varius*

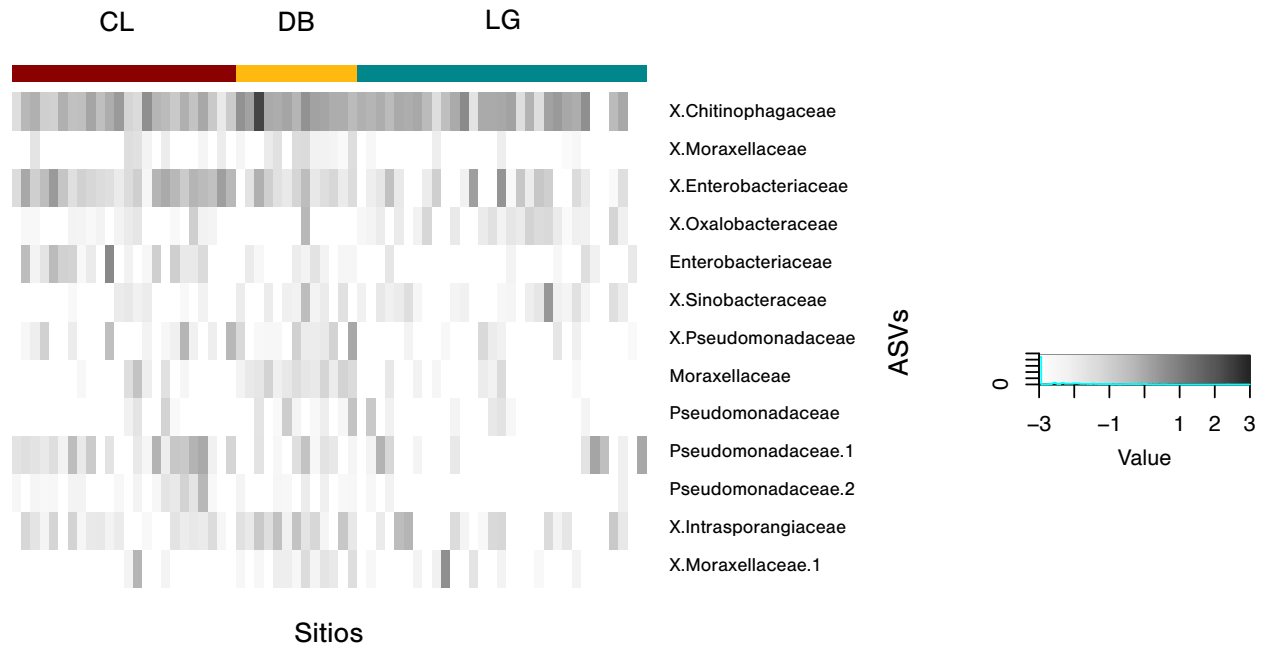


Figura 7. Abundancias relativas de las ASVs diferencialmente abundantes entre los sitios/poblaciones de estudio. Las ASVs diferencialmente abundantes fueron identificadas utilizando el análisis de ANCOM II (basado en una proporción 0.7 de comparaciones significativas).

Por otro lado, no se encontró variación en la composición y estructura de las comunidades bacterianas de la piel de *A. varius* de acuerdo con su estado de infección (PERMANOVA: Bray-Curtis: Pseudo-F=1.390, $R^2=0.019$, $p=0.1$; Jaccard: Pseudo-F=1.253, $R^2=0.017$, $p=0.1$; Unweighted unfrac: Pseudo-F=0.985, $R^2=0.014$, $p>0.1$; Weigthed unfrac: Pseudo-F=0.985, $R^2=0.014$, $p>0.1$).

Adicionalmente, se determinó que la estructura de las comunidades bacterianas asociadas a la piel de *A. varius* y *C. fitzingeri* difieren de aquellas en los substratos (i.e., agua, hojarasca y suelo; PERMANOVA: Bray-Curtis: Pseudo-F=5.16, $R^2=0.16$, $p=0.0001$;

Jaccard: Pseudo-F=3.51, $R^2=0.119$, $p<0.001$; Unweighted unifrac: Pseudo-F=2.336, $R^2=0.083$, $p<0.001$; Weighted unifrac: Pseudo-F: 2.336, $R^2: 0.083$, $P<0.001$; Figura 5).

Además, *A. varius* y *C. fitzingeri* también difirieron entre sí (Pseudo-F= 8.08, $R^2=0.09$, $p= 0.001$; Figura 8). En relación con la comparación entre *A. varius* y las muestras ambientales, *A. varius* difirió de la hojarasca (Pseudo-F=9.50, $R^2=0.10$, $p=0.001$) y del suelo (Pseudo-F=7.80, $R^2=0.09$, $P=0.001$); sin embargo, no se encontraron diferencias entre las muestras *A. varius* y las de agua (Pseudo-F=3.08, $R^2= 0.04$, $p=0.006$). Adicionalmente, se encontraron diferencias entre las muestras de la especie simpátrica *C. fitzingeri* y hojarasca ($F=1.79$, $R^2=0.06$, $p=0.002$); *C. fitzingeri* y suelo ($F=1.86$, $R^2=0.08$, $p=0.001$); por otro lado, y en contraste con *A. varius*, se encontraron diferencias entre *C. fitzingeri* y las muestras de agua ($F=1.45$, $R^2=0.10$, $p=0.039$). De igual manera, se encontraron diferencias entre la hojarasca y el suelo ($F=1.68$, $R^2=0.06$, $p=0.001$), Por último, se encontraron diferencia entre las muestras ambientales hojarasca y agua ($F=1.39$, $R^2=0.085$, $p=0.007$); suelo y agua ($F=1.21$, $R^2=0.10$, $p=0.049$).

