

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Caracterización del microbioma cutáneo de
Plectrohyla matudai y *Bolitoglossa* y sus cambios en
respuesta al cautiverio

Trabajo de investigación presentado
por Daniel Gygax
para optar al grado de Licenciado en Biología.

Guatemala,

2020

Caracterización del microbioma cutáneo de
Plectrohyla matudai y *Bolitoglossa* y sus cambios en
respuesta al cautiverio

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Caracterización del microbioma cutáneo de
Plectrohyla matudai y *Bolitoglossa* y sus cambios en
respuesta al cautiverio

Trabajo de investigación presentado
por Daniel Gygax
para optar al grado de Licenciado en Biología.

Guatemala,

2020

Vo.Bo.



(M.Sc. Olga Alejandra Zamora Jerez)

Tribunal examinador:



(M.Sc. Olga Alejandra Zamora Jerez)



(M.Sc. Daniel Ariano Sánchez)



(Lic. Alejandro Vásquez)

Fecha de aprobación del examen de graduación:

(Guatemala, 22 de octubre de 2020)

CONTENIDO

Lista de cuadros	viii
Lista de figuras	viii
Resumen	ix
I. Introducción.....	1
II. Justificación	3
III. Objetivos.....	5
A. Objetivo general:	5
B. Objetivos específicos:	5
IV. Marco teórico	6
A. La crisis global de anfibios.....	6
B. <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (<i>Bd</i>)	7
C. Conservación <i>ex-situ</i> de anfibios	8
D. Importancia del microbioma cutáneo en los anfibios	10
E. <i>Plectrohyla matudai</i>	12
F. <i>Bolitoglossa</i>	13
G. Microbioma bacteriano en <i>Plectrohyla</i> y <i>Bolitoglossa</i>	14
V. Metodología.....	16
A. Colecta de especímenes.....	16
B. Manejo y cuidado de los animales.....	17
C. Extracción de ADN.....	19
D. Amplificación y secuenciación.....	19
E. Análisis de datos	19
VI. Resultados.....	21
A. Composición del microbioma bacteriano cutáneo de los especímenes.	21
B. Diversidad alfa.....	25
C. Diversidad beta.....	34
D. Cambios en la composición de comunidades.....	35
VII. Discusión de resultados	42
A. Análisis del microbioma	42
B. Cuidado y manejo de <i>P. matudai</i>	46
C. Cuidado y manejo de <i>Bolitoglossa</i>	47

VIII. Conclusiones	49
IX. Bibliografía.....	51
X. Anexos.....	61
A. Guía para el manejo y cuidado en cautiverio de <i>P. matudai</i>	61

Lista de cuadros

Cuadro 1. Selección de modelo basado en AIC	33
Cuadro 2. Magnitud del efecto (β), error estándar (SE), intervalos de confianza inferior (LCI) y superior (UCL) de las variables explicativas para el análisis de riqueza de especies en las comunidades microbianas	33
Cuadro 3. Resultados de análisis de adonis (PERMANOVA).....	34

Lista de figuras

Figura 1. Sitio de colecta, La Unión Zacapa, Guatemala.....	17
Figura 2. Abundancia relativa de las nueve clases de bacterias cutáneas más prevalentes en <i>P. matudai</i>	21
Figura 3. Abundancia relativa de los veinte géneros de bacterias cutáneas más prevalentes en <i>P. matudai</i>	22
Figura 4. Abundancia relativa de las ocho clases de bacterias cutáneas más prevalentes en <i>Bolitoglossa</i> spp.....	23
Figura 5. Abundancia relativa de los veinte géneros de bacterias cutáneas más prevalentes en <i>Bolitoglossa</i> spp.	24
Figura 6. Diversidad alfa por etapa (Terrario A).....	26
Figura 7. Diversidad alfa por etapa (Terrario B)	27
Figura 8. Diversidad alfa por etapa (Terrario C)	29
Figura 9. Diversidad alfa por etapa (Terrario D).....	30
Figura 10. Diversidad alfa del microbioma en <i>P. matudai</i> por semana	32
Figura 11. Composición de clases del microbioma de <i>P. matudai</i> por etapa (Terrarios A y B)	36
Figura 12. Composición de géneros del microbioma <i>P. matudai</i> por etapa (Terrarios A y B)	37
Figura 13. Composición de clases del microbioma de <i>P. matudai</i> por etapa (Terrario C) ..	38
Figura 14. Composición de géneros del microbioma <i>P. matudai</i> por etapa (Terrario C)	39
Figura 15. Composición de clases del microbioma de <i>Bolitoglossa</i> spp. por etapa (Terrario D)	40
Figura 16. Composición de éneros del microbioma de <i>Bolitoglossa</i> spp. por etapa (Terrario D)	41

Resumen

Según la IUCN, los anfibios, representan el taxón con más especies amenazadas del planeta. Mientras que algunas de las amenazas se deben a actividades antropogénicas, las cuales son, en principio, mitigables, mientras que otras como el cambio climático y las enfermedades infecciosas emergentes no lo son. Los programas *ex-situ* son una medida de último recurso para salvar y han ayudado a evitar la extinción de varias especies en el pasado.

Los programas de crianza de anfibios en cautiverio vienen con ciertos retos y riesgos asociados. Estos incluyen la pérdida de diversidad genética, cambios en comportamiento y alteraciones en el microbioma cutáneo. El estado del microbioma en la piel de los anfibios ha mostrado ser factor importante en la salud de los individuos y poblaciones.

El objetivo de este estudio es la determinación y documentación de los cambios en las comunidades bacterianas en la piel de especímenes de *Bolitoglossa* y *Plectrohyla matudai* luego de trasladarlos de la naturaleza a cautiverio. Para esto se analizaron los datos obtenidos luego de la amplificación y secuenciación de muestras de hisopados cutáneos. Estas muestras fueron tomadas el día de la captura y cada 15 o 30 días durante los siguientes 12 meses en cautiverio.

Nuestros resultados sugieren que la composición del microbioma cutáneo de *P. matudai* y *Bolitoglossa spp.*, se encuentra más asociada al hospedero que a su entorno. Sin embargo, se observó que la diversidad alfa aumentó al introducir a los animales a los terrarios. Interesantemente, si el terrario era “estéril” o natural mostró tener un efecto pequeño en la diversidad de las comunidades bacterianas. También se observó que algunos géneros de bacterias que han mostrado capacidad para inhibir el *Bd*, están entre los más prevalentes y abundantes en los individuos muestreados.

Abstract

According to the IUCN, the amphibians represent the taxon with the highest number of endangered species. While some of the threats are due to anthropogenic activities, and are in principle, mitigable, other threats like climate change and emergent infectious diseases are not currently mitigable. Ex situ conservation programs are a last resort measure for saving highly endangered species from extinction and have had success with some species in the past.

However, amphibian captive breeding programs come with certain associated risks and challenges. This include but are not limited to, loss of genetic diversity, behavioral changes, and alterations of the skin microbiome. It has been repeatedly shown that the state of the cutaneous microbiome is an important factor that can influence the health of amphibian individuals and populations.

The goal of this study is the documentation of possible changes in the bacterial communities on the skin of *Bolitoglossa* and *P. matudai* individuals after being moved from the field into a captive setting. For this, DNA from cutaneous swab samples was isolated, amplified, and sequenced. The samples were taken right after collecting the animal and subsequently every 15 or 30 days during a twelve-month period.

Our results suggest that the cutaneous microbiome composition in *P. matudai* and *Bolitoglossa spp* is highly associated to the host and not the surrounding environment. However, it was observed that the alfa diversity rose after moving the animals into the tanks. Interestingly, the type of terrarium, either “sterile” or “natural”, showed having only a small effect on the bacterial communities diversity. We also observed that some bacterial genera associated with *Bd* inhibition were among the most prevalent and abundant in the sampled individuals.

I. Introducción

Las comunidades bacterianas asociadas a hospederos tienen efectos en la salud en muchas especies, incluyendo humanos (Fierer *et al.*, 2012), corales (Rosenberg *et al.*, 2007), insectos (Dillon *et al.*, 2005) y anfibios (Harris *et al.*, 2009a, b). Las comunidades microbianas asociadas a la piel de los anfibios son cada vez más reconocidas por su complejidad ecológica e importancia en la defensa contra patógenos (Bletz *et al.*, 2013; Walke & Belden, 2016). Entender cómo el microbioma cutáneo de los anfibios responde a estresores bióticos y abióticos como los cambios en el ambiente del hospedero y ataques de patógenos, continúa siendo una pregunta importante con aplicaciones en la conservación de anfibios (Bates *et al.*, 2019).

A pesar de los esfuerzos, aún no está completamente claro cómo el microbioma cutáneo de los anfibios es influenciado por los reservorios naturales, factores asociados al hospedero y presencia de patógenos (Rebollar *et al.*, 2016). Además, lo que aplica para una especie, de un gremio ecológico, en un tipo de hábitat no necesariamente aplica para otra especie diferente con nicho y hábitats distintos. Es importante investigar y caracterizar el microbioma y su dinámica ecológica, en otras especies en diferentes países (Harris *et al.*, 2009a), especialmente en sitios con especies amenazadas y presencia de *Bd*. Esto puede facilitar la adaptación de las estrategias de conservación a las necesidades de la especie.

Es importante mencionar que nuestro conocimiento en esta área ha aumentado en gran parte gracias a que avances en la microbiología molecular nos han permitido estudiar estas comunidades bacterianas tan complejas mucho más detalladamente (Belden *et al.*, 2015).

El principal objetivo de este estudio es determinar y documentar los cambios en las comunidades bacterianas en la piel de especímenes de *Bolitoglossa* y *Plectrohyla matudai* luego de moverlos de la naturaleza a cautiverio. Para esto se tomaron hisopados cutáneos de individuos de *P. matudai* y *Bolitoglossa* spp. cada 15 o 30 días durante un período de 12 meses. Las muestras se tomaron en campo, durante la cuarentena y durante varios meses luego de introducir los animales a un terrario. Algunos terrarios se equiparon con material comercial esterilizado mientras que otro fue equipado solo con tierra, vegetación y refugios del sitio de colecta. Se aisló el ADN de los hisopados cutáneos y se amplificó la región V4 de la subunidad rRNA del gen 16S para la identificación bacterias. Después de la secuenciación del ADN, los datos fueron analizados con R studio.

Encontramos la composición del microbioma cutáneo de *P. matudai* y *Bolitoglossa* spp, se encuentra más asociada al hospedero que a su entorno. También se observó que la diversidad alfa aumentó al introducir a los animales a los terrarios. Interesantemente, si el terrario era “estéril” o “natural” parece no tener un efecto fuerte sobre la diversidad de las comunidades bacterianas. También se observó que algunos géneros de bacterias que han mostrado capacidad para inhibir el *Bd*, están entre los más prevalentes y abundantes en los individuos muestreados.

II. Justificación

Estamos en medio de una ola global de pérdida de biodiversidad cuya velocidad y magnitud ha sido suficiente para que algunos expertos la consideren la “sexta extinción masiva” (Ehrlich & Wilson, 1991; Myers, 1993; Dirzo *et al.*, 2014; Leaky & Lewin, 1992; Wilson, 1993). Esta pérdida de biodiversidad afecta a los taxa de manera asimétrica, siendo los anfibios el grupo de vertebrados más afectado (Becker *et al.*, 2007; Wake & Vredenburg, 2008). Los anfibios son importantes para la estabilidad de los ecosistemas donde habitan y para los humanos. Son buenos indicadores de salud ambiental, son fuentes potenciales de compuestos bioactivos y debido a su posición en la cadena alimenticia, pueden funcionar como controles de plaga y vectores de enfermedades (Crump, 2010; Valencia-Aguilar, 2013).

Los factores responsables por los declives poblacionales y extinciones de anfibios incluyen la destrucción y fragmentación de hábitat, cambio climático, comercio ilegal de fauna y enfermedades infecciosas, especialmente la quitridiomycosis (Stuart *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2001; Lips *et al.*, 2005; Whitfield *et al.*, 2007; Wake & Vredenburg, 2008; Crump, 2010). Mientras que algunas de estas amenazas no son actualmente mitigables como el *Bd*, y el cambio climático, otras amenazas están bajo control directo de los humanos y son, en principio, mitigables. Las especies de anfibios que enfrentan dichas amenazas pueden y deberían ser protegidas dentro de su hábitat natural (Zippel *et al.*, 2011). Dicho esto, incluso si existiera la voluntad para mitigar todas las amenazas bajo control directo, cientos de especies todavía enfrentarían posibles declives y extinciones en la naturaleza (Zippel *et al.*, 2011). La falta de recursos o éxito en la conservación *in situ* de anfibios sumado a la rapidez de los declives poblacionales ha aumentado la consideración del uso de estrategias *ex situ* para el rescate de algunas especies de anfibios.

Estos programas han salvado de la extinción y recuperado las poblaciones de diferentes especies de anfibios (Griffiths & Pavajeau, 2008; Lewis *et al.*, 2019; IUCN Red List, 2020). Sin embargo, estos programas conllevan riesgos asociados lo cuales deben ser

manejados apropiadamente si estos han de tener éxito. Aparte del riesgo de perder diversidad genética, el cautiverio ha mostrado tener impactos negativos en el comportamiento y el microbioma cutáneo de los anfibios (Waldman & McKinnon 1993; Kraaijeveld-Smit *et al.*, 2006; Allentoft *et al.*, 2010; Kueneman *et al.*, 2016; Passos *et al.*, 2017^a; Passos *et al.*, 2017b). No obstante, con suficiente conocimiento y el manejo apropiado, estos riesgos pueden ser controlados.

Las comunidades microbianas asociadas a la piel de los anfibios son cada vez más reconocidas por su complejidad ecológica e importancia en la defensa contra patógenos (Bletz *et al.*, 2013; Walke & Belden, 2016). Se ha documentado que la relación simbiótica entre el individuo y su microbioma cutáneo puede jugar un papel importante en la inmunidad y resistencia contra patógenos como *B. dendrobatidis* (Rollin-Smiths *et al.*, 2005; Brucker *et al.*, 2008b). Sin embargo, existe un gran número de especies amenazadas distribuidas en una variedad de hábitats y ocupando nichos muy diferentes, por lo cual resulta arriesgado asumir que lo que aplica para una especie aplica para todas. Entender cómo el microbioma cutáneo de las diferentes especies de anfibios en distintos hábitats responde a estresores bióticos y abióticos como los cambios en el ambiente del hospedero y ataques de patógenos, continúa siendo una pregunta importante con aplicaciones en la conservación de anfibios (Bates *et al.*, 2019). Es importante investigar y caracterizar el microbioma y su dinámica ecológica, en otras especies en diferentes países (Harris *et al.*, 2009a), especialmente en sitios con especies amenazadas y presencia de *Bd*. Esto puede facilitar la adaptación de las estrategias de conservación a las necesidades de la especie.

III. Objetivos

A. Objetivo general:

Determinación y documentación de los cambios en las comunidades bacterianas en la piel de especímenes de *Bolitoglossa* y *Plectrohyla matudai* luego de moverlos de vida silvestre a cautiverio.

B. Objetivos específicos:

- Determinar los potenciales efectos de las diferentes etapas de los protocolos de programas de cautiverio en el microbioma cutáneo de anfibios.
- Establecer protocolos de manejo y cuidado en cautiverio para *Plectrohyla matudai*.

IV. Marco teórico

A. La crisis global de anfibios

Estamos viviendo en medio de una crisis de biodiversidad en la cual están siendo extirpadas especies y ecosistemas causando el declive y extinción de varias poblaciones. La gran mayoría de estos cambios se deben a presiones antropogénicas (Ehrlich & Wilson, 1991; Myers, 1993; Dirzo *et al.*, 2014). Algunos expertos consideran que la magnitud y velocidad de esta pérdida de biodiversidad es suficiente para llamarla la “sexta extinción masiva” (Leaky & Lewin, 1992; Wilson, 1993). Desafortunadamente los anfibios han sido uno de los grupos más afectados anfibios (Becker *et al.*, 2007; Wake & Vredenburg, 2008).

Desde los años 90 las poblaciones de anfibios han estado disminuyendo de manera alarmante (Young *et al.*, 2001), en promedio es el taxón con más especies amenazadas del planeta, con más del 41% de sus especies clasificadas bajo algún grado de amenaza (eg. VU, EN, CR). Al menos 33 especies ya están extintas y 2 están extintas en la naturaleza y se cree que 143 especies más pueden estar extintas (IUCN Red List, 2020). El número de especies amenazadas ha subido rápidamente durante los últimos 22 años. En 1996-1998 la IUCN reportó 18 especies de anfibios clasificadas como críticamente amenazadas, en el 2020 este número se incrementó a 587. Para las especies clasificadas como amenazadas y vulnerables el número subió de 31 a 965 y de 75 a 650, respectivamente. Los anfibios se encuentran bajo riesgo de extinción debido a varios factores que incluyen la destrucción y fragmentación de hábitat, cambio climático, comercio ilegal de fauna y enfermedades infecciosas, especialmente la quitridiomycosis (Stuart *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2001; Lips *et al.*, 2005; Whitfield *et al.*, 2007; Wake & Vredenburg, 2008; Crump, 2010).

Los anfibios son importantes para los ecosistemas donde habitan (eg. estabilidad de ciclos de nutrientes y redes tróficas) y también para los humanos. Debido a la sensibilidad de su piel a los cambios ambientales, son buenos bioindicadores del estado de un sitio. Sus secreciones cutáneas representan una posible fuente importante de compuestos bioactivos.

Además, son una parte importante de la cadena alimenticia y pueden ayudar a regular poblaciones de insectos, incluyendo algunos vectores de enfermedades humanas (eg. dengue y malaria) o plagas de cultivos (Crump, 2010; Valencia-Aguilar, 2013).

B. *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd)

La quitridiomycosis es una enfermedad emergente de anfibios causada por el hongo patógeno *B. dendrobatidis*. En 1998 fue asociada a declives de poblaciones de anfibios en Australia y Panamá (Berger *et al.*, 1998; Longcore *et al.*, 1999). Luego fue conectada a declives poblacionales en varias partes del mundo incluyendo Norte-, Sur- y Centroamérica, Nueva Zelanda, Europa y África (Longcore *et al.*, 1999; Daszak *et al.*, 2000; Lips *et al.*, 2003; Mazzoni, 2003; Stuart 2004; Lips *et al.*, 2005; Puschendorf, 2006; Felger, *et al.*, 2007; Lawson, 2009; Ruano *et al.* 2011). Un estudio reciente siguió los rastros hasta detectar la putativa sepa ancestral del hongo en la Península de Corea, sugiriendo fuertemente que la península coreana es lugar de origen de la panzootia. Debido al acelerado comercio de especies de anfibios se pueden encontrar todos los linajes de *B. dendrobatidis* en especies comercializados. El hongo se ha vuelto omnipresente y continúa diversificándose rápidamente (O'Hanlon *et al.*, 2018).

En anfibios, la piel es uno de los órganos más importantes ya que encuentra involucrada en la respiración, hidratación, osmorregulación y termorregulación (Duellman & Trueb, 1986). Los anfibios generalmente tienen la piel delgada, permeable, y muchas especies respiran parcialmente por ella, mientras que algunas especies sin pulmones dependen completamente de la respiración cutánea (Duellman & Trueb, 1986). Los anfibios también absorben agua y electrolitos por la piel y los anuros lo hacen especialmente por medio de un parche de piel en la parte ventral del abdomen, el cual es particularmente susceptible al *Bd* (Berger *et al.*, 1998). La infección por *Bd* en la piel de los anfibios puede perjudicar el transporte de electrolitos a tal grado que ocurra un paro cardíaco y muerte del animal (Voyles *et al.*, 2009). La infección por *Bd* también puede causar hiperqueratosis (engrosamiento de la capa queratinizada más externa de la piel (Longcore *et al.*, 1999). En los renacuajos, el hongo *Bd* infecta solo las partes bucales, la única parte del cuerpo del

renacuajo que contiene queratina (Rachowicz & Vredenburg, 2004). La tasa de mortalidad y el tiempo entre la exposición a *Bd* y la muerte son influenciadas por la dosis del patógeno, temperatura, edad, etapa de desarrollo, especie y cepa de *Bd* (Berger *et al.*, 1999; Lamirande & Nichols, 2002; Rachowicz & Vredenburg 2004; Berger *et al.*, 2004, 2005).