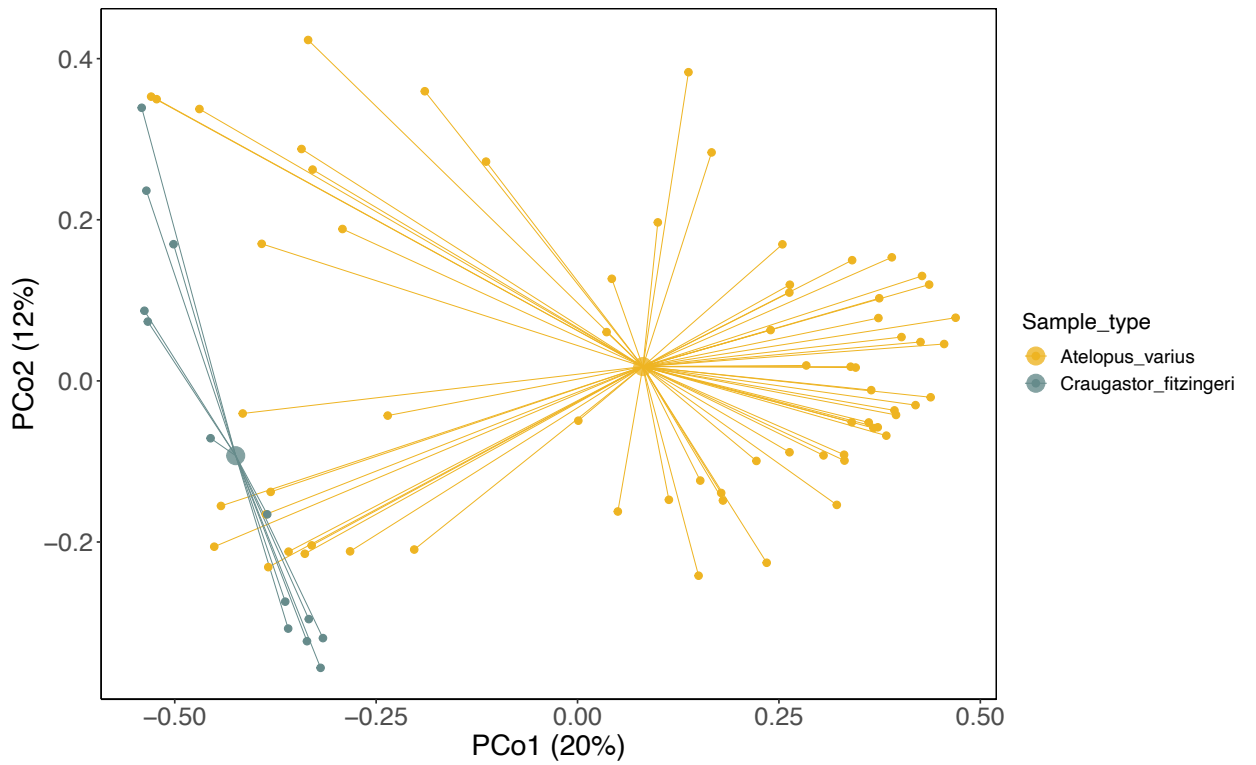


Figura 8. Se muestran la variación en cuanto a la composición y estructura de las comunidades bacterianas en la piel de las especies simpátricas *Atelopus varius* y *Craugastor fitzingeri*.

En relación con las bacterias potencialmente anti Bd, se encontraron diferencias en la α diversidad de las bacterias (Riqueza de ASVs $X^2 = 12.899$, $P=0.011$; Figura 9). Se determinó que la composición y estructura de la comunidad antimicrobiana en la piel de *A. varius* y difirió significativamente de la del sustrato (PERMANOVA: Bray-Curtis: Pseudo-F= 6,812, $R^2 = 0.198$, $p < 0.001$; Jaccard: Pseudo-F=4,732, $R^2=0.148$, $p < 0.00$; Figura 10). Se encontraron diferencias en la composición y estructura de la comunidad antimicrobiana variable sitio (PERMANOVA: Bray-Curtis: Pseudo-F= 3.325, $R^2=0.048$, $p < 0.001$; Jaccard: Pseudo-F=2,752, $R^2=0,04$, $p < 0.001$).

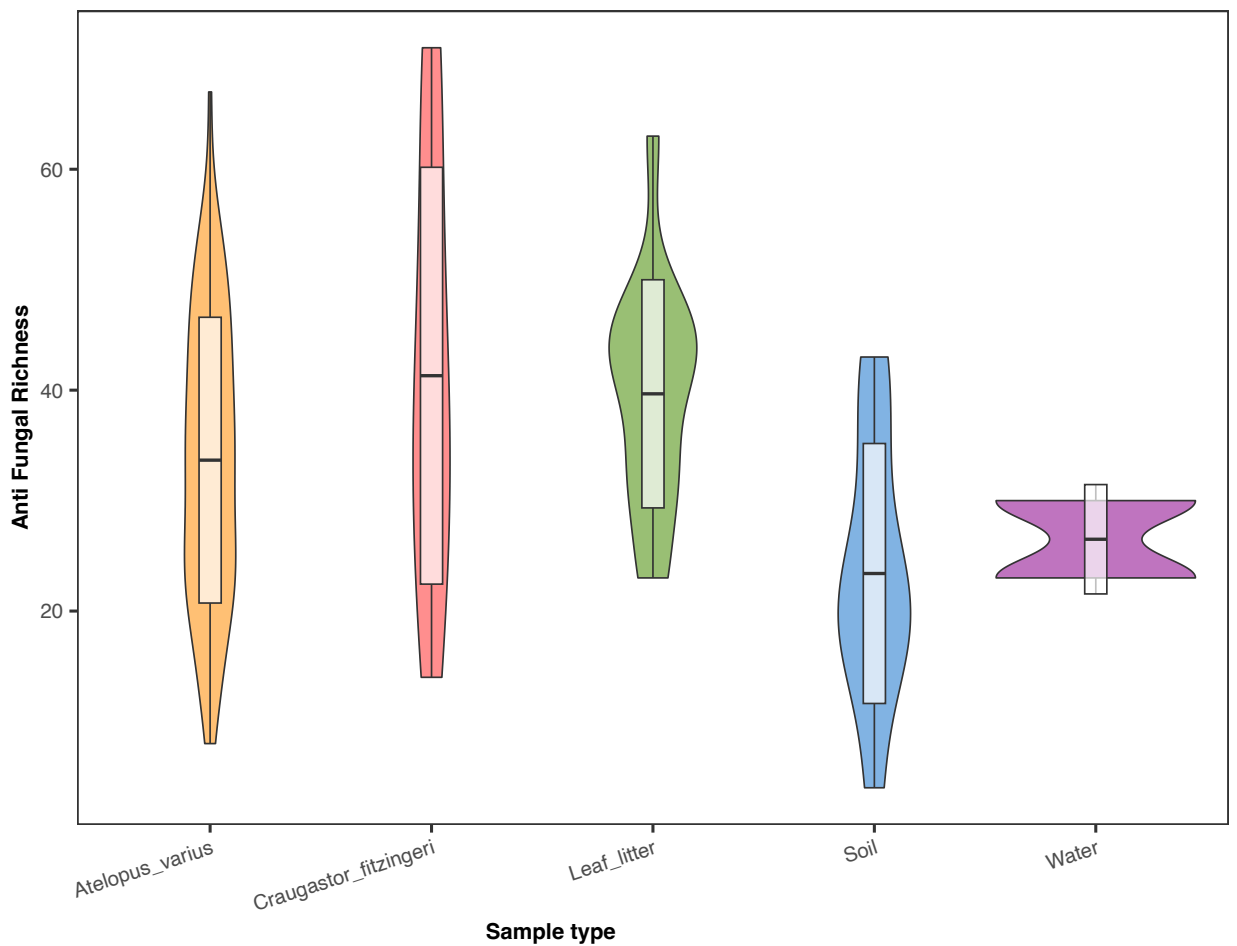


Figura 9. El gráfico de violín muestra la densidad de probabilidad de Kernel en la riqueza de la comunidad bacteriana potencialmente anti-Bd entre los tipos de muestra.

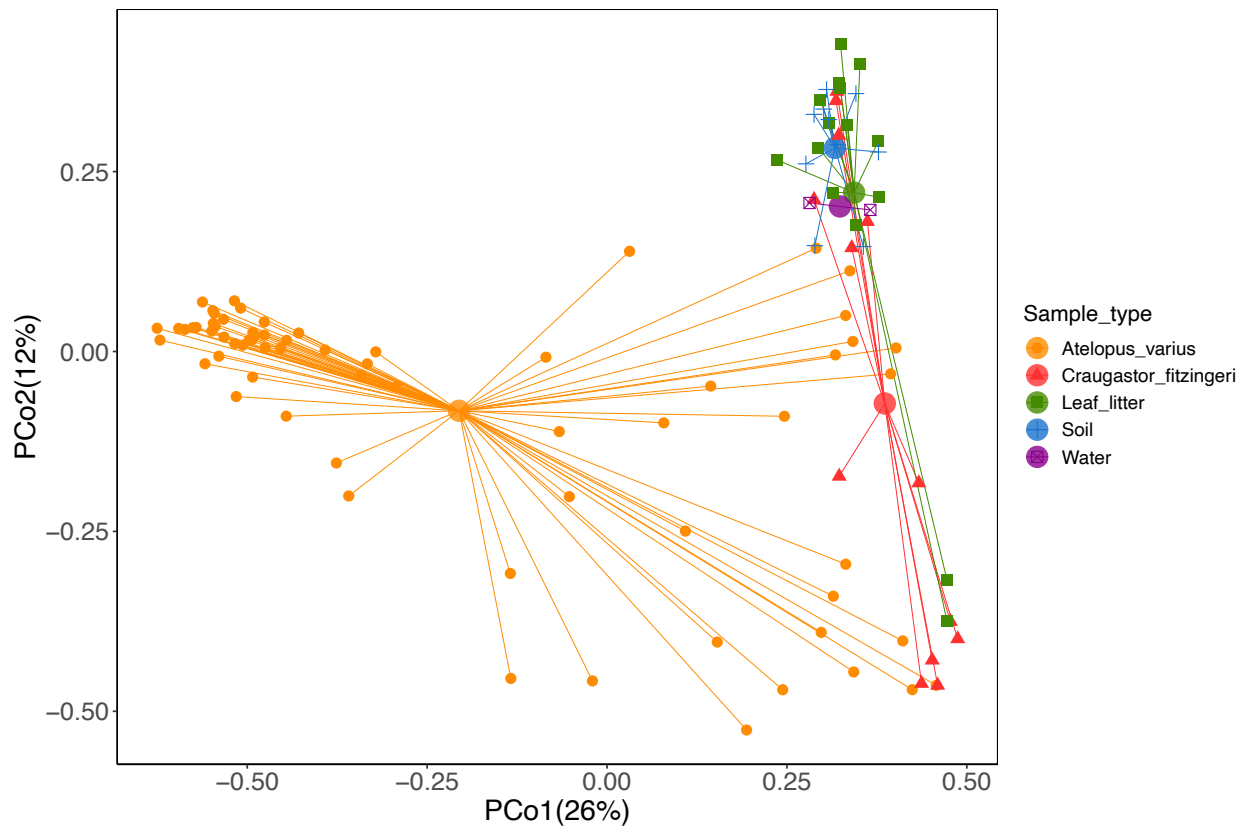


Figura 10. El análisis de coordenadas principales basada en la métrica de beta diversidad de Bray-Curtis. En esta ordianación cada punto pequeño representa una muestra única y los puntos grandes el centroide para el clúster de cada nivel presente en la variable tipo de muestra.

Los phyla más abundantes fueron actinobacteria, bacteroidetes, firmicutes proteobacterias (Figura 11).