La quitridiomicosis parece estar afectando a las ranas en mayor medida que a las salamandras, pero hay que considerar que menos investigación se ha realizado en salamandras y datos recientes han indicado que las salamandras neotropicales también han sido severamente afectadas por la quitridiomicosis (Rovito *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2011). Se ha estimado que el *Bd* es responsable del severo declive de al menos 501 especies de anfibios, incluyendo 90 posibles extinciones (Sheele *et al.*, 2019), y para final de los años 90 al menos 30 géneros de anfibios en 9 familias diferentes ya habían sido afectados (Young *et al.*, 2001). La enfermedad ha sido detectada en todos los países de Mesoamérica. México (Lips *et al.*, 2004; Frías-Álvarez *et al.*, 2008; Aanensen, 2006), Guatemala (Mendelson, 2004; Ruano *et al.*, 2011, Chang *et al.*, 2011; Belize (Kaiser & Pollinger, 2012), El Salvador (Felger *et al.*, 2007; Lawson, 2009), Honduras (Pushendorf *et al.*, 2006; Kolby *et al.*, 2009), Nicaragua (García-Roa *et al.*, 2014), Costa Rica (Lips *et al.*, 2003; Puschendorf, 2003).

C. Conservación *ex-situ* de anfibios

Mientras que *in-situ* se refiere al contexto de un animal en la naturaleza, *ex-situ* se refiere a su estado en cautiverio (Zippel *et al.*, 2011). Las amenazas que enfrentan los anfibios son diversas, muchas veces sinérgicas y casi completamente antropogénicas (Stuart *et al.*, 2004; Young *et al.* 2001; Lips *et al.*, 2005; Whitfield *et al.*, 2007; Wake & Vredenburg, 2008; Crump, 2010). La mayoría de las amenazas están bajo control directo y podrían ser, en principio, mitigables (dejando a un lado factores socioeconómicos y políticos que pueden interferir con su mitigación). Las especies de anfibios que enfrentan dichas amenazas pueden y deberían ser protegidas dentro de su hábitat natural (Zippel *et al.*, 2011). Otras amenazas como las infecciones por *Bd* y el cambio climático no son, en la actualidad, mitigables y probablemente no podrán ser mitigadas a tiempo para prevenir más

extinciones. Consecuentemente, incluso si existiera la voluntad para mitigar todas las amenazas bajo control directo, cientos de especies todavía enfrentarían posibles declives y extinciones en la naturaleza (Zippel *et al.*, 2011). De este modo, rescatar especies en cautiverio es una medida de último recurso, es decir, una respuesta a la falta y/o falla de acciones *in-situ*.

Gracias a algunos programas *ex-situ*, algunas especies previamente catalogadas como Extintas en la Naturaleza, han sido reestablecidas en su hábitat, por ejemplo, el Orix Árabe (*Oryx leucoryx*), el Hurón de pies negros (*Mustela nigripes*) y el Cóndor de California (*Gymnogyps californianus*) (IUCN Red List, 2020). Aun así, se podría argumentar que los programas *ex-situ* desvían recursos limitados lejos de esfuerzos *in-situ* más importantes (Snyder *et al.*, 1996). Sin embargo, este argumento puede perder fuerza conforme algunos de los actores principales de la conservación *ex-situ*, como los zoológicos, invierten más recursos en proyectos *in-situ* (Gusset & Dick, 2010).

Los anfibios han sido considerados como buenos candidatos para programas de reproducción en cautiverio por varias razones. Esto incluye atributos generales de los anfibios como un tamaño pequeño y su asociado requerimiento de poco espacio, alta fecundidad, aplicabilidad de tecnologías reproductivas, poca duración generacional, comportamiento muy influenciado por patrones de acción fijos, bajo costo de estos programas comparado con programas para otros vertebrados y la existente capacidad del sector privado y zoológicos para llevarlos a cabo (Bloxam & Tonge, 1995; Balmford *et al.* 1996; Griffiths & Pavajeau, 2008; Browne *et al.*, 2011; Smith & Sutherland, 2014). No obstante, estas son generalizaciones y muchas especies amenazadas de anfibios no cumplen uno o más de estos criterios, afectando su idoneidad como candidato para un programa de reproducción (Tapley *et al.*, 2015). Un análisis cuidadoso es necesario antes de seleccionar una especie para programas de reproducción en cautiverio.

Los programas de crianza de anfibios en cautiverio vienen con ciertos retos y riesgos asociados. Las poblaciones mantenidas en cautiverio durante múltiples generaciones corren el riesgo de perder diversidad genética, producir combinaciones alélicas perjudiciales e incluso de ser sometidas a selección artificial para rasgos desadaptativos (Waldman y

McKinnonm, 1993; Kraaijeveld-Smit *et al.*, 2006; Allentoft *et al.*, 2010). Además, cada vez se obtiene más evidencia que el cautiverio puede tener otros impactos negativos en diferentes aspectos de la ecología y comportamiento de los anfibios, por ejemplo, puede afectar sus vocalizaciones, su respuesta contra depredadores y el microbioma cutáneo (Kueneman *et al.*, 2016; Passos *et al.*, 2017a; Passos *et al.*, 2017b). Todos estos factores pueden potencialmente afectar la supervivencia de los animales y poblaciones liberadas (Passos *et al.*, 2018).

Una revisión publicada en 2008 acerca de la efectividad de los programas de crianza e introducción de anfibios reportó que 12 de 14 especies que eran parte de estos programas, lograron reproducirse con éxito luego de la liberación, con siete de las especies logrando el objetivo final de establecer poblaciones autosostenibles en la naturaleza (Griffiths & Pavajeau, 2008). Este 50% de éxito señala que existe espacio para mejorar. No obstante, cada año se genera más información nueva que va a ayudar a mejorar las prácticas de manejo de anfibios en cautiverio, mejorando el éxito de los programas. Es importante señalar que muchos programas han iniciado dentro de los últimos 10 años, y que puede tomar varios años establecer un programa y desarrollar técnicas de manejo exitosas antes de que puedan ocurrir las liberaciones, seguido por años de monitoreos rigurosos post-liberación, antes de poder juzgar un programa como exitoso o no. En otras situaciones, ocurren retrasos debido a que las amenazas en la naturaleza no han sido mitigadas y la liberación debe posponerse (Tapley *et al.*, 2015).

D. Importancia del microbioma cutáneo en los anfibios

Las comunidades bacterianas asociadas a hospederos tienen efectos en la salud en muchas especies, incluyendo humanos (Fierer *et al.*, 2012), corales (Rosenberg *et al.*, 2007), insectos (Dillon *et al.*, 2005) y anfibios (Harris *et al.*, 2009a, b). Las comunidades microbianas asociadas a la piel de los anfibios son cada vez más reconocidas por su complejidad ecológica e importancia en la defensa contra patógenos (Bletz *et al.*, 2013; Walke & Belden, 2016). Entender como el microbioma cutáneo de los anfibios responde a estresores bióticos y abióticos como los cambios en el ambiente del hospedero y ataques

de patógenos, continúa siendo una pregunta importante con aplicaciones en la conservación de anfibios (Bates *et al.*, 2019).

Se ha documentado que la relación simbiótica entre el individuo y su microbioma cutáneo puede jugar un papel importante en la inmunidad y resistencia contra patógenos como *B. dendrobatidis* (Rollin-Smiths *et al.*, 2005; Brucker *et al.*, 2008b). Incluso se han identificado algunos géneros de bacteria con la capacidad de inhibir hongos quitridios como *Stenotrophomonas*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Janthinbacterium*, *Pseudomonas* y *Pedobacter* (Harris *et al.*, 2006; Brucker *et al.*, 2008; Lauer *et al.*, 2008; Becker *et al.*, 2015; Becker *et al.*, 2015b). Esa capacidad inhibitoria suele ser atribuida a la producción de ciertos metabolitos que han mostrado tener actividad antifúngica en experimentos *in vitro* (Brucker *et al.* 2008; Brucker *et al.*, 2008b). Interesantemente, mientras unas bacterias pueden inhibir el crecimiento del hongo, bacterias como *Microbacterium sp.* han mostrado facilitar la infección, posiblemente por la secreción de compuestos nutritivos que el patógeno puede utilizar (Bell *et al.*, 2013; Becker *et al.*, 2015).

Otros factores importantes que influyen en la inhibición del hongo son la densidad, composición del microbioma y los niveles de infección (Harris *et al.*, 2006; Harris *et al.*, 2009a; McKenzie *et al.*, 2012; Becker *et al.*, 2015). La composición del microbioma puede diferir entre individuos en cautiverio e individuos salvajes (Becker *et al.*, 2014). Un estudio mostró pérdidas de diversidad bacteriana en la piel de dos especies de tritón en cautiverio (Bates *et al.* 2019). Los individuos en cautiverio pueden tener menos oportunidad de obtener distintas bacterias debido a que viven en un ambiente controlado (Antwis *et al.*, 2014). De hecho, un estudio mostro que mantener un reservorio natural de bacterias (ie. suelo del hábitat natural de la especie) en el terrario, puede reducir la pérdida de diversidad bacteriana en la piel de algunas salamandras (Loudon *et al.*, 2014). Sin embargo, también se ha observado que incluso después de varios años, algunos individuos de laboratorio todavía comparten ciertas cantidades de riqueza y diversidad bacteriana con ranas silvestres (Becker *et al.*, 2014).

A pesar de los esfuerzos, aún no está completamente claro como el microbioma cutáneo de los anfibios es influenciado por los reservorios naturales, factores asociados al hospedero

y presencia de patógenos (Rebollar *et al.*, 2016). Además, lo que aplica para una especie, de un gremio ecológico, en un tipo de hábitat no necesariamente aplica para otra especie diferente con nicho y hábitats distintos. Es importante investigar y caracterizar el microbioma y su dinámica ecológica, en otras especies en diferentes países (Harris *et al.*, 2009a), especialmente en sitios con especies amenazadas y presencia de *Bd*. Esto puede facilitar la adaptación de las estrategias de conservación a las necesidades de la especie.

Es importante mencionar que nuestro conocimiento en esta área ha aumentado en gran parte gracias a que avances en la microbiología molecular nos han permitido estudiar estas comunidades bacterianas tan complejas mucho más detalladamente (Belden *et al.*, 2015). Las bacterias que pueden ser cultivadas son una pequeña fracción de diversidad total que existe en la naturaleza (Stewart, 2012). Es por esto que los avances en las técnicas moleculares, incluyendo la purificación y amplificación de ácidos nucleicos, así como en la secuenciación de nueva generación nos permiten caracterizar la diversidad microbiana como mayor precisión, incluyendo organismos no cultivables. Los microbiomas suelen ser estudiados principalmente utilizando enfoques metagenómicos y códigos de barras genéticos (Rowe *et al.*, 2017).

E. *Plectrohyla matudai*

P. matudai es una de aproximadamente 42 especies de hílidos dentro del género *Plectrohyla*. Actualmente se encuentra clasificada como Preocupación Menor (LC) principalmente debido a su relativamente amplia distribución, población grande y tolerancia a cierto grado de perturbación de hábitat. Sin embargo, su hábitat, compuesto principalmente de bosque pino encino y bosques lluviosos, se encuentra muy fragmentado (IUCN Red List, 2020). Su distribución incluye las pendientes del Pacífico de Chimalapas en Oaxaca atravesando la Sierra Madre en Chiapas, México (Ochoa-Ochoa & Whittaker 2014). En Guatemala es relativamente común en algunas localidades al este y oeste de la Costa del Pacífico como el Volcán Tajumulco, otras áreas en San Marcos, Suchitepéquez y la Unión, Zacapa (IUCN Red List, 2020). En Honduras se ha reportado en los Departamentos de Lempira, Ocotepeque y Copán (Townsend *et al.* 2008, Solis *et al.* 2014).

En Guatemala, *P. matudai* ha sido encontrada en ríos muy contaminados y en fincas de café (IUCN Red List, 2020).

Además de la pérdida y fragmentación de hábitat, la quitridiomycosis también es considerada una amenaza para la especie ya que se han detectado altos niveles de infección por *Bd* en *P. matudai*. Otras especies del género han sido severamente afectadas por el hongo (IUCN Red List, 2020). Sin embargo, los adultos de esta especie han mostrado ser relativamente resistentes a la infección por *Bd* y podrían funcionar como transportadores del hongo a otras áreas (Cheng *et al.*, 2011). La causa de esta resistencia al hongo es desconocida.

F. *Bolitoglossa*

Las salamandras sin pulmones de la familia Plethodontidae representan aproximadamente el 40% de todas las especies de salamandras, con una gran radiación en el Neotrópico (Parra-Olea *et al.*, 2004; Larson *et al.*, 2006; Wake & Vredenburg, 2008). Declives fuertes y extinciones de varias de las 156 especies de plelodóntidos mesoamericanos han sido reportadas para México, Panamá, Guatemala, y Costa Rica. *Bolitoglossa*, además de ser el género con mayor número de especies dentro de la familia, en consecuencia, ha sido uno de los más afectados (Rovito *et al.*, 2009; Crawford *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2011; Alroy, 2015). En el 2016 se reportaron 82 especies de salamandras plelodóntidas mesoamericanas con declive poblacionales notables. Su clasificación por la IUCN incluía: 8 casi amenazadas (NT), 17 vulnerables (VU), 33 en peligro (EN), 24 en peligro crítico (CE) (Whitfield *et al.* 2016). Mesoamérica es considerada una de las regiones más afectadas por la quitridiomycosis (Scheele *et al.* 2019). La enfermedad ha afectado comunidades enteras de salamandras, especialmente en especies de elevaciones altas y rango restringido, principalmente en bosques nubosos (Berger *et al.*, 1998; Savage, 2002; Lips *et al.*, 2006; Brem & Lips, 2008; Crawford *et al.*, 2010; Forrest *et al.*, 2011).

G. Microbioma bacteriano en *Plectrohyla* y *Bolitoglossa*

Un estudio reciente (Ellison *et al.*, 2018) exploró el impacto de la filogenia y el hábitat en la diversidad bacteriana en la piel de ranas del género *Plectrohyla* y salamandras de los géneros *Pseudoerycea* en Guatemala y México. Detectaron un promedio de 322 OTUs (Unidad taxonómica operativa) en las muestras de *Plectrohyla* (n= 23), 524 OTUSs en *Bolitoglossa* (n=19) y 681 OTUs en *Pseudoerycea* (n=30).

En 11 de 23 individuos de ranas, encontraron un microbioma relativamente simple compuesto principalmente por Flavobacteriales (filo: Bacteroidetes) y Actinomycetales (filo: Actinobacteria). El microbioma núcleo del 90% de las ranas estaba constituido por 21 OTUs. Este núcleo dominaba la comunidad microbiana cutánea de las ranas con una abundancia relativa de 74.9%. Los miembros más abundantes de este núcleo microbiano fueron *Chryseobacterium* (orden: Flavobacteriales, abundancia relativa promedio: 25.6%) y *Dermacoccus* (orden: Actinomycetales, abundancia relativa promedio: 15.4%). (Ellison *et al.* 2018).

El microbioma de las salamandras también estaba dominado por el filo Proteobacteria, los cuales fueron relativamente significativamente menos abundantes en las ranas ($p = 0.02$, ANOVA). El microbioma núcleo de las salamandras estaba compuesto por 15 OTUs con una abundancia relativa promedio del 35.7% (Rango; 3.8-73.2%). Los miembros más abundantes del microbioma de las salamandras fueron *Pseudomonas* (orden: Pseudomonadales abundancia relativa promedio: 10.8%), *Methylobacterium* (orden: Rhizobiales, abundancia relativa promedio: 6.9%), y la familia Enterobacteriaceae (orden: Enterobacteriales, abundancia relativa promedio: 6.6%). 3 salamandras individuales (1 *Bolitoglossa* y dos *Pseudoerycea*) mostraron una diferencia enorme en la composición del microbioma comparado con el resto, con un microbioma dominado por Chlamydiales (Filo: Chlamydiae). *Chlamydia* representaba el 93 y 83% de las secuencias en 2 individuos, mientras que el microbioma del tercer individuo estaba dominado por *Chlamydia* (20%) y *Candidatus Rhabdochlamydia* (40%). Los autores concluyeron que la historia filogenética influencia fuertemente la diversidad y estructura de la comunidad del microbioma a en

niveles taxonómicos altos (entre ordenes), pero que en niveles taxonómicos bajo (entre géneros y especies), el efecto del hábitat era mayor (Ellison *et al.*, 2018).

V. Metodología

A. Colecta de especímenes

Los especímenes de *Plectrohyla matudai* y *Bolitoglossa spp.* fueron colectados en dos localidades del Municipio La Unión, Zacapa, Guatemala, El Bosque Municipal adyacente a la Finca Dulce Rocío y el bosque dentro de la Finca La Marsella. Los individuos se buscaron usando la técnica de muestreo de encuentro visual (VES) de 8:00pm a 11:00pm durante la época lluviosa del 2018. Todos los especímenes fueron manipulados utilizando guantes de nitrilo estériles. Los animales fueron hisopados inmediatamente después de regresar al campamento. Los individuos se lavaron con 100ml de agua estéril para eliminar la tierra y cualquier bacteria transitoria. Para la toma de muestras se utilizaron hisopos de rayón estériles (MW113, Medical Wire Equipment & Co. Ltd). Las ranas fueron hisopadas 5 veces en cada flanco, 10 veces en la región ventral, 5 veces en cada muslo y 5 veces en la región dorsal. Las salamandras de hisoparon 10 veces en los flancos y 10 veces en las región ventral y dorsal. Los hisopos se almacenaron inmediatamente en nitrógeno líquido antes de ser transportadas a la Universidad del Valle donde fueron almacenados a -80°C hasta realizar la extracción de ADN.



Figura 1. Sitio de colecta, La Unión Zacapa, Guatemala

Para la captura, todos individuos fueron colocados en bolsas de plástico con número de serie. Se tomaron datos del tipo de microhábitat, actividad del individuo, hora de captura y coordenadas de GPS. Los individuos fueron medidos y pesados. Todos los especímenes fueron luego transportados a la Universidad del Valle (UVG).

B. Manejo y cuidado de los animales

Cuarentena: Al llegar a las instalaciones de la UVG, los individuos fueron aislados en contenedores de plástico de 20.2 cm X 15.7 cm X 3.9 cm por 4 a 6 semanas. A los

contenedores se les agrego una hoja de papel mayordomo húmedo para mantener la humedad, la cual fue cambiada cada 48 horas. El interior de los contenedores fue humedecido con un atomizador cada 48h. El comportamiento de los animales fue monitoreado constantemente para detectar cualquier cambio. Los animales fueron alimentados 1 vez al día dos días a la semana con grillos comunes (*Acheta domesticus*) espolvoreado con un suplemento de calcio (Repashi Superfoods Calcium Plus). Durante la fase de cuarentena, todos los individuos fueron hisopados cada semana utilizando hisopos estériles de rayón de la manera descrita anteriormente. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta la extracción de ADN.

Posteriormente, los animales fueron colocados en terrarios completamente equipados y condicionados. 5 ranas fueron colocadas en el Terrario A, el cual contenía suelo, rocas, arena y plantas del sitio de colecta de los animales; 6 ranas fueron colocadas en el Terrario B, el cual fue preparado de acuerdo con el protocolo guía de manejo y cuidado de Amphibian Ark. Se compró tierra negra, rocas, arena y plantas comerciales. Todo fue esterilizado con cloro y autoclave antes de preparar el terrario.

Dos terrarios más, C (*P. matudai*) y D (*Bolitoglossa* spp.) fueron preparados con pequeñas piedras de arcilla para el drenaje. El suelo, plantas y rocas fueron esterilizados como se describió anteriormente. Todos los terrarios utilizaron agua de la misma fuente (agua del chorro) y filtrada con un sistema de filtro de capa múltiples (iSpring CT10).

Los individuos permanecieron en los terrarios por 4 semanas, para evitar estresarlos y que se acostumbraran a los terrarios, antes del primer hisopado. Los animales fueron alimentados dos días a la semana con grillos comunes espolvoreado con un suplemento de calcio (Repashi Superfoods Calcium Plus). La dieta de los grillos consistía en una mezcla de vegetales (ie. Manzana o zanahoria) y concentrado de gato. Los terrarios fueron humedecidos 3 veces por semana con un atomizador. El agua de los pequeños estanques dentro de los terrarios fue cambiada dos veces por semana. Como fuente de UV se utilizaron bombillas de luz azul diurna de 40W (Daylight Blue Reptile Bulb Zoo Med DB-40). Se utilizo un patrón de luz de 12 horas por día. La temperatura de mantuvo entre 18° y 21°C.

Se tomaron hisopados cutáneos cada 15 días para los animales de los terrarios A y B, y cada mes para los animales de los terrarios C y D. Todas las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta la extracción de ADN.

C. Extracción de ADN

Las extracciones de ADN se realizaron utilizando el kit: Qiagen DNeasy® PowerSoil® Kit, con las siguientes modificaciones: La incubación C1 se hizo a 65°C por 90 minutos. 50 ul de C6 fueron agregados al filtro y este se incubó por 10 minutos antes de la elusión. Las muestras se cuantificaron utilizando un Nanodop™ (Thermo Fisher). Para todos los sets de extracción se extrajo también un control negativo. Un estándar de comunidad microbiana de Zymobiotics™ (D6300) fue extraído como control positivo. Previo a la secuenciación, las muestras de ADN, los controles negativos y positivos de extracción y los controles negativos de PCR fueron asignados aleatoriamente y en triplicado a pozos en placas de 96 pozos. Las placas también contenían los blancos (Pozos totalmente vacíos).

D. Amplificación y secuenciación

Las muestras fueron exportadas a la Universidad Metropolitana de Manchester, Inglaterra en donde se llevó a cabo la amplificación de la región V4 de la subunidad rRNA del gen 16S utilizando los primers 515F: GTGYCAGCMGCCGCGGTAA (Parada *et al.*, 2016) – 806R :GGACTACNVGGGTWTCTAAT (Appril *et al.* 2015). La preparación de librerías se llevó a cabo utilizando el kit Illumina TruSeq Free PCR library prep. La secuenciación de nueva generación se llevó a cabo en un secuenciador Illumina MiSeq en el Laboratorio de Ecología y Genética de la misma universidad.

E. Análisis de datos

Los datos fueron analizados con R Studio v.4.0.2. Para el filtrado, curación y manejo de secuencias se utilizaron los paquetes *dada2* (Callahan *et al.*, 2016) y *phyloseq* (McMurdie

& Holmes, 2013). Para los análisis de composición se utilizó principalmente el paquete *vegan* (Oksanen *et al.*, 2019). En *dada2* se cortaron las secuencias en la posición 220 para la secuencia forward y 180 para la secuencia reverse. Esto se realizó para evitar utilizar las partes de baja calidad que se encuentran a los extremos de las secuencias largas. Las muestras se unieron y se construyó un cuadro de ASV (Amplicon Sequence Variants). Para realizar la asignación taxonómica del cuadro de ASV se utilizó la base de datos de referencia de SILVA – subunidad pequeña de rRNA (Quast *et al.*, 2013). Con *phyloseq* se creó un objeto PS el cual contenía la información de las secuencias y de cada individuo, así como la información de colecta.

Para comprobar la significancia en la diferencia de diversidad alfa (estimada con *phyloseq*) entre tratamientos y etapas se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (*vegan*) y la prueba *post hoc* de Dunn del paquete *dunn*. (Dinno, 2017). Para evaluar el efecto de diferentes variables en la riqueza de especies se utilizó un modelo generalizado mixto (GLMM) con distribución de Poisson y Semana de muestreo como efecto aleatorio, con el paquete *lme4* (Bates *et al.*, 2015). La selección de modelos se basó en el Criterio de Información de Akaike corregido para muestras pequeñas (AICCc) (Burnham y Anderson, 2002) utilizando el paquete *MuMIn* (Barton, 2019). Los parámetros que incluyen 0 entro de su intervalo de confianza (95%) se consideraron no-informativos (Arnold, 2010). La diversidad beta se estimó con las distancias de Bray-Curtis y Unifrac. Los efectos de las diferentes variables sobre la diversidad beta se evaluaron con análisis de varianza permutacional (PERMANOVA) con la prueba de Adonis en *vegan*.

Los gráficos de barras de composición fueron elaborados para observar la abundancia relativa de los taxa más prevalentes y abundantes. Se realizaron con el paquete *ggplot2* (Wickham, 2016) luego de aglomerar con *phyloseq* las ASVs en Géneros o Clases y filtrar para mantener solo los taxa más abundantes.

VI. Resultados

A. Composición del microbioma bacteriano cutáneo de los especímenes.

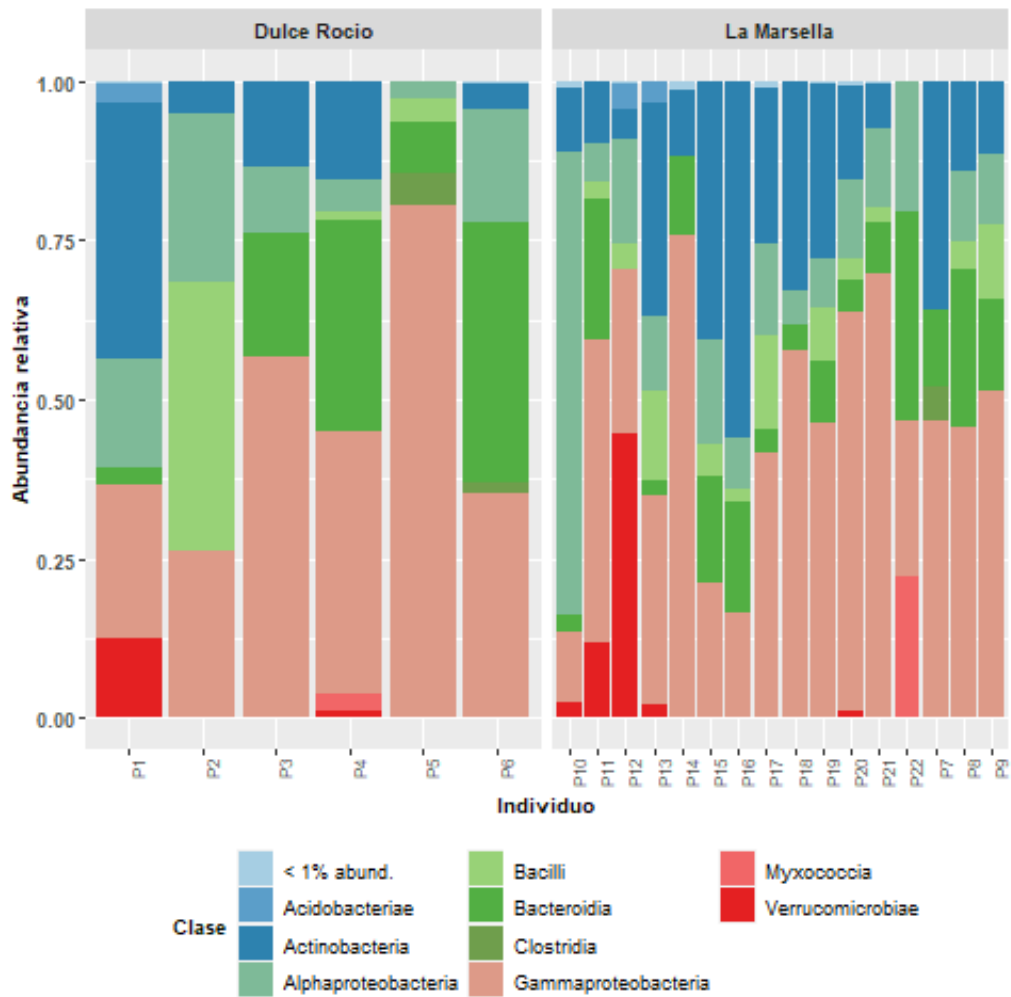


Figura 2. Abundancia relativa de las nueve clases de bacterias cutáneas más prevalentes en *P. matudai*

Un total de 47 clases fueron detectados en los hisopados cutáneos tomadas en el campo a los individuos de *P. matudai*. La Figura 1 muestra la abundancia relativa y prevalencia de las 9 clases de bacterias más abundantes. Todas las clases con una abundancia relativa menor al 1% fueron agrupadas. La clase más prevalente y abundante en ambas localidades

es Gammaproteobacteria. La segunda más prevalente y abundante es Actinobacteria, mostrando una abundancia mayor en individuos de La Marsella. Alphaproteobacteria y Bacteroidia tienen alta prevalencia, pero su abundancia relativa es menor que las dos clases dominantes. Bacili también está presente en la mayoría de los individuos con una muy baja abundancia relativa. Verrucomicrobiae está presente en aproximadamente un tercio de los individuos (incluyendo ambas localidades), con muy baja abundancia relativa, a excepción de un individuo donde es la clase dominante. En general, no se observa una diferencia clara en la composición de las comunidades entre ambas localidades exceptuando la mayor abundancia relativa de Actinobacteria en los individuos de La Marsella.

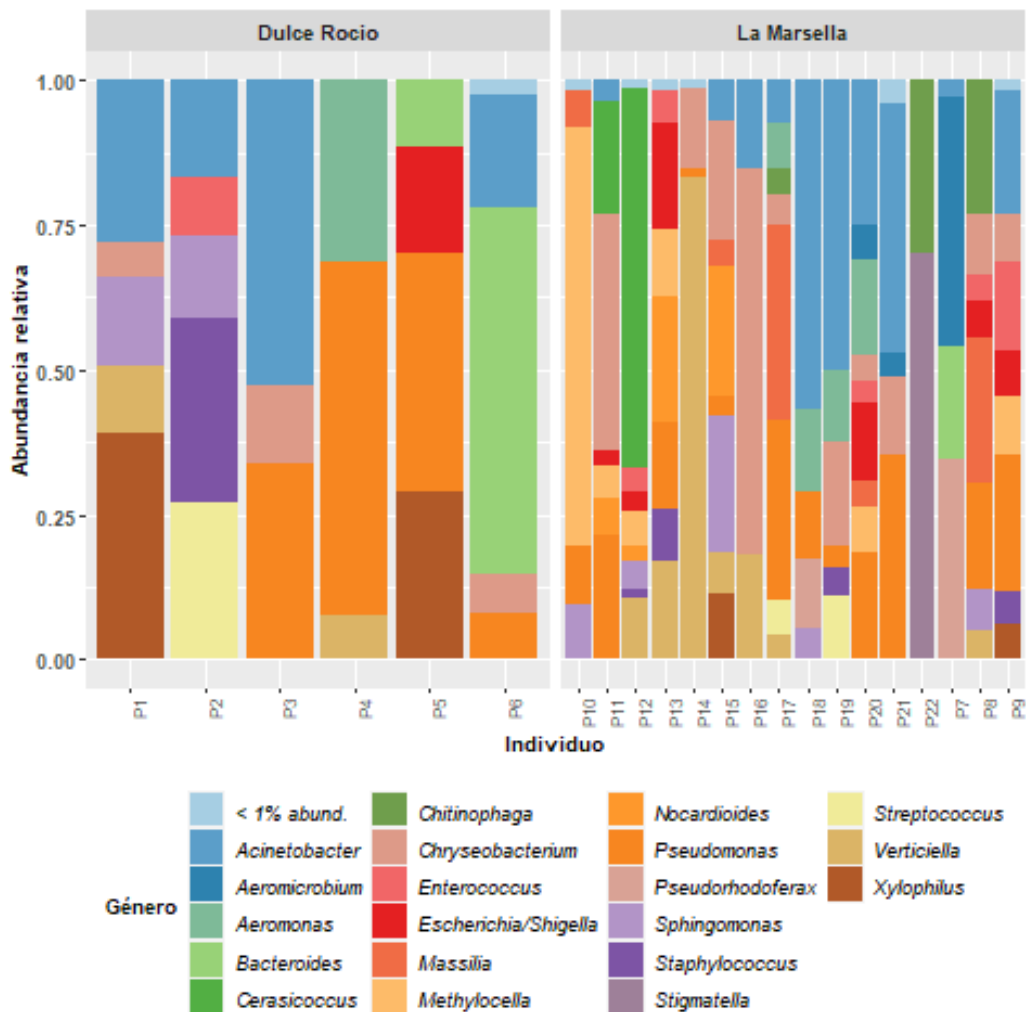


Figura 3. Abundancia relativa de los veinte géneros de bacterias cutáneas más prevalentes en *P. matudai*

Se identificaron 134 géneros en los hisopados cutáneos tomados en el campo a los individuos de *P. matudai*. La Figura 2 representa la composición de comunidades a nivel de género, mostrando solamente los veinte géneros más abundantes. La imagen es menos clara, con mucha variabilidad entre individuos. Sin embargo, algunos aspectos son notables, como la alta prevalencia de *Pseudomonas*, presente en dos tercios de los individuos. *Acinetobacter* está presente en la mitad de los individuos y en algunos casos con una abundancia relativamente alta. No se observa una diferencia clara en la composición de las comunidades entre ambas localidades.

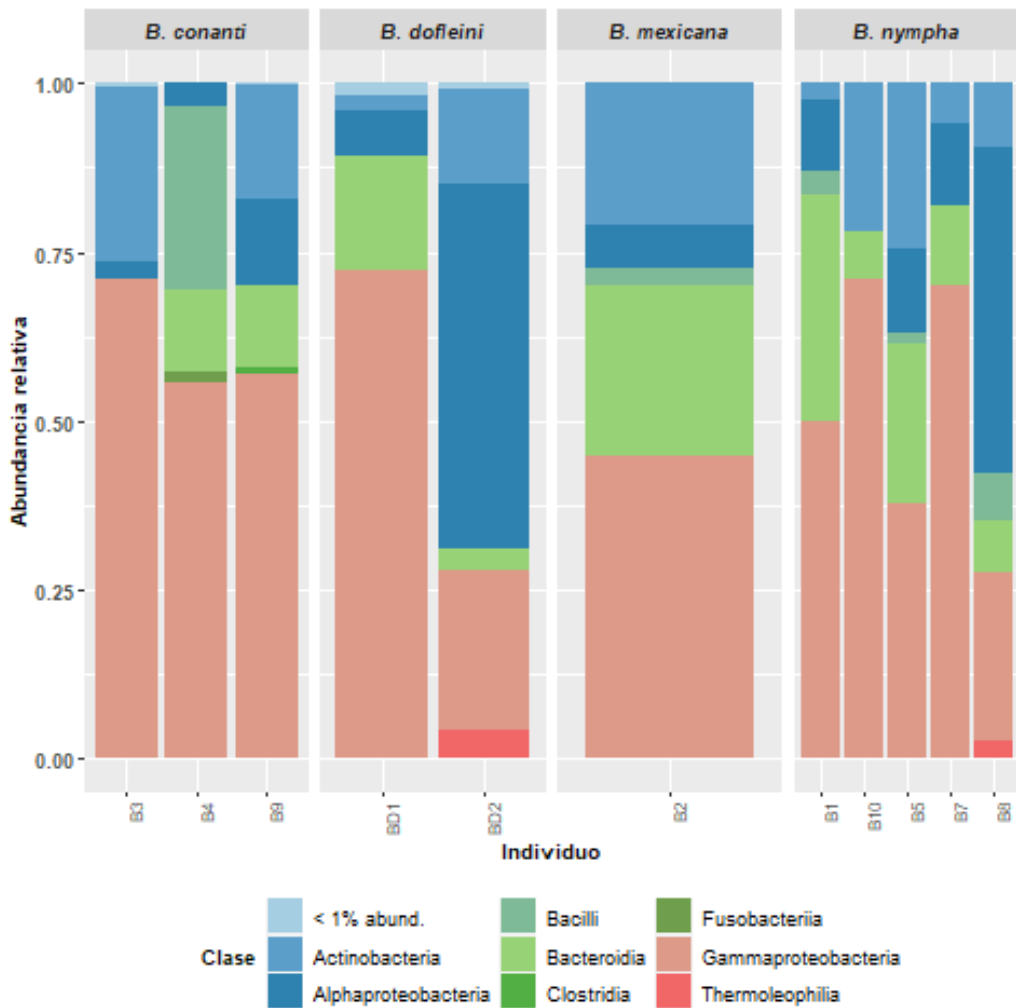


Figura 4. Abundancia relativa de las ocho clases de bacterias cutáneas más prevalentes en *Bolitoglossa* spp.

Cuarenta y siete diferentes clases de bacterias fueron identificadas, en las muestras cutáneas de los diferentes ejemplares de *Bolitoglossa*. Similar a *P. matudai*, las comunidades bacterianas cutáneas de *Bolitoglossa* muestran una alta prevalencia y abundancia relativa de Gammaproteobacteria. Actinobacteria tiene también una alta prevalencia, pero mucho menor abundancia relativa. Lo mismo se observa para Bacteroidia y Alphaproteobacteria. Interesantemente la abundancia relativa de Alphaproteobacteria es particularmente alta en los individuos donde la abundancia de Gammaproteobacteria es relativamente baja. No se observan diferencias claras en la composición de las comunidades bacterianas cutáneas entre las diferentes especies (todas de la misma localidad).

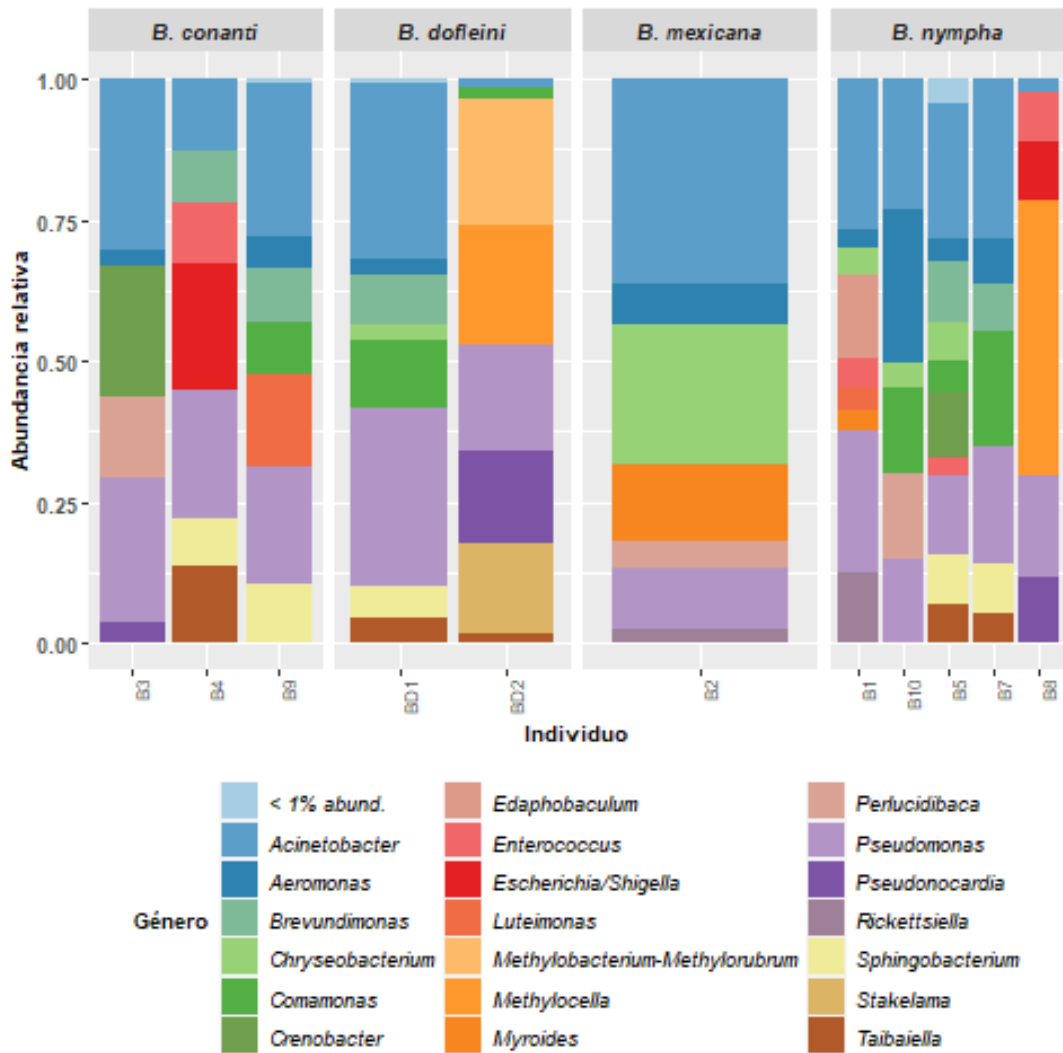


Figura 5. Abundancia relativa de los veinte géneros de bacterias cutáneas más prevalentes en *Bolitoglossa* spp.

Se identificaron 341 géneros de bacterias en los hisopados cutáneos de *Bolitoglossa*. La Figura 4 muestra los 20 géneros más abundantes. La composición es muy variable entre individuos y no se observa una diferencia clara entre las diferentes especies. Notablemente, *Pseudomonas* tiene alta prevalencia estando presente en todos los individuos. Su abundancia es relativamente alta comparada con otros géneros de bacterias. *Acinetobacter* también muestra alta prevalencia y abundancia relativa en la mayoría de los individuos. *Aeromonas* está presente en más de dos tercios de los individuos, pero con baja abundancia relativa. Estos 3 géneros han sido identificados como potenciales inhibidores de *Bd* (Woodhams *et al.*, 2015).

B. Diversidad alfa

Las Figuras 5-7 muestran la diversidad alfa en función de la etapa (campo, cuarentena y terrario) para cada terrario con *P. matudai*. Se midió la diversidad alfa de las comunidades bacterianas cutáneas utilizando tres tipos diferentes de índice: Basado en Riqueza (Chao1), basado en Abundancia (Shannon) y diversidad filogenética (PD de Faith).