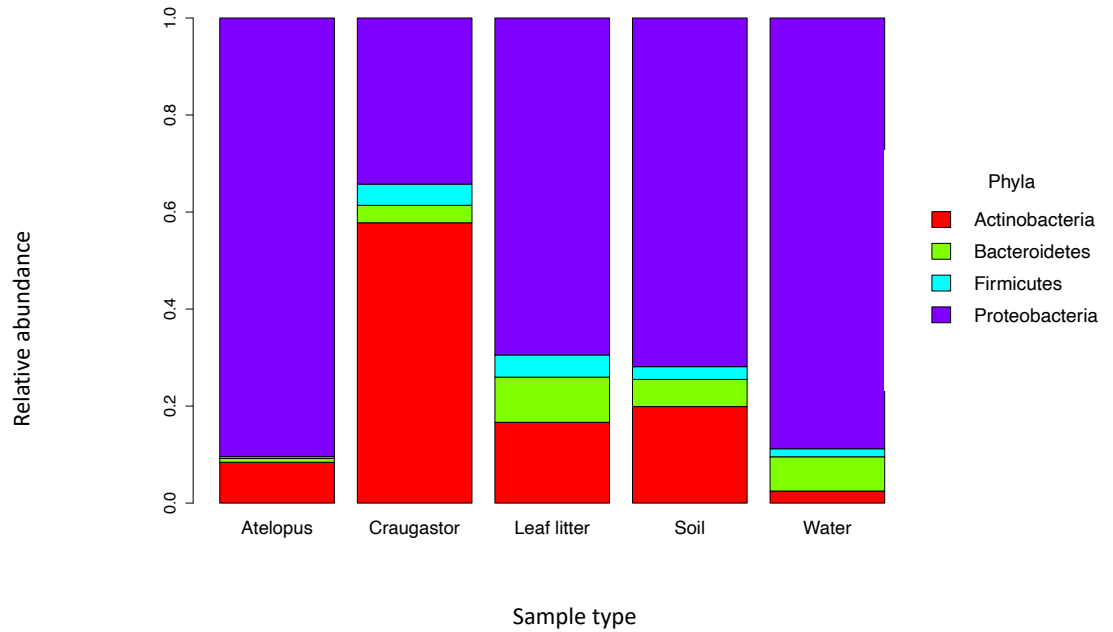


Figura 11. Abundancias relativas de los phyla bacterianas con potencial rol inhibitorio más abundantes en *A. varius*, la especie simpátrica *Craugastor fitzingeri* y sustrato circundante (hojarasca, suelo, agua) muestreados.

Se encontró que las cinco familias bacterianas más prominentes basadas en su abundancia relativa presente en la piel de *A. varius* fueron Comonadaceae 26.8 %, Chitinophagaceae 20.2%, Enterobacteriaceae 9.3 % y Pseudomonadacea 8.0 % (Figura 12).

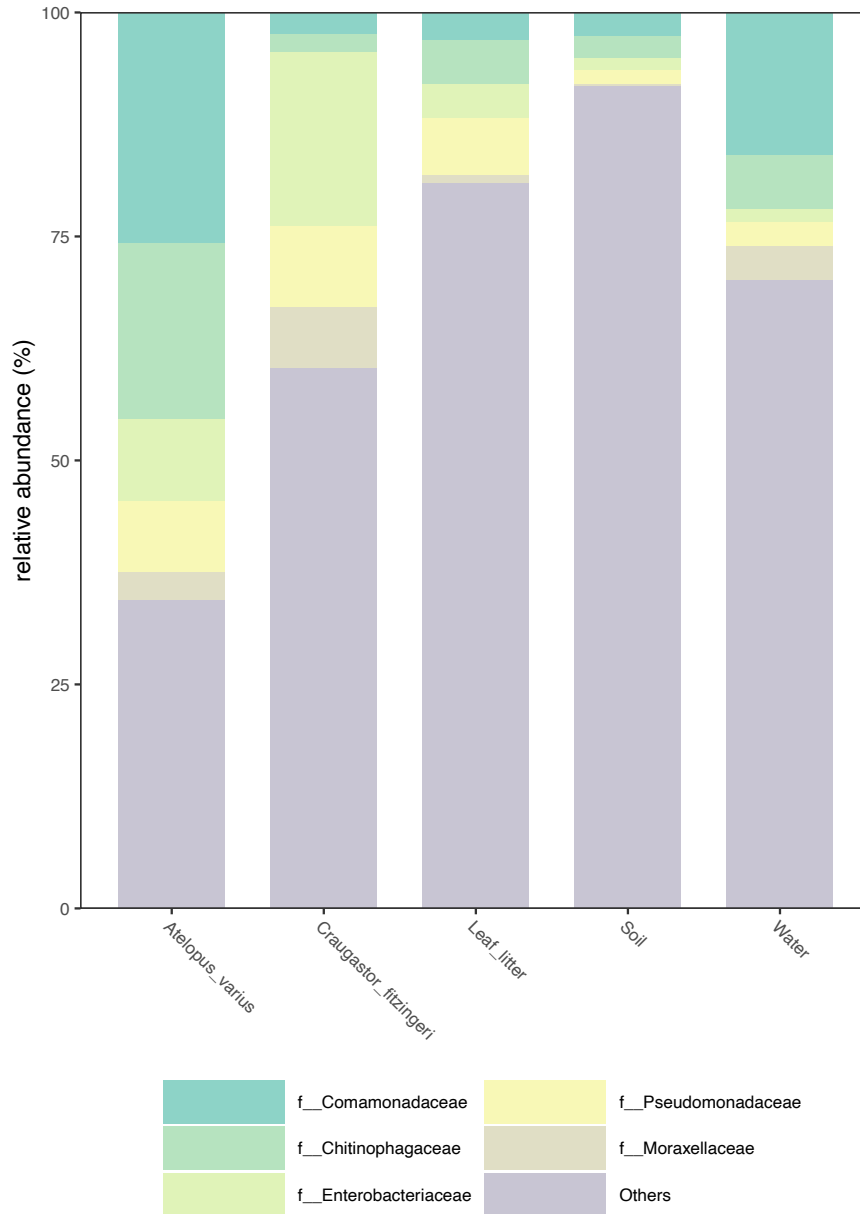


Figura 12. Abundancias relativas de las familias bacterianas con potencial rol inhibitorio más abundantes en *A. varius*, la especie simpátrica *Craugastor fitzingeri* y sustrato circundante (hojarasca, suelo, agua) muestreadas en el Parque Nacional Santa Fe, provincia de Veraguas.

IV. DISCUSIÓN

En este estudio se caracterizó la comunidad bacteriana asociada a la piel de *A. varius* y de la especie simpátrica *C. fitzingeri*, como también de muestras ambientales, con el fin de entender la ecología de estas comunidades microbianas y su posible interacción con Bd en poblaciones que actualmente coexisten con este patógeno. Los hallazgos demuestran que existe una baja prevalencia de infección por Bd en las tres poblaciones en donde se muestreó. En relación con la diversidad bacteriana en la piel de *A. varius*, no se encontró variación en la riqueza de ASVs con relación a variables como la temperatura corporal y estado de infección. Sin embargo, en cuanto la composición y estructura de estas comunidades se determinaron diferencias entre las poblaciones de estudio. Adicionalmente, los resultados muestran que *A. varius* presenta bacterias únicas con un rol potencialmente inhibitorio contra Bd, en comparación con *C. fitzingeri* y las muestras ambientales.

Estudios previos indican que *A. varius* continúa persistiendo en sitios donde ocurrieron mortandades masivas por quitridiomycosis a comienzos de los 2000 (Pérez *et al.*, 2014). De manera similar, nuestros resultados sugieren que las poblaciones de *A. varius* que se encuentran en la región de estudio y que potencialmente coexisten con Bd presentan una baja prevalencia de infección (12.86% en nuestro estudio). Sin embargo, la baja prevalencia observada puede ser debida, en parte, a la baja elevación en la que se encuentran nuestras poblaciones de estudio, en donde al menos dos de éstas están por debajo de los 200 msnm. Otro aspecto que podría explicar la baja prevalencia de infección observada es la variación estacional, dado que nuestro estudio solamente incluyó el final

de la estación lluviosa, en la cual las prevalencias Bd tiende a ser baja en la región de estudio (Macckaferly *et al.*, 2015; Lips *et al.*, 2006).

En este estudio no se encontró un efecto de la temperatura corporal y del estado de infección por Bd en la diversidad alfa de la comunidad bacteriana, y tampoco diferencias entre las poblaciones. Sin embargo, en una de las poblaciones de estudio (DB) observamos una reducción en la riqueza bacteria en los *A. varius* infectados, lo cual es consistente con el patrón observado en *A. limosus* reintroducidos a la naturaleza (Estrada *et al.*, 2022).

En relación con la variación observada en la composición y estructura de las comunidades bacterianas de la piel de *A. varius*, la misma no estuvo asociada a las infecciones por Bd. Esto es consistente con estudios realizados por Belden *et al.* (2015) en otras especies de anfibios encontradas en Panamá, incluyendo *C. fitzingeri*. Por otra parte, encontramos diferencias claras de bacterias con posible rol inhibitorio en la piel de *A. varius*. Específicamente, entre las bacterias potencialmente anti-Bd identificadas en *A. varius* las familias Comamonadaceae, Chitinophagaceae, Enterobacteriaceae y Pseudomonaceae fueron las dominantes.

Estos resultados son sustentados por los hallazgos de Flechas *et al.* (2012) en donde se determinó que dos especies bacterianas de la familia Pseudomonaceae (*P. tolaasii*, y *P. aeuriginosa*), aisladas de tres especies de *Atelopus* de tierras bajas colombianas, tenían una alta capacidad inhibitoria de Bd (hasta un 64 % el crecimiento).

Adicionalmente, un estudio previo utilizando cepas bacterianas del género *Pseudomonas* aisladas de la piel de anfibios muestreados en Panamá determinó que estas cepas podían inhibir el crecimiento de Bd hasta en un 100% (Becker *et al.*, 2015). Por

último, y de modo general, estudios enfocados en entender la interacción entre las bacterias de la piel de anfibios y Bd indican que miembros de varias familias como, Comamonadaceae, así como de las familias Chitinophagaceae Pseudomonaceae, y Enterobacteriaceae tienen capacidades inhibitorias de Bd (Woodhams *et al.*, 2015 y Rebollar *et al.*, 2019), las cuales fueron identificadas en las *A. varius* muestreadas en este estudio.

Los mecanismos que resultan en la variación de las comunidades bacterianas entre hospederos no son bien entendidos, sin embargo, pueden estar asociados a los reservorios ambientales, características propias del hospedero (e.g., perfil de péptidos antimicrobianos), y los taxones que componen el microbioma de la piel de los anfibios (Rebollar *et al.*, 2020). En este estudio encontramos diferencias en la riqueza bacteriana, así como también en la composición y estructura, de la comunidad de bacterias put inhibitorias de Bd entre las poblaciones *A. varius* y los sustratos en donde fueron encontradas. Estos resultados sugieren que las bacterias simbióticas de la piel de *A. varius* son específicas, a tal punto que llegan a variar entre poblaciones. De manera similar, se ha determinado que existe variación en la composición de bacterias inhibitorias de Bd en diferentes especies de anfibios, incluyendo en *Atelopus*. Por ejemplo, además de determinar diferencias en la composición de la comunidad bacteriana en tres especies *Atelopus*, Flechas *et al.* (2012) demostró que algunas cepas inhibitorias de Bd mostraban especificidad al hospedero, en donde *Pseudomonas tolaasii* exhibió mayor capacidad inhibitoria en *A. elgans*, a diferencia de *P. putida* que presentó mayor capacidad inhibitoria en *A. spurrelli*.

De manera general, pudimos determinar que las bacterias más dominantes en la piel de *A. varius* a nivel de phylum fueron aquellas en los phyla Proteobacteria y Actinobacterias. Estos phyla poseen bacterias como las del género *Pseudomonas* y *Actinobacter* que poseen capacidades anti-microbianas, incluyendo en contra de Bd, mediante la producción de metabolitos secundarios (Becker *et al.*, 2015). Sin embargo, a diferencia de estos estudios, en nuestra investigación no aislamos colonias de bacterias. Por lo que recomendamos que para posteriores estudios se incluyan ensayos de inhibición de Bd a partir de bacterias aisladas de la piel de las poblaciones de *A. varius*.

Los factores que intervienen en la supervivencia de algunas poblaciones de anfibios aun no son bien comprendidos. De esta manera, estudios que buscan ampliar nuestro conocimiento sobre la ecología de las bacterias simbióticas de los anfibios a nivel local, y su rol en la persistencia de especies amenazadas, tal y como *A. varius*, frente al hongo Bd, son de suma importancia para contribuir a los planes de manejo y conservación de estas especies *in situ* y de programas de reintroducción.