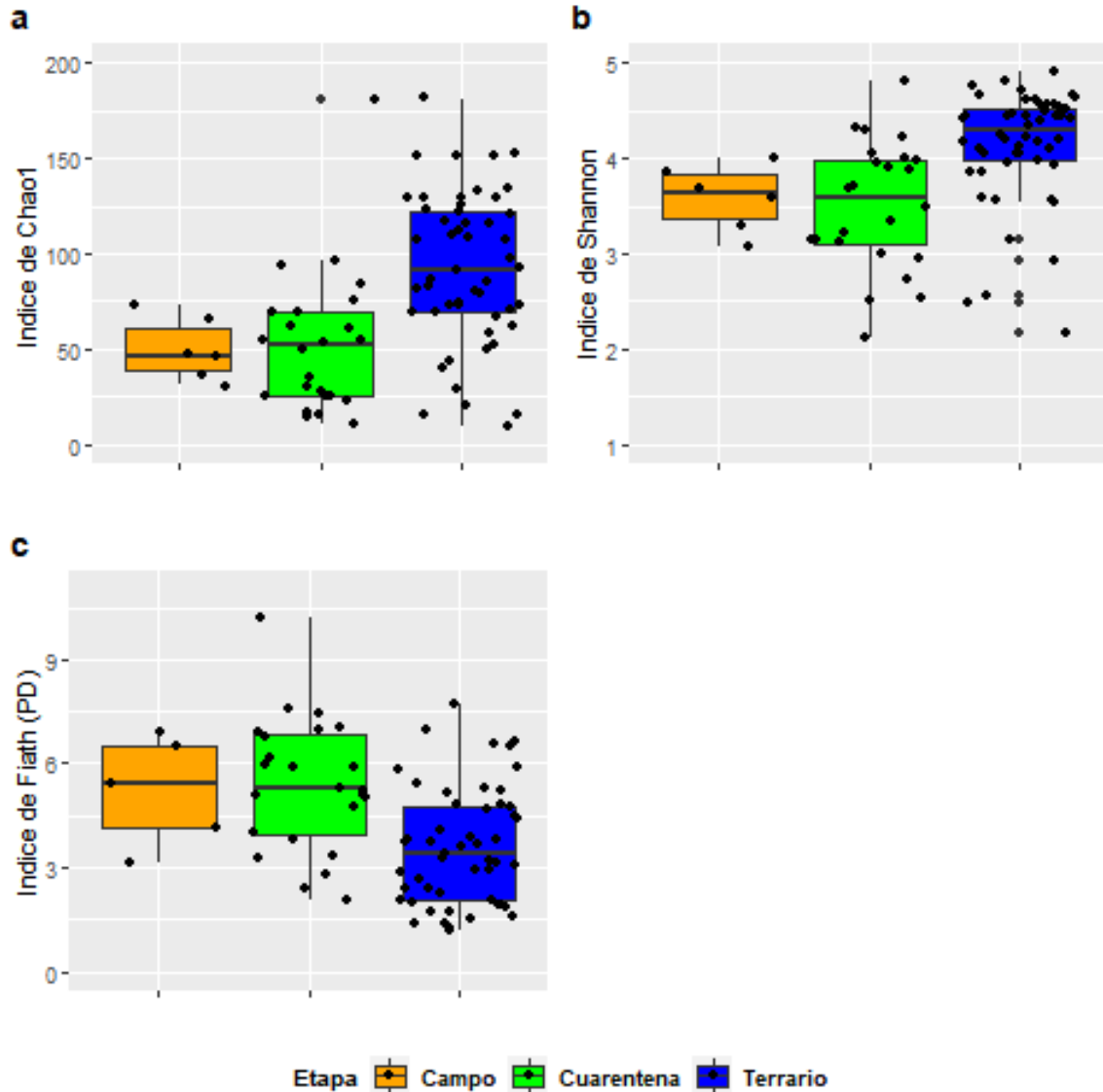


Figura 6. Diversidad alfa por etapa (Terrario A).

a) Chao1; b) Shannon; c) PD de Faith

La Figura 5 (Terrario A) muestra que la diversidad alfa, medida con los índices de Chao1 y Shannon, aumentó en la etapa de Terrario. La diferencia entre etapas fue significativa para ambos índices según la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (Shannon: $\text{Chi}^2 = 21.058$, $\text{Gl} = 2$, $p = 2.675\text{e-}05$; Chao1: $\text{Chi}^2 = 21.149$, $\text{Gl} = 2$, $p = 2.556\text{e-}05$). La prueba *post hoc* de Dunn (Holm-Šidák) muestra que la diversidad alfa es significativamente diferente entre Terrarios y Campo ($p = 0.0090$) y Terrario y Cuarentena ($p = 0.00001$) pero no entre Cuarentena y Campo ($p = 0.4126$), medida con el índice de Shannon. Lo mismo se mantiene para el índice de Chao1: la diversidad alfa es significativamente diferente entre

Terrarios y Campo ($p= 0.0125$) y Terrario y Cuarentena ($p= 0.00001$) pero no entre Cuarentena y Campo ($p=0.4702$). La diversidad filogenética, medida con el índice de Faith, disminuyó en la etapa de Terrario ($\text{Chi}^2 = 15.275$, $\text{Gl}= 2$, $p = 0.000482$). La prueba de Dunn muestra que la diferencia es significativa entre la etapa de Cuarentena y Terrario ($p= 0.0004$) pero no entre Campo y Terrario ($p= 0.0492$) o Campo y Cuarentena ($p= 0.4901$). Es importante notar la amplia distribución de los datos, sugiriendo alta variación entre los individuos.

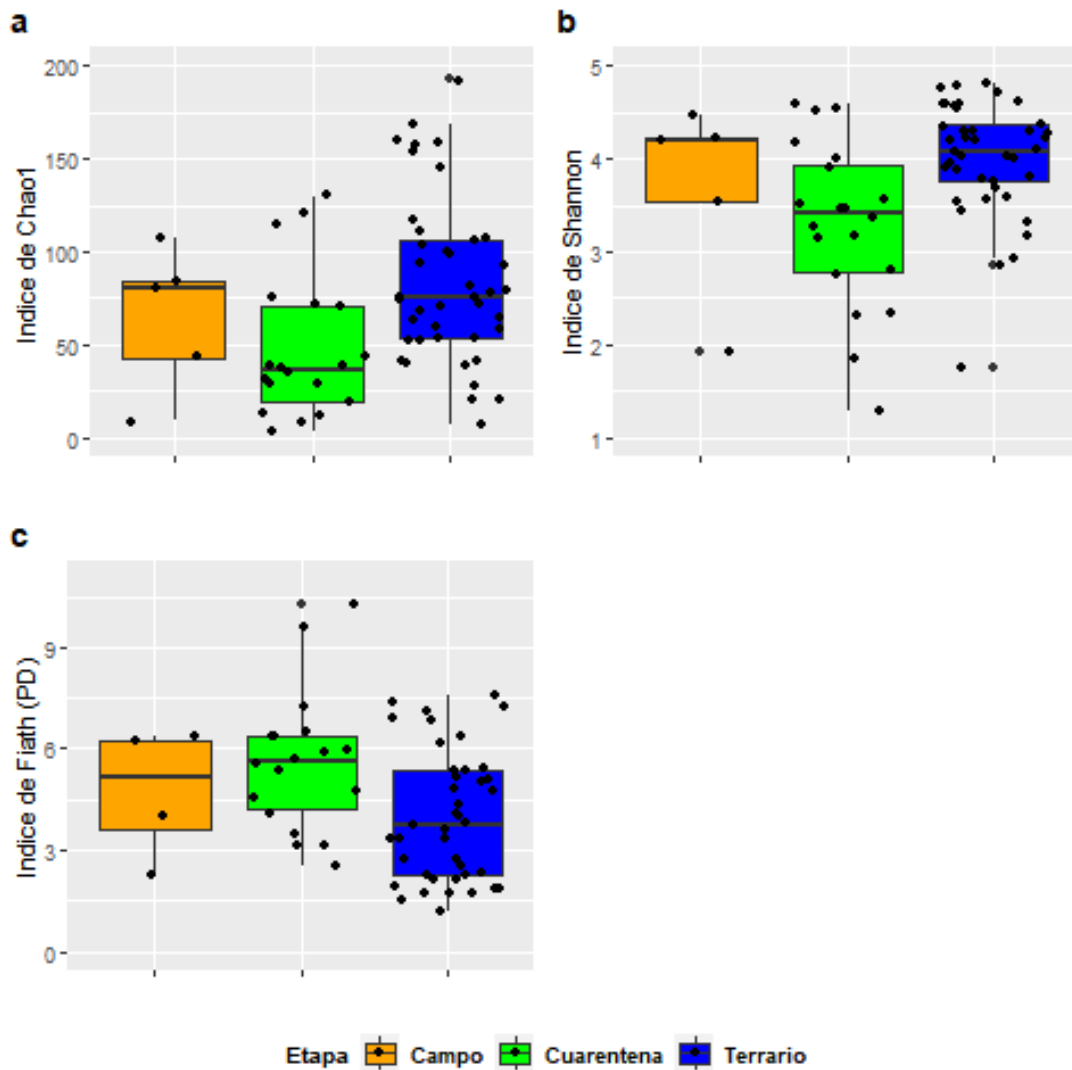


Figura 7. Diversidad alfa por etapa (Terrario B)

a) Chao1; b) Shannon; c) PD de Faith

La Figura 6 (Terrario B) muestra un leve descenso en la diversidad alfa durante la cuarentena y esta vuelve a ascender en la etapa de Terrarios. La prueba de Kruskal-Wallis muestra significancia en la diferencia de diversidad alfa medida con el índice de Shannon y Chao1, $\chi^2 = 12.108$, $G1 = 2$, $p = 0.002348$ y $\chi^2 = 12.126$, $G1 = 2$, $p = 0.002328$, respectivamente. En ambos casos, la prueba de Dunn indica que la diferencia es significativa para la diversidad alfa entre la etapa de Cuarentena y la etapa de Terrario ($p = 0.0008$ para ambos índices). Para la diversidad genética (índice de Faith) también hay significancia leve ($\chi^2 = 6.7809$, $G1 = 2$, $p = 0.03369$), también solo entre Cuarentena y Terrario ($p = 0.0152$; prueba de Dunn). Sin embargo, al igual que en el Terrario A, la diversidad filogenética parece disminuir en la etapa de Terrario. Como en el caso de los individuos Terrario A, los valores individuales de diversidad alfa muestran una distribución amplia en todas las etapas.

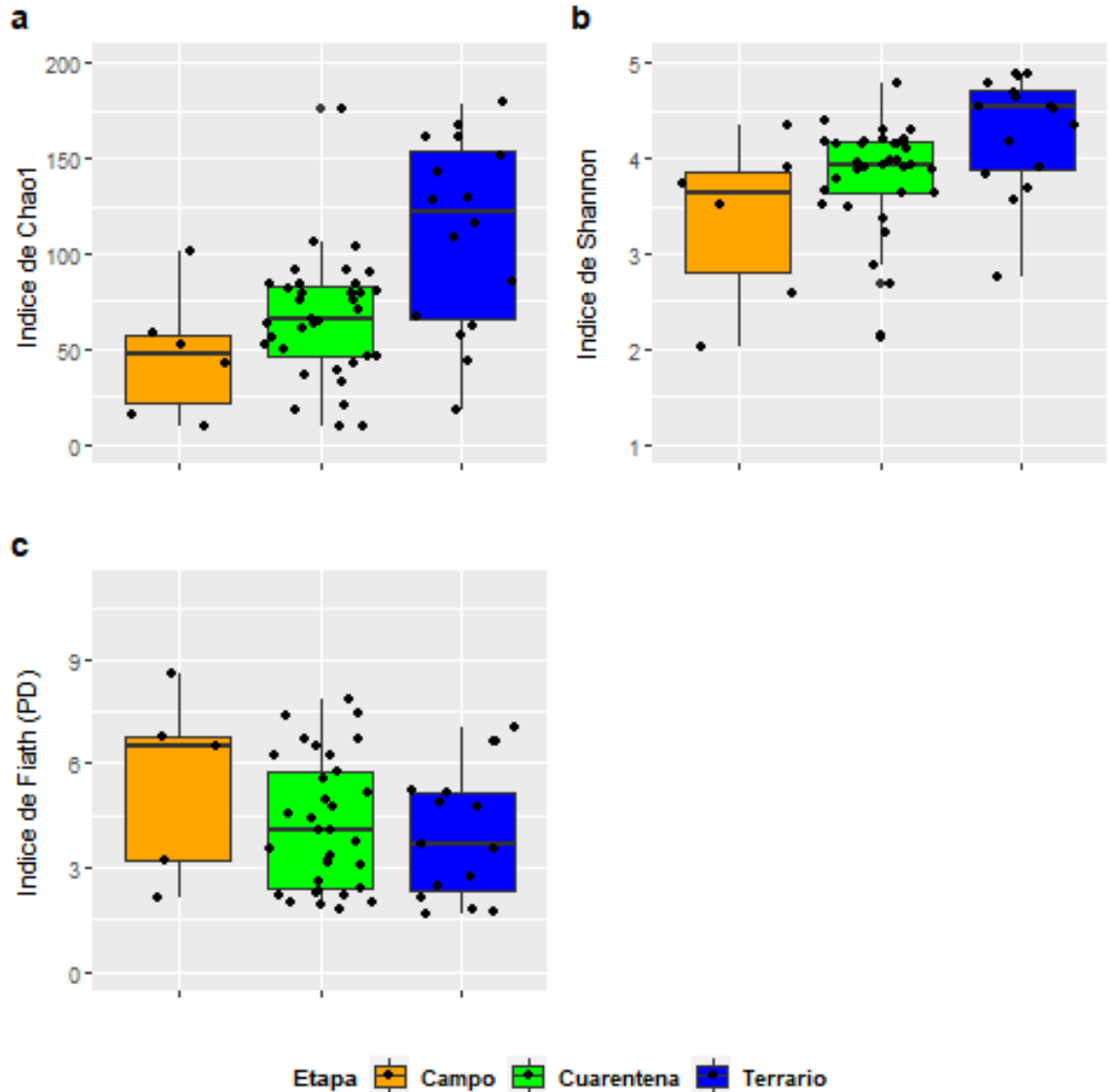


Figura 8. Diversidad alfa por etapa (Terrario C)

a) Chao1; b) Shannon; c) PD de Faith. *Los individuos del Terrario C fueron hisopados 1 vez al mes durante la etapa de terrario (en los Terrarios A y B se tomaron muestras cada 15 días)

La Figura 7 (Terrario C) muestra que la diversidad alfa medida con los índices de Shannon y Chao 1 aumentó en la etapa de Cuarentena y volvió a aumentar en la etapa de Terrario. La diferencia es significativa para ambos índices (Shannon: $\text{Chi}^2 = 10.918$, $\text{Gl} = 2$, $p = 0.004257$; Chao1: $\text{Chi}^2 = 11.919$, $\text{Gl} = 2$, $p = 0.002582$). Para ambos índices, la diferencia de diversidad alfa fue significativa entre Campo/Terrario (Shannon: $p = 0.0065$;

Chao1: $p = 0.0043$) y Cuarentena/Terrario (Shannon: $p = 0.0061$; Chao1: $p = 0.0043$). Para la diversidad filogenética medida con el índice de Faith no se encontró diferencia significativa entre las diferentes etapas ($\text{Chi}^2 = 1.5545$, $\text{Gl} = 2$, $p = 0.4597$).

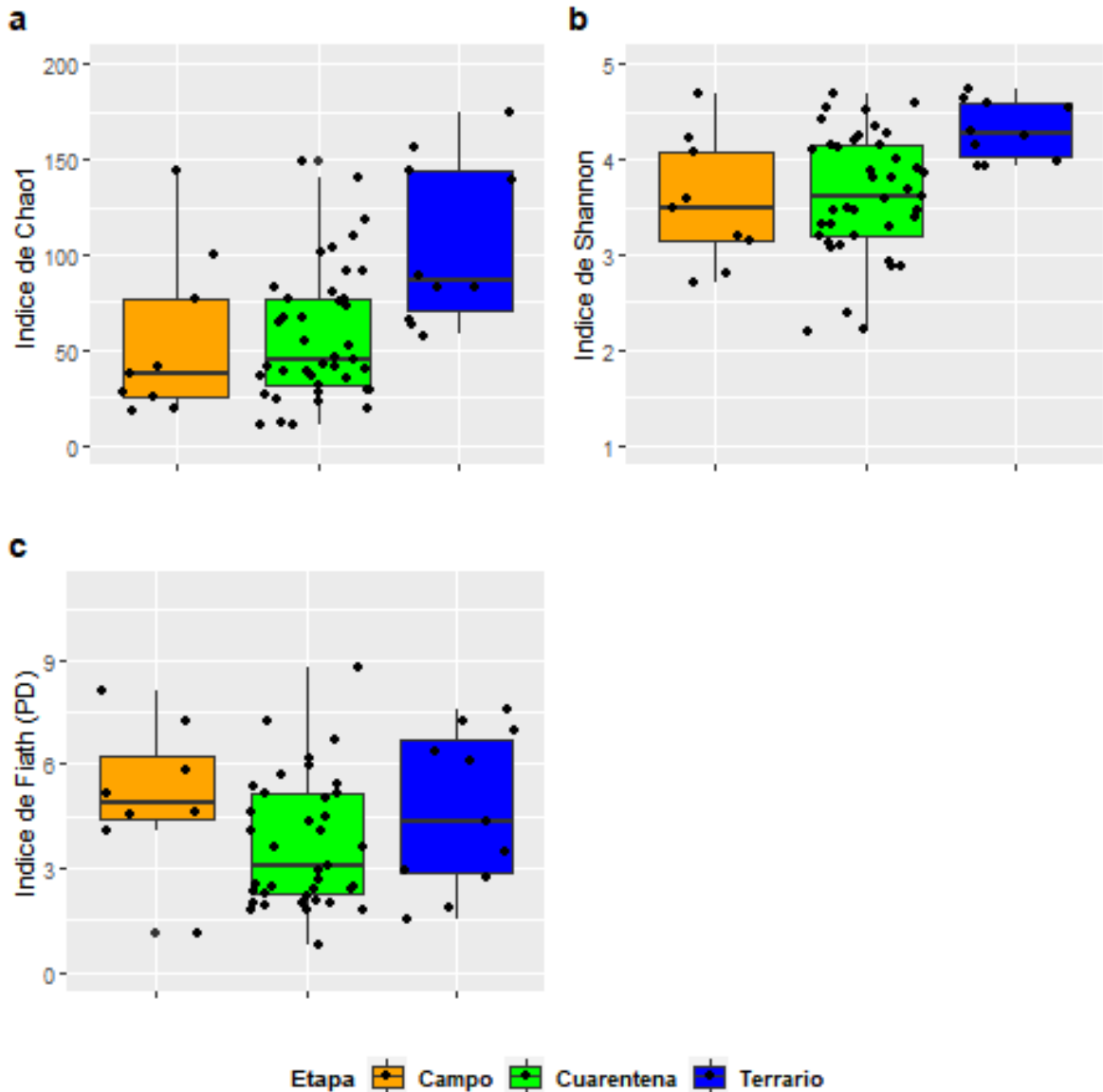


Figura 9. Diversidad alfa por etapa (Terrario D)

a) Chao1; b) Shannon; c) PD de Faith. *Los individuos del Terrario D (*Bolitoglossa* spp.) estuvieron en cuarentena 1 semana más. Además, durante la etapa de Terrario, los hisopados se tomaron 1 vez al mes (en los Terrarios A y B se tomaron muestras cada 15 días)

La Figura 8 muestra que la diversidad alfa de Simpson y Chao1 aumentó en la etapa de Terrario. La diferencia de diversidad alfa es significativa para ambos índices (Shannon:

$\text{Chi}^2 = 12.89$, $\text{Gl} = 2$, $p = 0.001589$; Chao1: $\text{Chi}^2 = 11.894$, $\text{Gl} = 2$, $p = 0.002613$). La prueba *post-hoc* indica que existe diferencia significativa de diversidad alfa entre las etapas de Campo y Terrario (Shannon: 0.0034; Chao1: 0.0035), y Cuarentena y Terrario (Shannon: 0.0010; Chao1: 0.0020). No se encontró diferencia significativa entre la diversidad filogenética (Índice de Faith) de las diferentes etapas las diferentes etapas ($\text{Chi}^2 = 3.4328$, $\text{Gl} = 2$, $p = 0.1797$). Como en el caso de los individuos en todos los otros Terrarios, los valores individuales de diversidad alfa muestran una distribución amplia en todas las etapas. Durante la fase de Terrario para el Terrario D, algunos individuos no fueron hallados durante la semana de muestro, y por lo tanto no fueron muestreados. Esta decisión se tomó para evitar mover mucho el terrario y poder causar cambios en el microbioma de los individuos.

La diversidad alfa medida con los índices de Chao1 y Shannon aumentó durante la etapa de Terrario en los cuatro terrarios. Es importante notar que tanto los plots como las correspondientes pruebas estadísticas, solo reflejan la tendencia del Terrario como un todo. Además, las diferentes etapas están compuestas por diferente número de muestras (de acuerdo con el número de semanas que los individuos permanecieron en cada etapa).