V. CONCLUSIONES

- Se determinó una baja prevalencia infección por Bd e individuos con cargas de infección moderadas en las poblaciones de estudios de *A. varius*.
- No se determinaron diferencias en la riqueza bacteriana asociadas a la temperatura corporal de los individuos y el estado de infección por Bd; sin embargo, se encontró variación en la composición y estructura de la comunidad bacteriana asociada a la piel de *A. varius* a nivel de sitio.
- *A. varius* presenta una composición de bacterias inhibitorias a Bd distintas en comparación del sustrato y la especie simpátrica *C. fitzingeri* en los sitios de estudios dentro del Parque Nacional Santa Fe.

VI. RECOMENDACIONES

- Se podría evaluar la composición y estructura genética de las poblaciones de *A. varius*, para conocer la variabilidad genética de estas poblaciones que se encuentran en el parque Nacional Santa Fe.
- Caracterizar la comunidad bacteriana a partir de bacterias aisladas de la piel de *A. varius*.
- Realizar ensayos para determinar bacterias con mayor actividad inhibitorias a Bd.
- Realizar estudios enfocados en determinar la presencia de genes en la especie *A. varius* relacionados a la resistencia a infecciones por quítridio.
- Caracterización molecular de genes bacterianos relacionados con la resistencia a Bd.

VII. LITERATURA CITADA

- Amir, A., D. McDonald, J. A. Navas-Molina, E. Kopylova, J. T. Morton, Z. Zech Xu, E. P. Kightley, L. R. Thompson, E. R. Hyde, A. Gonzalez, and R. Knight. 2017. Deblur Rapidly Resolves Single-Nucleotide Community Sequence Patterns. *Msystems* 2:e00191-00116.
- Assis ABd, Barreto CC, Navas CA (2017) Skin microbiota in frogs from the Brazilian Atlantic Forest: Species, forest type, and potential against pathogens. *PLoS ONE* 12(7): e0179628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179628>
- Barinaga, M. 1990. Where have all the froggies gone? *Science* 247:1033– 1035.
- Barrio-Amorós, C. L., & Abarca, J. (2016). Another surviving population of the critically endangered *Atelopus varius* (Anura: Bufonidae) in Costa Rica. *Mesoamerican Herpetology*, 3(1), 128-134
- Belden, L. K., Hughey, M. C., Rebollar, E. A., Umile, T. P., Loftus, S. C., Burzynski, E. A., Minbiole, K. P. C., House, L. L., Jensen, R. V., Becker, M. H., Walke, J. B., Medina, D., Ibáñez, R., & Harris, R. N. (2015). Panamanian frog species host unique skin bacterial communities. *Frontiers in Microbiology*, 6(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01171>
- Belden, L.K., Hughey, M.C. Rebollar E.A., Umile, T.P., Loftus, S.C., Burzynski, E.A., Minbiole, K.P.C, House, L.L., Jensen, R.V., Becker, M.H., Walke, J.B. y Medina, D. (2015). Panamanian frog species host unique skin bacterial communities. *Forntiers in Microbiology*. Vol 6;1171.
- Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham AA, Goggin CL, Slocombe R, Ragan MA, Hyatt AD, McDonald KR, Hines HB, Lips KR, Marantelli G, Parkes

H. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 21;95(15):9031-6. doi: 10.1073/pnas.95.15.9031. PMID: 9671799; PMCID: PMC21197.

Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E., Cunningham, A.A., Goggin, C.L., Slocombe, R., Ragan, M.A., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Hines, H.B., Lips, K.R., 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.

Bernardo-Cravo AP, Schmeller DS, Chatzinotas A *et al.* (2020). Environmental factors and host microbiomes shape host-pathogen dynamics. *Trends Parasitol* :1–18.

Bernardo-Cravo, AP., Schmeller, DS., Chatzinotas, A., Vredenburg, VS. y Loyau, A. (2020). Environmental Factors and Host Microbiomes Shape Host-Pathogen Dynamics. *Trends in Parasitology*,37, 616-633.

Bettin C, Greven H. (1986). Bacteria on the skin of *Salamandra salamandra* (L.) (Amphibia, Urodela) with notes on their possible significance. *Zool Anz.*; 216: 267–70.

Bletz, M., Archer, H., Harris, RN., Mckenzie, VJ., Rabemananja, FCE., Rakotarison, A. y Vences, M. (2017). Host Ecology Rather Than Host Phylogeny drives amphibian

skin microbial community structure in the Biodiversity Hotspot of Madagascar. *Frontiers in Microbiology*,8, 1530.

Bower, D.S., Jennings, C.K., Webb, Y.A., Scwarzkopf, L. Berger, L., Alford, R.A., Georges, A., McKnight, D.T., Carr, L. Nason, D. y Clulow, S. (2020). Disease surveillance of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Papua New Guinea. *Conservation Science and Practice*; 2: e256.

Boyle, D. G., D. B. Boyle, V. Olsen, J. A. T. Morgan, and A. D. Hyatt. 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms* 60: 141–148.

Brannelly, L.A., Webb, R.J., Hunter, D.A., Clemann, N., Skerratt, L.F., Berger, L. y Scheele B.C. (2017). Non-declining amphibians can be important reservoir host for amphibian chytrid fungus. *Animal Conservation*,21,91-101.

Brucker, R.M., Harris, R.N., Schwantes, C.R. *et al.* (2008). Amphibian Chemical Defense: Antifungal Metabolites of the Microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the Salamander *Plethodon cinereus*. *J Chem Ecol* 34, 1422–1429.

Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., *et al.* (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J*, 1621–1624. doi:10.1038/ismej.2012.8

- Chen, M., Kueneman, JG., Gonzalez, A., Humphrey, G., Knight, R. y Mckenzie, VJ. (2022). Predictiong fungal infection rate and severity witg skin associated microbial communities on amphibians. *Mol Ecol.* doi: 10.1111/mec.16372.
- Chung H, Pamp SJ, Hill JA et al. (2012). Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell* ;149:1578–93.
- CODESA. (2008). Plan de Manejo del Parque Nacional Santa Fe, Provincia de Veraguas. Panama.
- Collins, J. P. (2009). *Extinction in our times: global amphibian decline* (M. L. Crump, Ed.) [Book]. Oxford University Press.
- Collins, J.P., (2010). Amphibians decline and extinction: What we know and what we need to learn. *Dis. Aquat. Org.* 92, 93–99.
- Collins, J.P., Crump, M.L., Lovejoy, T.E., III, 2009. *Extinction in Our Times: Global Amphibian Decline*. Oxford University Press.
- Daniel Medina, Sasha E Greenspan, Tamilie Carvalho, C Guilherme Becker, Luís Felipe Toledo, Co-infecting pathogen lineages have additive effects on host bacterial communities, *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 97, Issue 4, April 2021, fiab030, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab030>
- Díaz, S., Fargione, J., Chapin III, F. S., & Tilman, D. (2006). What We Do Not Know: Cascades, Surprises, and Megadiversity Hot-Spots Figure 1. Biodiversity Is Both a Response Variable Affected by Global Change Drivers and a Factor That Affects

Human Well-Being. *Plos Biology*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040277.g001>

Estrada A, Medina D, Gratwicke B, Ibáñez R, Belden LK. 2022 Body condition, skin bacterial communities and disease status: insights from the first release trial of the limosa harlequin frog, *Atelopus limosus*. *Proc. R. Soc. B* 289: 20220586. <https://doi.org/10.1098/rspb.2022.0586>

Farrer, R. A., Weinert, L. A., Bielby, J., Garner, T. W. J., Balloux, F., Clare, F., Bosch, J., Cunningham, A. A., Weldon, C., Du Preez, L. H., Anderson, L., Kosakovsky Pond, S. L., Shahar-Golan, R., Henk, D. A., & Fisher, M. C. (2011). Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(46), 18732–18736. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111915108>

Fisher, M. C., & Garner, T. W. J. (2020). Chytrid fungi and global amphibian declines. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 18, Issue 6, pp. 332–343). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0335-x>

Flechas SV, Sarmiento C, Cárdenas ME, Medina EM, Restrepo S, Amézquita A (2012) Surviving Chytridiomycosis: Differential Anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* Activity in Bacterial Isolates from Three Lowland Species of *Atelopus*. *PLoS ONE* 7(9): e44832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044832>

- Flechas, S.V., Acosta-González, A., Escobar, L.A., Kueneman, J.G., Sánchez-Quitian, Z.A, Parra-Giraldo, C.M., Rollins-Smith, L.A, Reinert, L.K., Vredenburg, V.T., amézquita, A y Woodhams, D.C. (2019). Microbiota and skin defense peptides may facilitate coexistence of two sympatric Andean frog species with a lethal pathogen. *ISME J* **13**, 361–373
- Flórez LV, Biedermann PHW, Engl T *et al.* (2015). Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *Nat Prod Rep* ;**32**:904–36
- Geffers, R., Haddad, CFB., Harris, R.N., Holden, WM., Hughey, M., Jarek, M., Kearns, PJ., Kerby, JL., Kielgast, J., Kurabayashi, A., Longo, AV., Loundon, A., Medina, D., Nuñez, JJ., Bina Perl, R.G., Pinto-Tomás, A., Rabermananjara, FCE., Rebollar, EA., Robriguez A., Rollins-Smith, L., Stevenson, R., Whitfield, SM., Zamudio, KR., Chaves, IZ., Woodhams, DC. y Vences, M. (2019). Community richness of amphibian skin bacteria correlates with bioclimate at the global scale. *Nature ecology & evolution*. 3, 381-389.
- González-Maya, J. F., Gómez-Hoyos, D. A., Cruz-Lizano, I., & Schipper, J. (2018). From hope to alert: demography of a remnant population of the Critically Endangered *Atelopus varius* from Costa Rica. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 53(3), 194-200. <https://doi.org/10.1080/01650521.2018.1460931>
- Gonzalez-Navas, B.A., (2020). Infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* y su relación con la comunidad bacteriana presente en la piel del ensamble de anfibios

de la Reserva de la biosfera Mariposa-Monarca. (Tesis de Doctorado en ciencias).
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Green, D. M., Lannoo, M. J., Lesbarrères, D., & Muths, E. (2020). Amphibian population declines: 30 years of progress in confronting a complex problem. *Herpetologica*, 76(2), 97–100. <https://doi.org/10.1655/0018-0831-76.2.97>

Hertz, A., Lotzkat, S., Carrizo, A., Ponce, M., Köhler, G., Streit, B., 2012. Field notes on findings of threatened amphibian species in the central mountain range of western Panama. *Amphib. Reptile Conserv.* 6, 9–30.

Hird SM. (2017). Evolutionary biology needs wild microbiomes. *Front Microbiol* .8:689–10.

Hird, S. M. (2017). Evolutionary biology needs wild microbiomes. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue APR). Frontiers Research Foundation.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00725>

IUCN SSC Amphibian Specialist Group. 2020. *Atelopus varius*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2020*:
e.T54560A3016252. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T54560A3016252.en>. Accessed on 11 January 2024.

Journal, G., Lötters, S., Veith, M., Wagner, N., Martel, A., & Pasmans, F. (2020). *Bsal-driven salamander mortality pre-dates the European index outbreak*.
<http://www.salamandra-journal.com>

- Kueneman, J.G., Bletz, M.C., Mckenzie, V.J., Becker, C.G., Joseph, M.B., Abarca, J.G., Archer, H., Arellano, A.L., Bataille, A., Becker, M., Belden, L.K., Crottini, A., La Marca, E., Lips, K.R., Lotters, S., Puschendorf, R., Ibañez, R., Rueda-Almonacid, J.V., et al. (2005). Catastrophic Population Declines and Extinctions in Neotropical Harlequin Frogs (Bufonidae: *Atelopus*). *BIOTROPICA*. 37(2):190-201.
- Lips, K. R. (2016). Overview of chytrid emergence and impacts on amphibians. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 371, Issue 1709). Royal Society of London. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0465>
- Lips, K. R. et al. Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 3165–3170 (2006).
- Lips, K. R. Overview of chytrid emergence and impacts on amphibians. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **286**, 20190833 (2016).
- MacMahon, T.A., Brannelly, L.A., Chatfield, M.W.H., Johnson, P.T.J., Joseph, M.B., Mckenzie, V.J., Richards-Zawacki, C.L., Venesky, M.D y Rohr, J.R. (2013). Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* has nonamphibian host and releases chemicals that cause pathology in the absence of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*;110(1):210-5.
- McCaffery, R., Richards-Zawacki, C. L., & Lips, K. R. (2015). The demography of *Atelopus* decline: Harlequin frog survival and abundance in central Panama prior to

and during a disease outbreak. *Global Ecology and Conservation*, 4, 232–242.