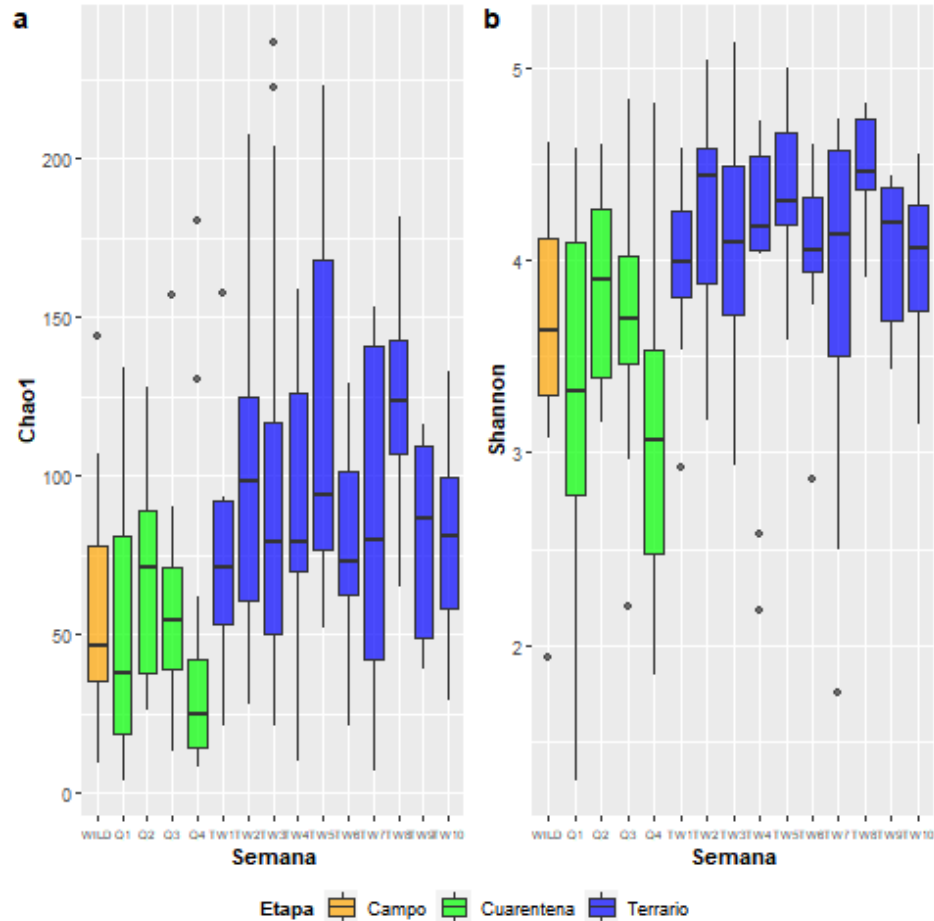


Figura 10. Diversidad alfa del microbioma en *P. matudai* por semana

a) Chao1; b) Shannon

La Figura 9 muestra los cambios en la diversidad alfa de todos los individuos de *P. matudai* a lo largo del tiempo. Se observó un aumento en la diversidad alfa durante la etapa de terrario. Las pruebas de Kruskal Wallis mostraron significancia para ambos índices (Chao1: $\text{Chi}^2 = 28.3743$; $\text{Gl} = 2$; $p = 6.896e-07$; Shannon: $\text{Chi}^2 = 28.62$; $\text{Gl} = 2$; $p = 6.098e-07$). Con la prueba de Dunn se mostró que esta diferencia es significativa entre Campo y Terrario (Chao1: $p = 0.0080$; Shannon: $p = 0.0072$) y entre Cuarentena y Terrario (Chao1: $p = 0.0001$; Shannon: $p = 0.0001$), pero no entre Cuarentena y Campo (Chao1: $p = 0.3348$; Shannon: $p = 0.3433$). Sin embargo, en la Figura 10 se observa una caída considerable en la diversidad alfa en la cuarta semana de cuarentena.

Cuadro 1. Selección de modelo basado en AIC

Modelo	Efecto fijo		Efecto aleatorio	AIC
	Etapa	Tipo de terrario	Semana de muestreo	
1	x	x	x	4521.41
2	x		x	4526.03
3		x	x	4538.04
4			x	4542.71

La selección de modelo se basó en el Criterio de Información de Akaike. Se eligió el modelo más parsimonioso con el valor AICc más bajo y $\Delta AICc < 2$. El modelo seleccionado incluye las variables Etapa y Terrario como efecto fijo y la variable Semana de muestreo como efecto aleatorio.

Cuadro 2. Magnitud del efecto (β), error estándar (SE), intervalos de confianza inferior (LCI) y superior (UCI) de las variables explicativas para el análisis de riqueza de especies en las comunidades microbianas

Variable	Magnitud del efecto (β)	SE	LCI	UCI
Riqueza de especies				
Intercepto	4.05	0.16	3.73	4.38
Etapa (Cuarentena)	-0.13	0.18	-0.49	0.23
Etapa (Terrario)	0.5	0.17	0.16	0.84
Tipo de terrario (B)	-0.05	0.02	-0.08	-0.01

La etapa tuvo un efecto claro sobre la riqueza de especies. Este efecto es claro solo para la Etapa de Terrario (Figuras 6 y 7), cuando los animales fueron trasladados del ambiente simple de cuarentena a un terrario completamente equipado. El tipo de terrario (“estéril” o “natural”) también mostró un efecto claro sobre la riqueza de especies. La riqueza de especies aumentó en la Etapa terrario y disminuyó en el Terrario B.

C. Diversidad beta

Cuadro 3. Resultados de análisis de adonis (PERMANOVA)

Distancia	Variable	Gl	Valor <i>F</i>	R²	% efecto variable	Valor <i>p</i>
Bray-Curtis	Etapa	2	2.43224	0.01751	1.8	0.001
Bray-Curtis	Género	1	0.97828	0.00352	0.4	0.537
Bray-Curtis	Tipo de terrario	2	1.42329	0.01024	1.0	0.001
Bray-Curtis	Semana	14	1.29927	0.06546	6.5	0.001
Unifrac	Etapa	2	4.2892	0.03053	3.1	0.001
Unifrac	Género	1	0.9142	0.00325	0.3	0.534
Unifrac	Tipo de Terrario	2	1.2252	0.00872	0.9	0.14
Unifrac	Semana	14	1.2892	0.06423	6.4	0.005

Para la distancia de Bray-Curtis hay efectos significativos de la etapa, semana de muestreo y terrario en la composición total del microbioma. No hay efecto significativo del género del animal (Cuadro 1). Los efectos son relativamente pequeños (Etapa: 1.8%; Semana: 6.4%; Terrario: 1.0%).

Para la distancia de Unifrac (filogenética) hay efectos significativos de la etapa y semana de muestreo en la composición total del microbioma. No hay efecto significativo del género del animal o el terrario donde se encuentra (Cuadro 1). Los efectos son relativamente pequeños (Etapa: 3.1%; Semana: 6.4%).

D. Cambios en la composición de comunidades

Las Figuras 11 y 12 muestran los cambios en la composición de la comunidad bacteriana cutánea en *Plectrohyla* en los terrarios A y B, a nivel de Clase y Género, respectivamente. Para ninguno de los dos rangos taxonómicos se observa una diferencia clara en la composición entre ambos tratamientos (Terrario A o B). A nivel de Clase, la composición se mantuvo relativamente estable con una constante dominancia de Gammaproteobacteria, Bacteroidia, Actinobacteria y Alphaproteobacteria. El único cambio evidente es un ligero incremento en la abundancia relativa de Bacteroidia en ambos terrarios en la etapa de terrario. A nivel de Género, la composición muestra ser más dinámica. Siendo los géneros más abundantes *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Chryseobacterium*.

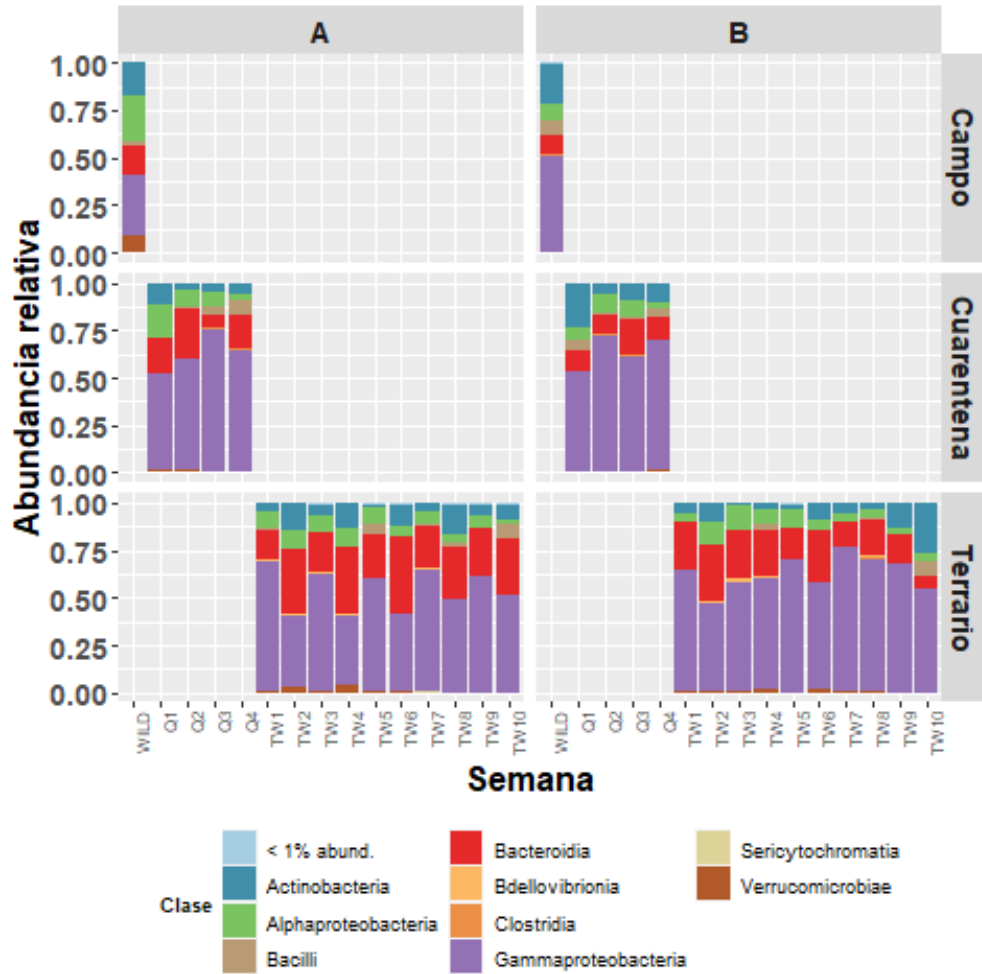


Figura 11. Composición de clases del microbioma de *P. matudai* por etapa (Terrarios A y B)

. *Cada barra representa el grupo de animales del terrario A o B, no un individuo.

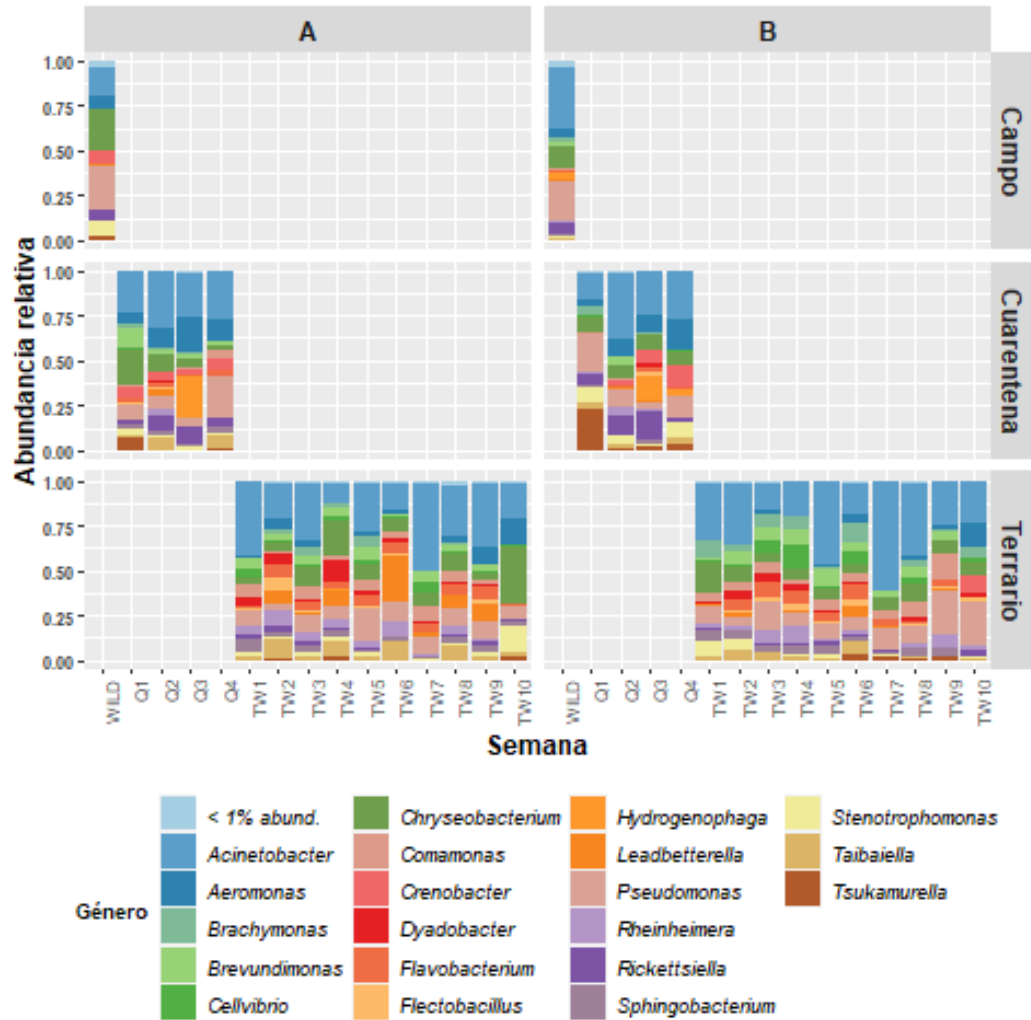


Figura 12. Composición de géneros del microbioma *P. matudai* por etapa (Terrarios A y B)

*Cada barra representa el grupo de animales del terrario A o B, no un individuo.

Las Figuras 13 y 14 muestran los cambios en la composición de la comunidad bacteriana cutánea en *Plectrohyla* en el terrario C, a nivel de Clase y Género, respectivamente. Similar a los terrarios A y B, se observa una constante dominancia de las clases Gammaproteobacteria, Bacteroidia, Actinobacteria y Alphaproteobacteria. Además, como en los terrarios A y B, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium* y *Pseudomonas* son los géneros más abundantes y constantemente presentes.

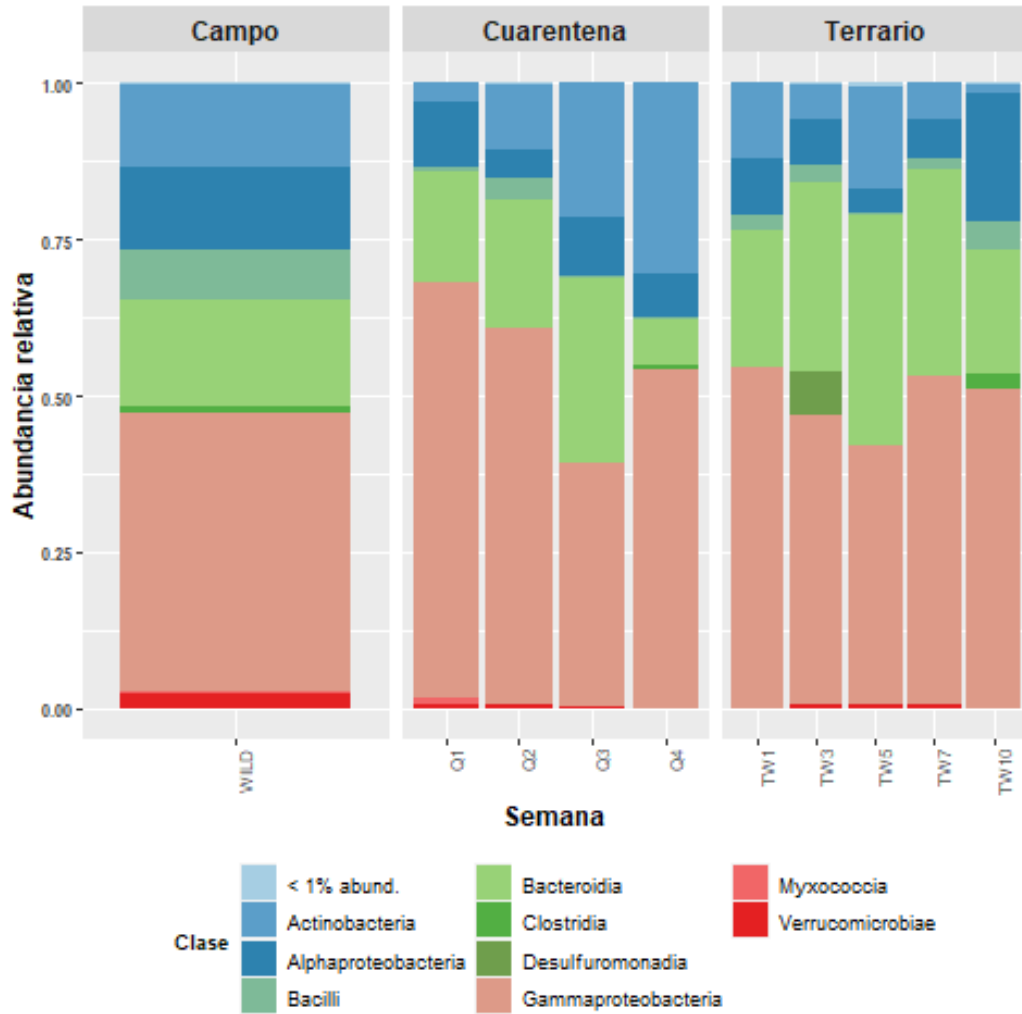


Figura 13. Composición de clases del microbioma de *P. matudai* por etapa (Terrario C)

. *Cada barra representa el grupo de animales del terrario C, no un individuo.

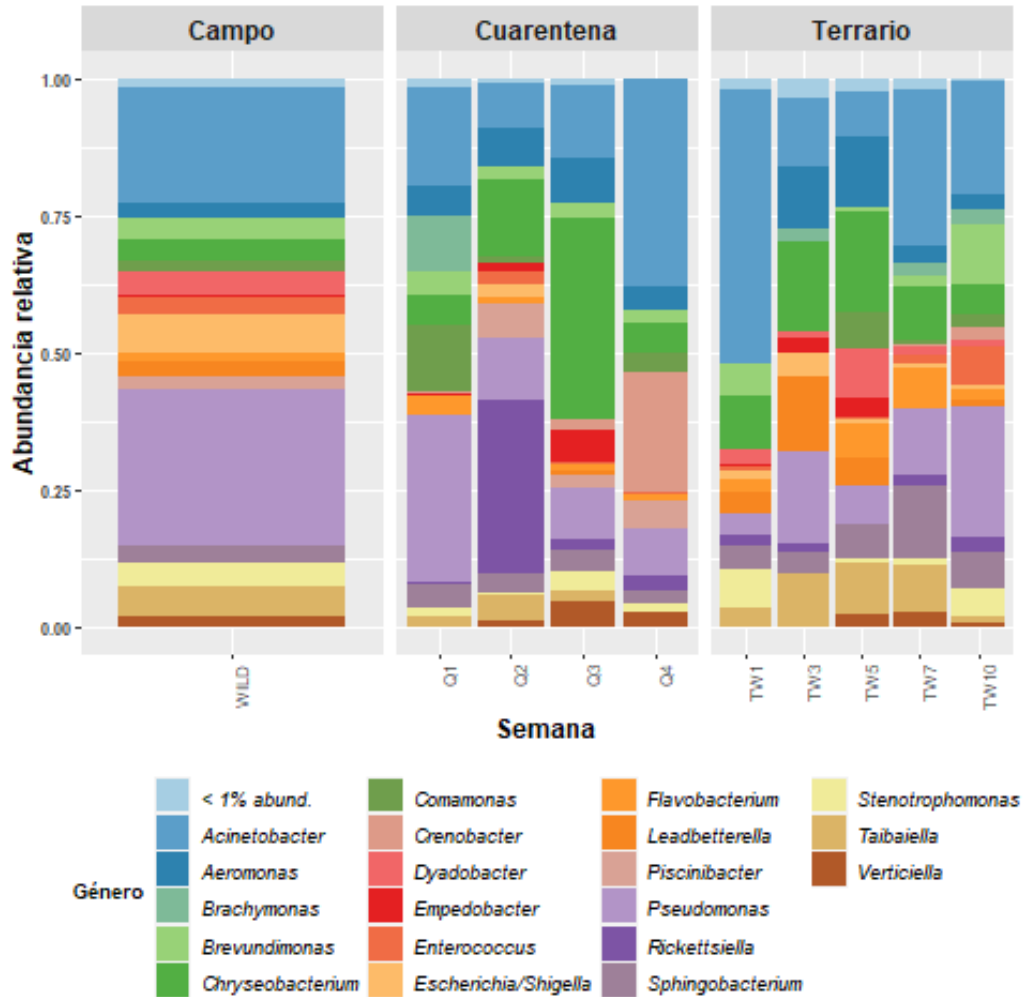


Figura 14. Composición de géneros del microbioma *P. matudai* por etapa (Terrario C)

*Cada barra representa el grupo de animales del terrario C, no un individuo.

Las Figuras 15 y 16 muestran los cambios en la composición de la comunidad bacteriana cutánea en *Bolitoglossa* en el terrario D, a nivel de Clase y Género, respectivamente. Al igual que en los terrarios con *Plectrohyla*, nivel de clase se observa una constante dominancia de las clases Gammaproteobacteria, Bacteroidia, Actinobacteria y Alphaproteobacteria. Además, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* son los dos géneros más abundantes y constantemente presentes en el terrario D.

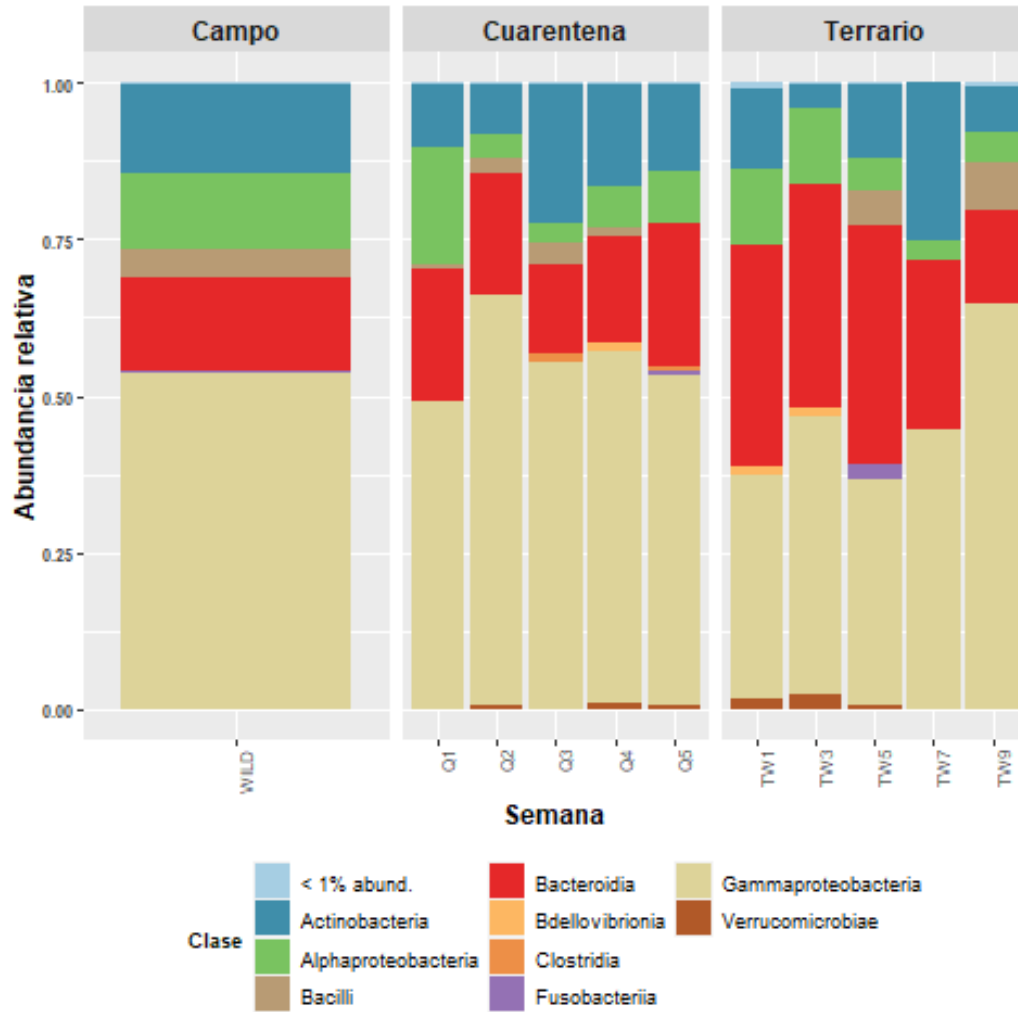


Figura 15. Composición de clases del microbioma de *Bolitoglossa* spp. por etapa (Terrario D)

*Cada barra representa el grupo de animales del terrario D, no un individuo.

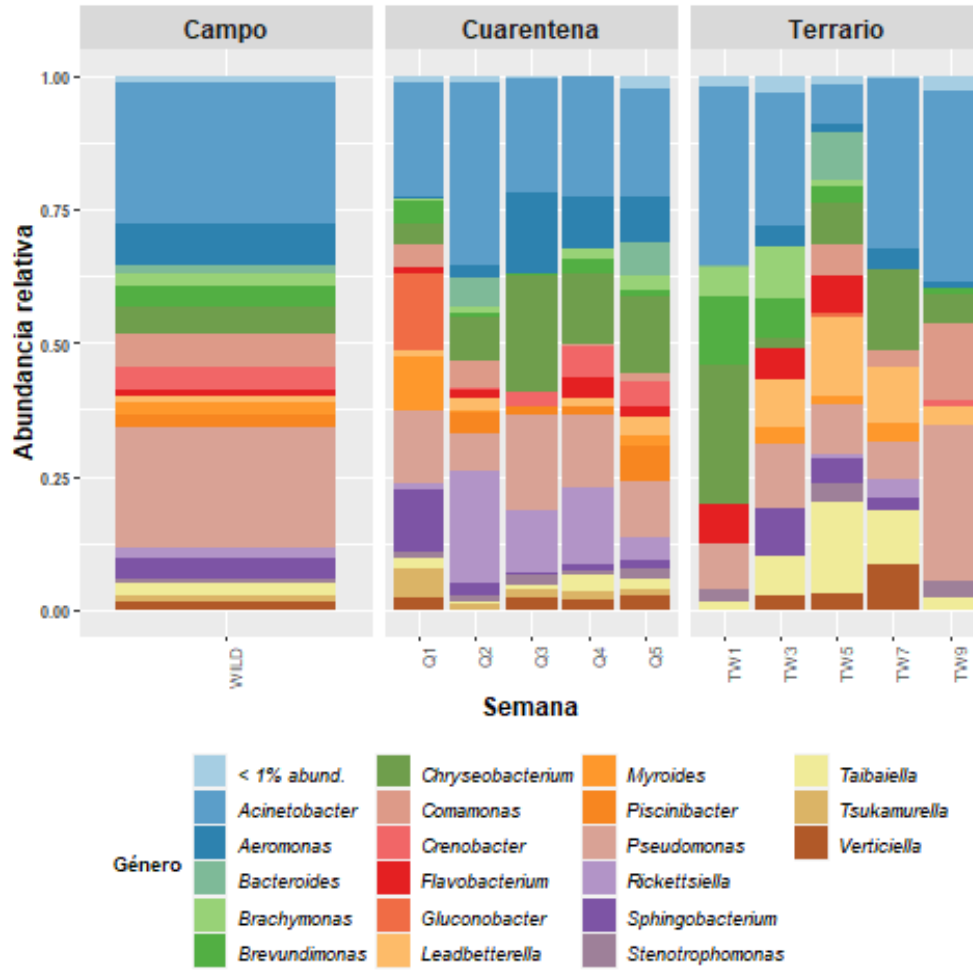


Figura 16. Composición de géneros del microbioma de *Bolitoglossa* spp. por etapa (Terrario D;)

*Cada barra representa el grupo de animales del terrario D, no un individuo.

VII. Discusión de resultados

A. Análisis del microbioma

En el nivel de rango taxonómico alto (Filo), las observaciones son consistentes con estudios previos que han mostrado que el microbioma cutáneo de la gran mayoría de especies anfibios se encuentra dominado por los filos Bacteroidetes, Gammaproteobacteria y Alphaproteobacteria (Proteobacteria), Firmicutes, y Actinobacteria (XXX, Kueneman *et al.*, 2013; Walke *et al.*, 2015).

En niveles taxonómicos bajos (Género) se observa que la variabilidad en la composición bacteriana cutánea entre individuos es alta. Algunos de los géneros de bacterias más prevalentes en las muestras de este estudio, han demostrado tener la capacidad de inhibir hongos quitridios, por ejemplo: *Aeromonas*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* (Woodhams *et al.*, 2015). Es posible que la salud de un anfibio depende solamente de la presencia o abundancia de ciertos taxa y no de la estructura del microbioma completo. Por lo tanto, conforme más estudios generan más información, puede ser útil monitorear más de cerca la dinámica de ciertos taxa individuales que podrían proveer resistencia contra patógenos al animal.

En los gráficos de barras de las muestras de campo no se observó una diferencia clara entre la composición de clases de bacterias de *P. matudai* entre ambas localidades (La Marsella y Dulce Rocío). De manera similar, tampoco hay una diferencia clara en la composición de clases de bacterias entre individuos de *B. dofleini*, *B. mexicana*, *B. nymphe* y *B. conanti*. Al comparar los géneros (*Plectrohyla* y *Bolitoglossa*) tampoco se observó una diferencia clara en la composición de clases de las comunidades bacterianas. Sin embargo, algunas cosas son notables para las comunidades en *P. matudai*, como la alta prevalencia de *Pseudomonas*, presente en dos tercios de los individuos. *Acinetobacter* está presente en la mitad de los individuos y en algunos casos con una abundancia relativa alta. De manera similar, la composición de géneros de bacterias cutáneas de *Bolitoglossa* es muy variable entre individuos y no se observa una diferencia clara entre las diferentes especies de

anfibios. Notablemente, *Pseudomonas* está presente en todos los individuos y su abundancia es relativamente alta comparada con otros géneros de bacterias. *Acinetobacter* también muestra alta prevalencia y abundancia relativa en la mayoría de los individuos. *Aeromonas* está presente en más de dos tercios de los individuos, pero con baja abundancia relativa.

Tanto en *Bolitoglossa* como *Plectrohyla*, los géneros de bacterias más abundantes y prevalentes tienen la capacidad de inhibir *Bd*. Tomando en cuenta que nuestro sitio de estudio (eg. bosque nuboso de La Unión, Zacapa) ha mostrado tener alta prevalencia de *Bd* (Ruano *et al.*, 2011), sería interesante evaluar si existe alguna relación entre la composición de comunidades bacterianas cutáneas o presencia/abundancia de ciertos taxa bacterianos cutáneos y resistencia fúngica en las poblaciones remanentes de anfibios.

El presente análisis muestra que en general, la diversidad alfa de las comunidades bacterianas aumentó al introducir a los animales en los terrarios. Esto se observó en todos los terrarios. Los terrarios son ambientes complejos con muchas posibles fuentes de bacterias. Este aumento en la diversidad alfa se observó tanto en el terrario hecho con materiales (eg. plantas, tierra, piedras, etc.) del sitio de estudio, como en el terrario hecho con materiales comerciales estériles.

Interesantemente, no se observó una disminución significativa en los niveles de diversidad alfa durante la etapa de cuarentena. La cuarentena puede ser considerada la etapa más estresante para el animal. Cada individuo se encontraba en una caja de plástico con papel húmedo el cual era cambiado cada 2 días. Además del estrés, el ambiente de cuarentena es muy simple y homogéneo, por lo cual se esperaba una reducción de diversidad alfa, pero este no fue el caso. Sin embargo, en la cuarta semana de la cuarentena (Figura 10) se observa una caída en la diversidad alfa. La diversidad filogenética disminuyó levemente en la etapa de terrario en los terrarios A y B, y no mostró diferencia significativa entre etapas en los terrarios C y D. Esto puede ser un artefacto de muestreo ya que los animales en C y D fueron hisopados una vez al mes, es decir menos frecuentemente (significando menos muestras) que los individuos de A y B (hisopados cada 15 días). Este

bajón leve en diversidad filogenética también podría ser debido a la colonización de la piel de los anfibios por taxa relacionados o la diversificación de taxa ya presentes en la piel.

Durante la cuarentena algunos individuos de *P. matudai* y *Bolitoglossa* que habían resultado negativos para *Bd* (durante un estudio separado), comenzaron a mostrar síntomas de la enfermedad y murieron en un corto plazo. Se conoce que los ambientes simples pueden causar la pérdida de diversidad bacteriana (Loudon *et al.*, 2014), lo cual puede facilitar la colonización del hospedero por *Bd* (Jani & Briggs, 2014). Además, se sabe que la ausencia de plantas y el estrés pueden afectar la composición de las comunidades bacterianas (Michaels *et al.*, 2014; Antwis *et al.*, 2014)

Es importante notar el alto nivel de dispersión en los datos de niveles de diversidad alfa en las diferentes etapas, evidente en las Figura 5-8. Esta dispersión posiblemente refleja la alta variabilidad entre individuos observada en los gráficos de composición (Figura. 2 y 4). Una limitación de este estudio es que los individuos no fueron marcados antes de ingresar al terrario. Esto hace imposible asignar una muestra a un determinado individuo luego de la cuarentena, así como monitorear una comunidad bacteriana individual durante la etapa en los terrarios. Sin embargo, es importante mencionar que un estudio previo encontró que el marcaje de anfibios con polímeros acrílicos, pueden alterar la composición y diversidad de las comunidades bacterianas (Antwis *et al.*, 2014)

Los modelos lineares mixtos realizados con los datos de los terrarios A y B, sugieren que la etapa (Campo, Cuarentena o Terrario) influye en la riqueza de especies de las comunidades. Específicamente, la riqueza de especies aumentó en los terrarios. Esto puede ser explicado por el hecho que los terrarios son ambientes complejos y potenciales reservorios de diversos grupos bacterianos. El tipo de terrario también tuvo un efecto claro. El modelo muestra que la riqueza de especies disminuye en el terrario B en comparación al terrario A. Esto no sorprende ya que mientras que el terrario A estaba equipado con materiales (*eg.* tierra, rocas, plantas y refugios) naturales del sitio de colecta, el terrario B fue elaborado con materiales comerciales esterilizados antes de equiparlo. Por lo tanto, es probable que los materiales naturales albergaban una mayor diversidad de bacterias que los materiales comerciales esterilizados, actuando como reservorios de bacterias.

El análisis PERMANOVA para diversidad beta indica que el tamaño del efecto de las 3 variables que explican significativamente la disimilitud (Bray Curtis) son relativamente pequeños (Etapa: 1.8%; Semana: 6.4%; Terrario: 1.0%). De manera similar, para la distancia Unifrac, solo dos variables tuvieron efectos significativos, ambas con efectos débiles (Etapa: 3.1%; Semana: 6.4%). De acuerdo con estos resultados, la diversidad beta entre las comunidades de bacterias parece no estar fuertemente influenciada por la etapa de cautiverio o el tipo de terrario. Sin embargo, se sospecha que la mayor parte de la disimilitud entre comunidades puede ser atribuida a diferencias individuales. Nuestro análisis sugiere que no hay diferencia entre las comunidades bacterianas cutáneas de *Bolitglossa* spp. y las de *Plectrohyla matudai*. Esto podría ser explicado por el hecho que vienen de la misma localidad y/o la alta variabilidad entre individuos.

Esta variabilidad entre individuos sugiere que el microbioma depende del hospedero más que de su ambiente. Esta variabilidad también podría significar tolerancia de los individuos a cambios en la composición del microbioma cutáneo y/o que la salud del individuo depende de solamente algunos taxa bacterianos específicos. La influencia del hospedero en las comunidades bacterianas ha sido documentada en otras especies tropicales (Bletz *et al.*, 2017) y templadas en diferentes etapas del ciclo de vida (Mckenzie *et al.*, 2012; Kueneman *et al.*, 2014). No obstante, también se observó un aumento de diversidad en los terrarios y en la presencia de reservorios naturales, sugiriendo que, en este caso, la estructura del microbioma también depende de su entorno.

Como los individuos no fueron marcados, los cambios de composición a lo largo del muestreo se monitorearon a nivel de terrario (es decir, todos los individuos dentro de ese terrario). La composición de clases de bacterias muestra una dominancia constante y estable de Gammaproteobacteria, Bacteroidia, Actinobacteria y Alphaproteobacteria a lo largo del estudio. Esto aplica para los 4 terrarios. La composición de géneros mostró ser más dinámica. Es notable la constante presencia y relativamente alta abundancia de *Acinetobacter*, *Chryseobacterium* y *Pseudomonas* en los terrarios con *P. matudai*. Estos 3 fueron los géneros más abundantes y presentes todas las semanas de muestreo (Figura 10 y 12). Algo similar se observó en el Terrario D con *Bolitglossa* pero solo con los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas* (Figura 14).

B. Cuidado y manejo de *P. matudai*

P. matudai se encuentra clasificada bajo “Preocupación menor” en la lista roja de la IUCN (IUCN, 2020). Sin embargo, varias especies del género *Plectrohyla* se encuentran catalogadas debajo de alguna de las categorías de amenaza (eg. “Vulnerable”, “En peligro” y “Peligro crítico”). Utilizar especies no amenazadas (eg. *P. matudai*) como modelos puede ser una estrategia viable para obtener información útil sin rebajar aún más, poblaciones ya reducidas de especies amenazadas. No obstante, es importante tener en cuenta que pueden ocurrir diferencias substanciales en los hábitos de vida entre las diferentes especies de un mismo género.

Las ranas han sido mantenidas en cautiverio desde el inicio del estudio hasta la fecha (septiembre 2020). Después de 4 semanas en cuarentena en cajas plásticas individuales, los animales fueron integrados a terrarios colectivos (5-6 ranas por terrario). Estos fueron construidos tomando en cuenta los hábitos riparios de *P. matudai* y tratando de imitar las condiciones naturales encontradas en su hábitat. Los terrarios incluyeron un pequeño estanque ocupando aproximadamente un tercio de la superficie. El resto del estaca contenía tierra, vegetación y refugios (artificiales o naturales). La temperatura fue regulada con aire acondicionado y se mantuvo estable entre los 20°C y 22°C. El horario de luz fue de 12 horas diarias (como se hace comúnmente en especies de países cercanos al Ecuador). Los niveles de humedad se mantuvieron altos utilizando un atomizador 3 veces por semana. El agua del estanque fue reemplazada 1 vez por semana.

Bajo estas condiciones generales, la mayoría de los animales exhibieron una a lo largo del estudio varios comportamientos naturales, incluyendo: vocalizaciones para atraer hembras y competitivas (entre machos), amplexus (fuera y dentro del agua), peleas entre machos y puesta de huevos.

Durante el estudio, ocurrieron varias puestas de huevos por diferentes hembras. Notablemente, en todas las ocasiones, los huevos fueron puestos por la hembra en todo el terrario (suelo, vidrio, hojas, refugio y dentro del agua). Los grupos de huevos repartidos

podían variar entre uno hasta varias decenas. La mayoría de los huevos fuera del agua se degradaban entre uno y tres días. Muchos de los huevos dentro del agua, eran cubiertos por algo que asemejaba un hongo y no se desarrollaron. No obstante, muchos sí desarrollaron, ya que nacieron renacuajos en tres diferentes ocasiones. En una ocasión, treinta y cinco renacuajos nacieron en el transcurso de 5 días. No se logró determinar donde habían sido puestos estos huevos. Ningún renacuajo alcanzó la metamorfosis. Algunos renacuajos (midiendo aproximadamente 1.4 cm al nacer) llegaron a medir hasta 4.5 cm en aproximadamente 3 meses. La mayoría de las muertes de los renacuajos se les atribuyen a problemas con la calidad del agua, principalmente la oxigenación. Los cambios de agua se realizaron dos (en vez de una) veces cuando había renacuajos presentes. Los niveles de agua se midieron en varias ocasiones (utilizando API Freshwater Master Kit), con todos los parámetros (pH, Nitritos, Amoniaco) dentro de lo niveles recomendados, excepto los nitratos (NO_3^-). Los valores de nitratos se mantenían por encima de 160 ppm tanto en el agua de los terrarios como en el agua del grifo filtrada. Sin embargo, si esta medida era correcta, parecía no tener impactos negativos sobre los animales. La mayoría de las muertes de los renacuajos coincidieron con el mal funcionamiento de la bomba de agua que mantenía el agua mezclada. Esto sucedió en dos ocasiones (durante el fin de semana) resultando en la muerte de todos los renacuajos en terrario. Interesantemente, la mayoría de los renacuajos de *P. matudai* parecían desarrollarse bien dentro del terrario, sin necesidad de ser trasladados a otro recipiente. Sin necesidad de agregar alimento extra, los renacuajos parecen ser filtradores alimentándose de materia orgánica presente en el agua.