<https://doi.org/10.1016/j.gecco.2015.07.003>

McFall-Ngai M., Hadfield M.G., Bosch T.C.G *et al.* 2013 Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proc Natl Acad Sci USA*. **110**:3229–36.

Perez, Rachel, Richards-Zawacki, Corinne, Krohn, Alexander R., Robak, Matthew, Griffith, Edgardo J., Ross, Heidi, Gratwicke, Brian, Ibáñez, Roberto D., and Voyles, Jamie. 2014. "[Field surveys in Western Panama indicate populations of *Atelopus varius* frogs are persisting in regions where *Batrachochytrium dendrobatidis* is now enzootic.](#)" *Amphibian & Reptile Conservation*, 8, (2) 30–35.

Ramírez, J.P., Jaramillo, C.A. Lindquist, E.D., Crawford, A.J. y Ibáñez, R. (2020).

Recent and Rapid Radiation of the Highly Endangered Harlequin Frog (*Atelopus*) into Central America Inferred from Mitochondrial DNA Sequences.

Diversity;12,360.

Rebollar EA, Antwis RE, Becker MH *et al.* (2016). Using “Omics” and Integrated

Multi-Omics Approaches to Guide Probiotic Selection to Mitigate

Chytridiomycosis and Other Emerging Infectious Diseases. *Front Microbiol*

.7:733–19.

Rebollar EA, Gutiérrez-Preciado A, Noecker C, Eng A, Hughey MC, Medina D, Walke

JB, Borenstein E, Jensen RV, Belden LK and Harris RN (2018). The Skin

Microbiome of the Neotropical Frog *Craugastor fitzingeri*: Inferring Potential

- Bacterial-Host-Pathogen Interactions From Metagenomic Data. *Front. Microbiol.* 9:466. doi: 10.3389/fmicb.2018.00466
- Rebollar, E. A., Hughey, M. C., Harris, R. N., Domangue, R. J., & Medina, D. (2014). The Lethal Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* Is Present in Lowland Tropical Forests of Far Eastern Panamá. *PLoS ONE*, 9(4), 95484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095484>
- Rebollar, EA., Hughey, MC., Medina, D., Harris, RN., Ibañez, R. y Belden LK. (2016). Skin bacterial diversity of Panamanian frogs is associated with host susceptibility and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *The ISME Journal*, 1-14.
- Rebollar, EA., Martinez-Ugalde, E. y Ortega, AH. (2020). The Amphibian Skin Microbiome and Its Protective Role Against Chytridiomycosis. *Herpetologica*, 76(2), 167-177-
- Rollins-Smith LA, Ramsey JP, Pask JD *et al.* (2011). Amphibian Immune Defenses against Chytridiomycosis: Impacts of Changing Environments. *Integr Comp Biol.* 51:552–62.
- Savage, J. M. (1972). The harlequin frogs, genus *Atelopus*, of Costa Rica and Western Panama. *Herpetologica*, 28(2), 77–94. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/3891084>
- Scheele, B.C., Pasmans F, Skerratt, L.F. *et al.* (2019). Amphibian fungal pan- zootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science*. 363:1459–63

Simon, J. C., Marchesi, J. R., Mougel, C., & Selosse, M. A. (2019). Host-microbiota interactions: From holobiont theory to analysis. *Microbiome*, 7(1).

<https://doi.org/10.1186/s40168-019-0619-4>

Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T *et al.* (2009). A core gut micro- biome in obese and lean twins. *Nature*.**457**:480–4.

Voyles, J., Young, S., Berger, L., Cambell, C., Voyles, W.F., Dinudom,A., Cook, D., Webb, R., Alford, R.A., Skerratt, L.F. y Speare, R. (2009). Pathogenesis of Chytridiomycosis, a Cause of Catastrophic Amphibian Declines. *Science*. Vol 326, Issue 5952: pp.582-585.

Wake, D.B., and H.J. Morowitz. 1991. Declining amphibian populations: A global phenomenon? Findings and recommendations. Report to Board on Biology, National Research Council, on workshop in Irvine, California 19–20 February 1990. *Alytes* 9:33–42.

Wake, D.B.D., Vredenburg, V.T.V., (2008). Colloquium paper: are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 Suppl 1, 11466–11473.

Walke, J.B., Becker, M.H., Loftus, S.C., House, L.L., Cormier, G., Jensen, R.V. y Belden L. (2014). Amphibian skin may select for rare environmental microbes.

Woodhams DC, Bosch J, Briggs CJ, Cashins S, Davis LR, Lauer A, Muths E, Puschendorf R, Schmidt BR, Sheafor B, et al. (2011). Mitigating amphibian

disease: strategies to maintain wild populations and control chytridiomycosis. *Front Zool.* 8(1):8. doi:10.1186/1742-9994-8-8.

Woodhams, D. C., Alford, R. A., Antwis, R. E., Archer, H., Becker, M. H., Belden, L.

K., Bell, S. C., Bletz, M., Daskin, J. H., Davis, L. R., Flechas, S. V, Lauer, A.,

Gonzalez, A., Harris, R. N., Holden, W. M., Hughey, M. C., Knight, R.,

Kueneman, J., Rabemananjara, F., ... Mckenzie, V. (2015). Antifungal isolates

database of amphibian skin-associated bacteria and function against emerging

fungal pathogens. In *Ecology* (Vol. 96, Issue 2). <http://esapubs.org/archive>

Yoffe, E. 1992. Silence of the frogs. *New York Times* (National Edition). 13 December 1992: Section 6:36.

Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution

of animals and plants: The hologenome theory of evolution. In *FEMS Microbiology*

Reviews (Vol. 32, Issue 5, pp. 723–735). <https://doi.org/10.1111/j.1574->

[6976.2008.00123.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x)