C. Cuidado y manejo de *Bolitoglossa*

Bolitoglossa es un género grande de salamandras neotropicales que incluye muchas especies amenazadas (IUCN, 2020). Generar más información acerca del cuidado y mantenimiento de ese género en cautiverio es importante para aumentar las probabilidades de éxito de futuros programas de reproducción *ex situ*. Luego de 4 semanas en cuarentena en botes individuales de un litro, 7 salamandras de 3 especies diferentes (*B. conanti*, *B. mexicana*, *B. nympha*) fueron colocadas en un terrario. Esto es posible debido a que las 3 especies comparten hábitats similares en el bosque nuboso de la Unión, Zacapa. En el

terrario, completamente terrestre (sin estanque) se incorporaron varios refugios incluyendo troncos, bromelias y refugios artificiales. A parte del diseño del terrario, las condiciones de vida eran iguales a *P. matudai*.

Debido a su naturaleza extremadamente reservada, las salamandras son muy difíciles de monitorear, incluso en espacios confinados como un terrario. En cautiverio, pueden permanecer escondidas durante varios días seguidos. Las salamandras son animales escurridizos y pueden escapar con facilidad incluso en espacios muy reducidos. El tamaño de la presa parece ser muy importante para las salamandras. La presencia de presas (eg. grillos) demasiado grandes, puede ser ignorada o incluso puede ocasionar estrés a los animales. Esto puede ser retador cuando se tienen animales de tamaños muy distintos en un mismo terrario como adultos de *P. mexicana* y *P. nympha*. Es necesario asegurarse de proveer suficientes presas del tamaño adecuado para todos los individuos.

VIII. Conclusiones

Estudiar los requerimientos y cambios en el microbioma de *P. matudai* y *Bolitoglossa* spp. puede generar información útil que podría ser aplicada en otras especies más amenazadas dentro de estos géneros. Estos organismos modelo no amenazados pueden disminuir la necesidad de coleccionar individuos de otras especies con poblaciones muy reducidas. Algunas de las especies dentro de estos géneros son fuertes candidatos para programas de reproducción en cautiverio en el futuro.

En las muestras de campo, a nivel de clase, la composición del microbioma bacteriano cutáneo es muy similar entre individuos, incluso entre órdenes (Caudata y Anura). Las clases más prevalentes y abundantes son Gammaproteobacteria, seguida por Actinobacteria, Alphaproteobacteria y Bacteroidia. A nivel de género hay mucha variabilidad en la composición del microbioma entre individuos. Sin embargo, algunos géneros muestran alta prevalencia y abundancia relativa de comunidades microbianas como *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, en *P. matudai* y en *Bolitoglossa*. Todos los especímenes de ranas y salamandras fueron coleccionados en el bosque nuboso del sureste del Departamento de Zacapa. Dada la amplia distribución de la mayoría de las especies en este estudio, sería interesante comparar la composición del microbioma cutáneo entre diferentes localidades.

El presente análisis sugiere que la diversidad alfa de las comunidades bacterianas aumentó en al ingresar los animales a los terrarios. Sin embargo, al no estar marcados los individuos, no se pudo determinar si el microbioma cutáneo de todos los individuos siguió esta tendencia. No hubo una caída en diversidad alfa en el ambiente estresante y simple que representa la cuarentena. Sin embargo, se observó que la diversidad de bacterias era mayor en el terrario con reservorios naturales comparado con el terrario con material previamente esterilizado. El análisis de diversidad beta sugiere que el tipo de terrario, etapa y semana de muestreo explican solo un pequeño porcentaje de las diferencias. Se asume que las diferencias individuales son responsables por la mayoría de la disimilitud entre las comunidades bacterianas de la piel de *P. matudai* y *Bolitoglossa* spp. en este estudio. Una limitación de este estudio es que debido que los animales no fueron marcados, no fue

posible darle seguimiento a cada comunidad bacteriana individual durante la etapa de terrario o incluir a los individuos como variable en los modelos.

Este estudio muestra que si ocurrieron cambios en el microbioma cutáneo de *P. matudai* y *Bolitoglossa* spp. en respuesta al cautiverio. Importantemente, el estudio mostró que el tipo de terrario tuvo un impacto sobre la riqueza de las especies de las comunidades bacterianas pero que este efecto sobre la diversidad beta es pequeño. Esto es información útil al considerar como equipar los terrarios para un programa de crianza en cautiverio. También sugiere que la riqueza y diversidad bacteriana es mayor en ambientes cautivos complejos. Sin embargo, este estudio describe solo algunos de los cambios en la diversidad y composición de las comunidades bacterianas en la piel de *P. matudai* y *Bolitoglossa* spp. No se sabe cómo estos cambios pueden afectar la salud de los individuos y este es un tema que vale la pena estudiar. También podría ser útil estudiar si la salud de los individuos depende de la composición del microbioma o de la presencia/abundancia de solo algunos taxa. Sin embargo, las crisis muchas veces obligan a actuar con información incompleta. Esto es importante ya que varias especies dentro de ambos géneros son fuertes candidatos para futuros programas de conservación *ex situ*.

IX. Bibliografía

- Alroy J. (2015). *Current extinction rates of reptiles and amphibians*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112(42), 13003–13008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508681112>
- Antwis, R. E., Haworth, R. L., Engelmoer, D. J., Ogilvy, V., Fidgett, A. L., & Preziosi, R. F. (2014). *Ex situ diet influences the bacterial community associated with the skin of red-eyed tree frogs (Agalychnis callidryas)*. PLoS one, 9(1), e85563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085563>
- Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., & Weber, L. (2015). *Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton*. Aquatic Microbial Ecology, 75(2), 129–137. <http://doi.org/10.3354/ame01753>
- Arnold, T.W., (2010). *Uninformative parameters and model selection using Akaike's information criterion*. Journal of Wildlife Management. 74, 1175e1178.
- Balmford, A., Mace, G., & Leader-Williams, N. (1996). *Designing the Ark: Setting Priorities for Captive Breeding*. Conservation Biology, 10(3), 719-727.
- Barton, K., (2019). *Package MuMIn: Multi-Model Inference version 1.43.6*. <https://cran.r-project.org/package=MuMIn>
- Bates, K. A., Shelton, J., Mercier, V. L., Hopkins, K. P., Harrison, X. A., Petrovan, S. O., & Fisher, M. C. (2019). *Captivity and Infection by the Fungal Pathogen Batrachochytrium salamandrivorans perturb the Amphibian Skin Microbiome*. Frontiers in microbiology, 10, 1834. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01834>
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. & Walker, S. (2015). *Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4*. Journal of Statistical Software, 67(1), 1-48. doi:10.18637/jss.v067.i01.
- Becker, C. G., Fonseca, C. R., Haddad, C. F., Batista, R. F., & Prado, P. I. (2007). *Habitat split and the global decline of amphibians*. Science (New York, N.Y.), 318(5857), 1775–1777. <https://doi.org/10.1126/science.1149374>
- Becker, M. H., Richards-Zawacki, C. L., Gratwicke, B., & Belden, L. K. (2014). *The effect of captivity on the cutaneous bacterial community of the critically endangered Panamanian golden frog (Atelopus zeteki)*. Biological Conservation, 176, 199–206. <https://doi:10.1016/j.biocon.2014.05.029>
- Becker, M.H., Walke, J.B., Cikanek, S., Savage, A.E., Mattheus, N., Santiago, C.N., Minbiole, K.P.C. & Harris, R.N. (2015a). *Composition of symbiotic bacteria predicts survival in Panamanian golden frogs infected with a lethal fungus*. Proceedings of the Royal Society B, 282, 1-9.

- Becker, M.T., Walke, J.B., Murrill, L., Woodhams, D.C., Reinert, L.K., Rollins-Smith, L.A., Burzynski, E.A., Umile, T.P., Minbiole, K.P.C. & Belden, L.K. (2015b). *Phylogenetic distribution of symbiotic bacteria from Panamanian amphibians that inhibit growth of the lethal fungal pathogen Batrachochytrium dendrobatidis*, *Molecular Ecology*, 24, 1628-1641.
- Belden, L. K., Hughey, M. C., Rebollar, E. A., Umile, T. P., Loftus, S. C., Burzynski, E. A., Minbiole, K. P., 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, 1171. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01171>
- Bell, S. C., Alford, R. A., Garland, S., Padilla, G., & Thomas, A. D. (2013). *Screening bacterial metabolites for inhibitory effects against Batrachochytrium dendrobatidis using a spectrophotometric assay*. *Diseases of aquatic organisms*, 103(1), 77–85. <https://doi.org/10.3354/dao02560>
- Berger, L., Marantelli, G., Skerratt, L. F., & Speare, R. (2005). *Virulence of the amphibian chytrid fungus Batrachochytrium dendrobatidis varies with the strain*. *Diseases of aquatic organisms*, 68(1), 47–50. <https://doi.org/10.3354/dao068047>
- Berger, L., Speare, R., & Kent, A. (1999). *Diagnosis of chytridiomycosis of amphibians by histological examination*. *Zoos Print Journal* 15(1). 184-190. <https://doi.org/10.11609/JoTT.ZPJ.15.1.184-90>
- 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 of the United States of America*, 95(15), 9031–9036. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.9031>
- Berger, L., Speare, R., Hines, H. B., Marantelli, G., Hyatt, A. D., McDonald, K. R., Skerratt, L. F., Olsen, V., Clarke, J. M., Gillespie, G., Mahony, M., Sheppard, N., Williams, C., & Tyler, M. J. (2004). *Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis*. *Australian veterinary journal*, 82(7), 434–439. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2004.tb11137.x>
- Bletz, M. C., Loudon, A. H., Becker, M. H., Bell, S. C., Woodhams, D. C., Minbiole, K. P., & Harris, R. N. (2013). *Mitigating amphibian chytridiomycosis with bioaugmentation: characteristics of effective probiotics and strategies for their selection and use*. *Ecology letters*, 16(6), 807–820. <https://doi.org/10.1111/ele.12099>
- Bletz, M. C., Perl, R. G. B., Bobowski, B. T., Japke, L. M., Tebbe, C. C., Dohrmann, A. B., Bhujju, S., Geffers, R., Jarek, M., Vences, M. (2017). *Amphibian skin microbiota exhibits temporal*

- variation in community structure but stability of predicted Bd-inhibitory function.* The ISME Journal, 11(7), 1521–1534. doi:10.1038/ismej.2017.41
- Bloxam Q.M.C. & Tonge S.J. (1995). *Amphibians: suitable candidates for breeding-release programmes.* Biodiversity and Conservation, 4, 636-644
- Brem, F. M., & Lips, K. R. (2008). Batrachochytrium dendrobatidis infection patterns among Panamanian amphibian species, habitats and elevations during epizootic and enzootic stages. Diseases of aquatic organisms, 81(3), 189–202. <https://doi.org/10.3354/dao01960>
- Browne, R.K., Wolfram, K., Garcia, G., Bagaturov, M. & Pereboom, Z.J.J.M. (2011). *Zoo-based amphibian research and conservation programs.* Amphibian and Reptile Conservation, 5(3), 1–14
- Brucker, R.M., Baylor, C.M., Walters, R.L. Lauer, A. Harris, R.N. & Minbiole, K.P.C. (2008a). *The identification of 2,4-diacetylphloroglucinol as an antifungal metabolite produced by cutaneous bacteria of the salamander Plethodon cinereus.* Journal of Chemical Ecology, 34, 34-39.
- Brucker, R.M., Harris, R.N., Schwantes, C.R., Gallaher, T.H., Flaherty, D.C. Lam, B.A. & Minbiole, K.P. (2008b). *Amphibian chemical defense: antifungal metabolites of the microsymbiont Janthinobacterium lividum on the salamander Pletodon cinereus.* Journal of Chemical Ecology, 34, 1422-1429
- Burnham, K.P., Anderson, D.R., (2002). *Model Selection and Multimodel Inference: a Practical Information-Theoretic Approach.* Springer-Verlag, New York, NY.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nature methods, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Cheng, T. L., Rovito, S. M., Wake, D. B., & Vredenburg, V. T. (2011). *Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen Batrachochytrium dendrobatidis.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(23), 9502–9507. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105538108>
- Crawford, A. J., Lips, K. R., & Bermingham, E. (2010). *Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(31), 13777–13782. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914115107>.
- Crump, M. (2010). *Amphibian diversity and life history, in Dood, C.K. (ed.) Amphibian Ecology and Conservation.* Techniques in Ecology and Conservation Series
- Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2000). *Emerging infectious diseases of wildlife-- threats to biodiversity and human health.* Science (New York, N.Y.), 287(5452), 443–449. <https://doi.org/10.1126/science.287.5452.443>

- Dillon, R.J., Vennard, C.T., Buckling, A. & Charnley, A.K. (2005). *Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion*. Ecology Letters, 8(12), 1291-1298
- Dinno, A. (2017). *dunn.test: Dunn's Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums*. R package version 1.3.5. <https://CRAN.R-project.org/package=dunn.test>
- Dirzo, R., Young, H. S., Galetti, M., Ceballos, G., Isaac, N. J. B., & Collen, B. (2014). *Defaunation in the Anthropocene*. Science, 345(6195), 401–406. <https://doi:10.1126/science.1251817>
- Duellman, W. E. & Trueb, L. (1986). *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill.
- Ehrlich, P. R. & Wilson, E. O. (1991). *Biodiversity Studies Science and Policy*. Science. 253,758–762.
- Ellison, S., Rovito, S., Parra-Olea, G., Vásquez-Almazán, C., Flechas, S. V., Bi, K., & Vredenburg, V. T. (2018). *The Influence of Habitat and Phylogeny on the Skin Microbiome of Amphibians in Guatemala and Mexico*. Microbial Ecology. 78, 257–267. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1288-8>
- Felger, J., Enssle, J., Mendez, D. & Speare, R. (2007). *Chytridiomycosis in El Salvador*. Salamandra, 43(2), 122-127.
- Fierer, N., Ferrenberg, S., Flores, G.E., Gonzalez, A., Kueneman, J., Legg, T. Lynch, R.C., McDonald, D., Mihaljevic, J.R., O'Neill, S.P., Rhodes, M.E., Song, S.J. & Walters, W.A. (2012). *From animalcules to an ecosystem: application of ecological concepts to the human microbiome*. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 43, 137-155. <https://10.1146/annurev-ecolsys-110411-160307>
- Forrest, M. J., & Schlaepfer, M. A. (2011). *Nothing a hot bath won't cure: infection rates of amphibian chytrid fungus correlate negatively with water temperature under natural field settings*. PloS one, 6(12), e28444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028444>
- Frías-Alvarez, P., Vredenburg, V. T., Familiar-López, M., Longcore, J. E., González-Bernal, E., Santos-Barrera, G., Zambrano, L., & Parra-Olea, G. (2008). *Chytridiomycosis survey in wild and captive mexican amphibians*. EcoHealth, 5(1), 18–26. <https://doi.org/10.1007/s10393-008-0155-3>
- García-Roa, R., Sunyer, J., Fernández-Loras, A. & Bosch, J. (2014). *First record of Batrachochytrium dendrobatidis in Nicaragua*. The Herpetological Journal, 24(1), 65-68.
- Griffiths, R.A. & Pavajeau, L. (2008). *Captive breeding, reintroduction and the conservation of amphibians*. Conservation Biology, 22, 852–861
- Gusset, M., & Dick, G. (2010). *The global reach of zoos and aquariums in visitor numbers and conservation expenditures*. Zoo Biology, 29, 1–4.

- Harris, R.N., James, T.Y., Lauer, A., Simon, M.A. & Patel, A. (2006). *Amphibian pathogen Batrachochytrium dendrobatidis is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species*. *EcoHealth Journal*, 3, 53-56.
- Harris, R. N., Lauer, A., Simon, M. A., Banning, J. L., & Alford, R. A. (2009a). *Addition of antifungal skin bacteria to salamanders ameliorates the effects of chytridiomycosis*. *Diseases of aquatic organisms*, 83(1), 11–16. <https://doi.org/10.3354/dao02004>
- Harris, R. N., Brucker, R. M., Walke, J. B., Becker, M. H., Schwantes, C. R., Flaherty, D. C., Lam, B. A., Woodhams, D. C., Briggs, C. J., Vredenburg, V. T., & Minbiole, K. P. (2009b). *Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus*. *The ISME journal*, 3(7), 818–824. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.27>
- IUCN Red List of Threatened Species (2020). *Summary Statistics*. Disponible en: http://www.iucnredlist.org/about/summary-statistics#Table_9 [Ingresado el 9 de Junio del 2020].
- Kaiser, K., & Pollinger, J. (2012). *Batrachochytrium dendrobatidis shows high genetic diversity and ecological niche specificity among haplotypes in the Maya Mountains of Belize*. *PloS one*, 7(2), e32113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032113>
- Kolby, J. E., Padgett-Flohr, G. E., & Field, R. (2010). *Amphibian chytrid fungus Batrachochytrium dendrobatidis in Cusuco National Park, Honduras*. *Diseases of aquatic organisms*, 92(2-3), 245–251. <https://doi.org/10.3354/dao02055>
- Kueneman, J. G., Parfrey, L. W., Woodhams, D. C., Archer, H. M., Knight, R., & McKenzie, V. J. (2013). *The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages*. *Molecular Ecology*, 23(6), 1238–1250. doi:10.1111/mec.12510
- Kueneman, J. G., Woodhams, D. C., Harris, R., Archer, H. M., Knight, R., & McKenzie, V. J. (2016). *Probiotic treatment restores protection against lethal fungal infection lost during amphibian captivity*. *Proceedings. Biological sciences*, 283(1839), 20161553. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1553>
- Lamirande, E. W., & Nichols, D. K. (2002). *Effects of host age on susceptibility to cutaneous chytridiomycosis in blue-and-yellow poison dart frogs (Dendrobates tinctorius)*. *Proceeding of the Sixth International Symposium on the Pathology of Reptiles and Amphibians*. R. G. McKinnell and D. L. Carlson, eds. Saint Paul, Minnesota.
- Larson, A., Wake, D. & Devitt, T. (2006). *Plethodontidae. Lungless Salamanders*. Version 26, September 2006. <http://tolweb.org/Plethodontidae/15441/2006.09>. 26 in The Tree of Life Web Project <http://tolweb.org/>. [Ingresado el 16 de Junio de 2020]
- Lauer, A., Simon, M. A., Banning, J. L., André, E., Duncan, K., & Harris, R. N. (2007). *Common Cutaneous Bacteria from the Eastern Red-Backed Salamander Can Inhibit Pathogenic Fungi*. *Copeia*, 3, 630–640. <https://doi:10.1643/004>

- Lawson, T. (2009). *Habitat effects on chytridiomycosis infection in the critically endangered *Agalychnis moreletii** (Tesis de Maestría en Ciencias en Ciencias Ambientales). College of Charleston, South Carolina, pp 69
- Leakey, R. & Lewin, R. (1992). *The sixth extinction: patterns of life and the future of humankind*. Doubleday, London
- Lewis, C.H.R., Richards-Zawacki, C.L., Ibáñez, R., Luedtke, J., Voyles, J., Houser, P., Gratwicke, B. (2019) *Conserving Panamanian harlequin frogs by integrating captive-breeding and research programs*. Biological Conservation. Elsevier, 236(May), pp. 180–187. doi: 10.1016/j.biocon.2019.05.029 .
- Lips, K. R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J. D., Alford, R. A., Voyles, J., Carey, C., Livo, L., Pessier, A. P., & Collins, J. P. (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(9), 3165–3170. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506889103>
- Lips, K.R., Burrowes, P.A., Mendelson III, J.R. & Parra-Olea, G. (2005). *Amphibian Population Declines in Latin America: A Synthesis*. Biotropica, 37, 222-226.
- Lips, K.R., Mendelson III, J.R., Muñoz-Alonso, A., Canseco-Márquez, L. & Mulcahy, D.G. (2004). *Amphibian population declines in montane southern Mexico: resurveys of historical localities*. Biological Conservation, 119, 555-564
- Lips, K.R., Reeve, J.D. & Witters, L.R. (2003). *Ecological traits predicting amphibian population declines in Central America*. Conservation Biology, 17(4), 1078-108
- Longcore, J. E., Pessier, A. P., & Nichols, D. K. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. Mycologia, 91, 219-227.
- Loudon, A., Woodhams, D., Parfrey, L., Archer, H., Knight, R., McKenzie, V., Harris, R.N. (2014). *Microbial community dynamics and effect of environmental microbial reservoirs on red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*)*. ISME J 8, 830–840 <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.200>
- Mazzoni, R., Cunningham, A., Daszak, P., Apolo, A., Perdomo, E. & Speranza, G. (2003). *Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade*. Emerging Infectious Diseases, 9(8), 995-998
- McKenzie, V. J., Bowers, R. M., Fierer, N., Knight, R., & Lauber, C. L. (2012). *Co-habiting amphibian species harbor unique skin bacterial communities in wild populations*. The ISME journal, 6(3), 588–596. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.129>
- McMurdie & Holmes (2013). *phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data*. PLoS ONE. 8(4):e61217

- Mendelson III, J.R., Brodie, Jr. E.D., Malone, J.H., Acevedo, M.E., Baker, Smatresk, N.J. & Campbell, J.A. (2004). *Factors associated with the catastrophic decline of a cloudforest frog fauna in Guatemala*. *Revista de Biología Tropical*, 52, 991-1000.
- Michaels, C.J., Antwis, R.E. & Preziosi, R.F. (2014). Impact of plant cover on fitness and behavioural traits of captive Red-eyed tree frogs (*Agalychnis callidryas*). *PLoS ONE* 9:e95207.
- Myers, N. (1993). *Questions of mass extinction*. *Biodiversity and Conservation*.2, 2–17
- Ochoa-Ochoa, L.M. & Whittaker, R.J. (2014). *Spatial and temporal variation in amphibian metacommunity structure in Chiapas, Mexico*. *Journal of Tropical Ecology* 30(6), 537-549
- O'Hanlon, S. J., Rieux, A., Farrer, R. A., Rosa, G. M., Waldman, B., Bataille, A., Kosch, T. A., Murray, K. A., Brankovics, B., Fumagalli, M., Martin, M. D., Wales, N., Alvarado-Rybak, M., Bates, K. A., Berger, L., Böll, S., Brookes, L., Clare, F., Courtois, E. A., Cunningham, A. A., ... & Fisher, M. C. (2018). *Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines*. *Science* (New York, N.Y.), 360(6389), 621–627. <https://doi.org/10.1126/science.aar1965>
- Oksanen, J, Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., & Wagner, H. (2019). *vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-6*. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Parada, A. E., Needham, D. M., & Fuhrman, J. A. (2016). *Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples*. *Environmental Microbiology*, 18(5), 1403–1414. <http://doi.org/10.1111/1462-2920.13023>
- Parra-Olea, G., García-París, M. & Wake, D.B. (2004): *Molecular diversification of salamanders of the tropical American genus Bolitoglossa (Caudata: Plethodontidae) and its evolutionary and biogeographical implications*. *Biological Journal of the Linnean Society* 81(3), 325-346
- Passos, L. F., Garcia, G., & Young, R. J. (2017). *Neglecting the call of the wild: Captive frogs like the sound of their own voice*. *PloS one*, 12(7), e0181931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181931>
- Passos, L. F., Garcia, G., & Young, R. J. (2017). *The tonic immobility test: Do wild and captive golden mantella frogs (Mantella aurantiaca) have the same response?*. *PloS one*, 12(7), e0181972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181972>
- Passos, L.F., Garcia, G. & Young, R.J. (2018). *Comparing the bacterial communities of wild and captive golden mantella frogs: Implications for amphibian conservation*. *PLoS one* 13(10): e0205652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205652>

- Puschendorf, R. (2003). *Atelopus varius* (Harlequin Frog) fungal infection. *Herpetological Review*, 34(4), 355.
- Puschendorf, R., Castañeda, F. & McCranie, J.R. (2006). *Chytridiomycosis in wild frogs from Pico Bonito National Park, Honduras*. *EcoHealth Journal*, 3, 178-181.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). *The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools*. *Nucleic acids research*, 41(Database issue), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rachowicz, L. J., & Vredenburg, V. T. (2004). *Transmission of Batrachochytrium dendrobatidis within and between amphibian life stages*. *Diseases of Aquatic Organisms* 61,75-83.
- Rebollar, E. A., Hughey, M.C., Medina, D., Harris, R., Ibañez, R. & Belden, L.K. (2016). *Skin bacterial diversity of Panamanian frogs is associated with host susceptibility and presence of Batrachochytrium dendrobatidis*. *The ISME Journal*, 1–14, <https://doi:10.1038/ismej.2015.234>
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., & Zilber-Rosenberg, I. (2007). *The role of microorganisms in coral health, disease and evolution*. *Nature reviews. Microbiology*, 5(5), 355–362. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1635>
- Rovito, S. M., Parra-Olea, G., Vásquez-Almazán, C. R., Papenfuss, T. J., & Wake, D. B. (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(9), 3231–3236. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813051106>
- Rowe, G., Sweet, M. & Beebee, T. (2017). *An introduction to Molecular Ecology*. Oxford University Press. pp. 429-430
- Ruano, E.G., Garcia, L., Vásquez, C.R., Conde, A.J. & Zamora-Jerez, O.A. (2011). *Evaluación de la Incidencia de Quitridiomycosis en Anfíbios en tres regiones de endemismo: Los casos de los Bosques Nubosos de Zacapa, Baja Verapaz y San Marcos, Guatemala*. Guatemala.FODECYT-70-2009, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT).
- Savage, J.M. (2002). *The Amphibians and Reptiles of Costa Rica: a Herpetofauna Between Two Continents, Between Two Seas*. University of Chicago Press
- Scheele, B. C., Pasmans, F., Skerratt, L. F., Berger, L., Martel, A., Beukema, W., Acevedo, A. A., Burrowes, P. A., Carvalho, T., Catenazzi, A., De la Riva, I., Fisher, M. C., Flechas, S. V., Foster, C. N., Frías-Álvarez, P., Garner, T. W. J., Gratwicke, B., Guayasamin, J. M., Hirschfeld, ... & Canessa, S. (2019). *Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity*. *Science*, 363, 1459–1463. <https://doi:10.1126/science.aav0379pmid:30923224>

- Snyder, N.F., Derrickson, S.R., Beissinger, S.R., Wiley, J.W., Smith, T.B., Toone, W.D., & Miller, B. (1996). *Limitations of captive breeding in endangered species recovery*. *Conservation Biology*, 10, 338–348.
- Solis, J.M., Wilson, L.D. & Townsend, J.H. (2014). *An updated list of the Amphibians and reptiles of Honduras, with comments on their nomenclature*. *Mesoamerican Herpetology*, 1, 123-144.
- Stewart, E. (2012). *Growing Unculturable Bacteria*. *Journal of Bacteriology*, 194(16), 4151-4160. <https://doi.org/10.1128/JB.00345-12>
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S., Fischman, D. L., & Waller, R. W. (2004). *Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide*. *Science* (New York, N.Y.), 306(5702), 1783–1786. <https://doi.org/10.1126/science.1103538>.
- Tepley, B., Bradfield, K.S, Michaels, C. & Bungard, M. (2015). *Amphibians and conservation breeding programs: do all threatened amphibians belong to the ark?* *Biodiversity Conservation*. 24 (11), 2625–2646. <https://doi.org/10.1007/s10531-015-0966-9>
- Townsend, J.H., Wilson, L.D & Luque-Montes, I.R. (2008). *Country-wide conservation and management assessment of critically endangered amphibians in Honduras*. *Reporte Interino del Proyecto CEPF/UF*, pp. 23.
- Valencia-Aguilar, A., Cortés-Gómez, A.M. & Ruiz-Agudelo, C.A. (2013). *Ecosystem services provided by amphibians and reptiles in Neotropical ecosystems*. *International Journal of Biodiversity Science, Ecosystem Services & Management*. 9, 257-272.
- Voyles, J., Young, S., Berger, L., Campbell, C., Voyles, W. F., Dinudom, A., Cook, D., Webb, R., Alford, R. A., Skerratt, L. F., & Speare, R. (2009). *Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines*. *Science*, 326(5952), 582–585. <https://doi.org/10.1126/science.1176765>
- Wake, D.B. & Vredenburg, V.T. (2008). *Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians*. *Proceedings of the National Academy of Science*, 105, 11466-11473.
- Walke, J. B., Becker, M. H., Hughey, M. C., Swartwout, M. C., Jensen, R. V., & Belden, L. K. (2015). *Most of the Dominant Members of Amphibian Skin Bacterial Communities Can Be Readily Cultured*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(19), 6589–6600. [doi:10.1128/aem.01486-15](https://doi.org/10.1128/aem.01486-15)
- Walke, J. B., & Belden, L. K. (2016). *Harnessing the Microbiome to Prevent Fungal Infections: Lessons from Amphibians*. *PLoS pathogens*, 12(9), e1005796. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005796>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag, New York

- Whitfield, S.M., Bell, K.E., Philippi, T., Sasa, M., Bolaños, F., Chaves, G., Savage, J.M. & Donnelly M.A. (2007). *Amphibian and reptile declines over 35 years at La Selva, Costa Rica*. *Proceedings of the National Academy of Science*, 104, 8352–8356.
- Whitfield, S.M., Lips, K.R. & Donnelly, M.A. (2016). *Amphibian decline and conservation in Central America*. *Copeia*, 104, 351-379.
- Wilson, E.O. (2003). *The future of life*. Vintage, New York
- Woodhams D. C., Alford R. A., Antwis R. E., Archer H., Becker M. H., Belden L. K., et al. (2015). *Antifungal isolates database of amphibian skin-associated bacteria and function against emerging fungal pathogens*. *Ecology* 96:595 10.1890/14-1837.1
- Young, B.E., Lips, K.R., Reaser, J.K., Ibáñez, R., Salas, A.W., Cedeño, J.R., Coloma, L.A., Ron, S., La Marca, E., Meyer, J.R., Muñoz, A., Bolaños, F., Chavez, G. & Romo, D. (2001). *Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America*. *Conservation Biology*, 15, 1213-1223.
- Zippel, K., Johnston, K., Gagliardo, R., Gibson, R., McFadden, M., Browne, R., Martinez, C. & Townsend, E. (2011). *The Amphibian Ark: A Global Community for Ex situ Conservation of Amphibians*. *Herpetological Conservation and Biology*, 6(3). 340–352

X. Anexos

A. Guía para el manejo y cuidado en cautiverio de *P. matudai*

Guía de cuidado en cautiverio (<i>Plectrohyla matudai</i>)
Elaborada por: Daniel Gygax
Biología de la especie
Taxonomía: Orden: Anura Familia: Hylidae Género: <i>Plectrohyla</i> (Brocchi, 1877) Especie: <i>matudai</i> (Hartweg, 1941) Nombre común: Ranita de dedo espinoso de Matuda
Descripción: Tamaño: Hembras adultas: SVL observado de 36.0 a 50.3 mm. Rango de peso aproximado de 3.0 a 5.0 g. Machos adultos: SVL observado de 28.0 a 40.5 mm. Rango de peso aproximado de 2.5 a 4.5 g Tamaño aproximado durante metamorfosis es aproximadamente 17 a 20 mm. Coloración: <i>P. matudai</i> suele tener un dorso de marrón claro cubierto con manchas café oscuro, verde oscuro o negras. Algunos machos pueden tener una coloración más uniforme, y en machos el café claro puede llegar a dorado. El color puede oscurecerse mucho durante periodos de actividad. Generalmente hay una franja, oscura, delgada en el labio superior y por debajo o atravesando del ojo. Muchas veces, una franja oscura separa el dorso de los flancos de color crema. La piel suele estar cubierta de muchos tubérculos y verrugas. Los renacuajos suelen tener una coloración marrón claro con algunas partes translucidas. En la mayor parte del dorso se pueden observar manchas café oscuro o negro y a veces manchas verdes. Características morfológicas: Preplex puntiagudo. Piel con más tubérculos y verrugas que otras especies similares. Presencia de quilla rostral vertical ausente en otras especies similares.
Longevidad: Se desconoce la longevidad en la naturaleza. Sin embargo, sabemos de individuos colectados adultos, que llevan más de dos años cautiverio.
Zoogeografía/ecología:
Distribución: México, Guatemala y Honduras

Hábitat: Distribución amplia pero disjunta en bosques nubosos y pino encino a elevaciones de 700 a 2600 msnm. Se puede encontrar principalmente de noche en arroyos y quebradas.

Población: Aunque tiene una distribución muy amplia, esta no es continua. La especie está bajo amenaza de pérdida y fragmentación de hábitat por actividades humanas. La Quitridiomycosis es considerada una amenaza para *P. matudai*. Sin embargo, los adultos de esta especie parecen ser resistentes a las infecciones por *Bd* comparado con otras especies del género (Chen et al. 2011).

Estado: Preocupación menor (LC) (IUCN, 2020)

Dieta:

Desconocida, pero se asume que se alimenta principalmente de invertebrados pequeños.

Reproducción:

Madurez sexual: En cautiverio, la madurez sexual puede alcanzarse en poco menos de un año (desde metamorfo a adulto).

Estacionalidad: En la naturaleza la actividad reproductiva aumenta en la época lluviosa (junio a septiembre). En cautiverio puede haber actividad reproductiva todo el año, posible y especialmente si se mantienen las condiciones de humedad y temperatura constantes todo el año.

Huevos/oviposición/desarrollo: Hembras examinadas han llegado a tener de 101-144 huevos en los ovarios. Como otras especies de *Plectrohyla*, se sospecha que *P. matudai* coloca los huevos en superficies o grietas de rocas sumergidas. En cautiverio, en varias ocasiones los huevos fueron colocados en pequeños grupos repartidos por todo el terrario, dentro y fuera del agua. En cautiverio los huevos pueden tardar aproximadamente 25 días en eclosionar. En cautiverio, los renacuajos nacen de aproximadamente 10mm y pueden llegar a medir 3.5mm en 2 meses. En cautiverio se observó que el crecimiento de los renacuajos es muy rápido las primeras semanas y disminuye con el aumento de tamaño del renacuajo. Se desconoce la duración de la metamorfosis.

Actividad y otros comportamientos notables

Es una especie nocturna. Suelen pasar el día descansando debajo de hojas o tallos. Las peleas entre machos son comunes, al igual que las vocalizaciones competitivas. En cautiverio, el amplexus puede suceder en tierra o dentro del agua.

Cuidado en cautiverio

Condiciones:

Animales adultos:

Diseño: Se recomienda utilizar terrarios de vidrio con puertas frontales para mejor accesibilidad. 30% del espacio del suelo puede ser utilizado para agua poco profunda (6-8 cm), para que las ranas puedan bañarse, y ayuda a mantener la humedad. El panel superior del terrario puede consistir en malla fina que evite el paso de insecto pero que permita todavía el paso de UVB de las luces que se encuentran arriba. El terrario debe contar con drenajes o formas de vaciado para eliminar el exceso de agua por el humedecimiento (automático o manual). El agua del estanque también debe ser cambiada regularmente para eliminar desechos e insectos muertos por lo cual es bueno considerar un drenaje extra.

Los adornos básicos incluyen plantas donde las ranas puedan descansar y refugios. Los refugios también son útiles para que los grillos se suban y sean más accesibles para las ranas. Refugios de fibra de coco, corcho o incluso tubos PVC pueden funcionar. Las plantas son obligatorias, idealmente plantas reales y altas. Si se utiliza sustrato “natural” como tierra negra, las plantas pueden ir sembradas. Sin embargo, utilizar plantas con maceta puede facilitar la limpieza y búsqueda de animales. Para algunas especies arbóreas se ha utilizado papel mayordomo como sustrato o sin sustrato, con buenos resultados, facilitando la limpieza de heces y alimento sobrante. Esto no ha sido probado con *P. matudai*, excepto en cuarentena. Sin embargo, los ambientes muy simples y homogéneos pueden afectar la diversidad del microbioma cutáneo y posiblemente no sea una buena práctica. Algunas especies vegetales que funcionan bien son *Ficus* sp., *Heliconia* sp., *Philodendron* sp. y bromelias. Es importante reemplazar las plantas cuando estas pierdan muchas hojas o marchiten. El estanque puede incluir grava de acuario o no. La primera ha funcionado para el autor. También se pueden incluir piedras de manera que el animal pueda estar en el agua con acceso a la superficie y colocadas de manera que la parte inferior sea accesible para oviposición. *Plectrohyla* spp. muchas veces se encuentran y reproducen cerca de pequeñas caídas de agua por lo cual se recomienda incluir una bombita o caída de agua artificial que puede imitar esta parte del hábitat.

Dimensiones: Un terrario de 45x45x60 cm es adecuado para 6-8 individuos adultos. Se debe evitar sobrepoblar un terrario para evitar mucha competencia por comida, hembras, peleas o estrés sobre hembras (si hay muchos machos). Algunas peleas entre machos fueron documentadas.

Régimen de temperatura: Se debe tratar de imitar las condiciones en el hábitat natural. *P. matudai* es una especie tropical común en bosques nubosos y pino/encino, y se recomienda mantenerse dentro de 18°C a 27°C. por periodos prolongados. El autor ha utilizado una temperatura constante de 20 – 21°C con buenos resultados. Si fuera posible, podría funcionar bajar la temperatura de 4-5 °C durante la noche (imitando la naturaleza).

Humedad: Se ha mantenido la humedad constante (con atomizador manual 3 veces por semana) entre 60 y 100% durante el año. Si se desea mantener la estacionalidad, el nivel de humedad puede disminuirse durante la época seca y aumentar durante la época lluviosa. Siempre es recomendable medir las condiciones en el hábitat antes de establecer los parámetros en cautiverio.

Fotoperiodo: Para especies tropicales como *P. matudai* se recomienda utilizar 12 horas de luz/12 horas oscuridad, este patrón ha funcionado para el autor. También puede modificarse estacionalmente a 10/14 o 14/10. Aunque los terrarios tengan acceso a luz natural, se recomienda utilizar bombillas con UVB.

Metamorfos recientes:

Los metamorfos recientes pueden mantenerse de la misma manera que los adultos. Se pueden mantener en grupos más grandes sin pasar los 15 para evitar competencia. Se recomienda que estructuras o adornos que les permitan salir del agua fácilmente. Es importante adaptar el tamaño del alimento.

Renacuajos:

Los renacuajos pueden mantenerse en recipientes de vidrio o plástico de dimensiones variables dependiendo la cantidad de larvas. 20 larvas podrían mantenerse bien en un recipiente de 30x25 cm con 10 cm de profundidad. El agua debe cambiarse diariamente si es posible, sin cambiar toda el agua (1/2 o 3/4 es recomendado). El agua siempre debe mantenerse mezclada y oxigenada. No es necesario un sustrato. EN la naturaleza se observan seguido adheridos a rocas en zonas de poca corriente. Se recomienda tratar de imitar estas condiciones agregando rocas y bombas de oxigenación y/o corriente.

Dieta:

Alimento:

Adultos: Los grillos (*Gryllus* sp. o *Acheta* sp.) son la opción más practica y utilizada en cautiverio. Sin embargo, otros insectos del tamaño adecuado pueden ser consumidos. Es importante adaptar el tamaño de la dieta al tamaño del animal. Se recomienda utilizar grillos en el 1er instar (~ 5mm) a 3er instar (~1cm), considerados grillos pequeños. Los grillos medianos (4to instar/1.5 cm) podrían ser consumidos principalmente por los animales más grandes. Insectos excesivamente grandes (>1.5cm) podrían no ser considerados alimento y se considerados como amenaza, causando estrés en las ranas.

Metamorfos y juveniles: Se les puede alimentar las mismas especies de grillos que adultos, pero menor tamaño. Los microgrillos (2 a 5 mm) suelen tener un tamaño adecuado. Moscas del género *Drosophila* también pueden ser utilizadas.

Para todas las etapas de metamorfo a adultos se recomienda espolvorear el alimento con suplementos de calcio y vitaminas (nosotros utilizamos Calcium Plus, Repashy Superfoods). Es importante tomar en cuenta que este suplemento se puede lavar si el insecto cae al agua. También se recomienda alimentar a los grillos con vegetales nutritivos como manzana o zanahoria, antes de ser ofrecidos a las ranas. De esta forma las ranas absorberán los nutrientes en el tracto digestivo de los grillos (en inglés el proceso se llama “Gutloading”).

Renacuajos: En nuestra experiencia, los renacuajos crecieron bien en el terrario de nacimiento, sin ser necesario agregar alimento para los renacuajos. Se sospecha que se alimentaban de materia orgánica proveniente del resto del terrario y probablemente de las heces animales adultos. La disponibilidad de materia orgánica puede depender del diseño del terrario. Si se crían lo renacuajos en un recipiente separado, se pueden utilizar partes iguales de hojuelas de alimento de pescado y espirulina como alimento.

Presentación de alimento:

Adultos: Se deben colocar los grillos en el terrario, idealmente sobre objetos que aumenten su detectabilidad. 5 a 7 grillos (el tamaño del insecto va a influir en esta cantidad) por animal, 2 veces por semana es una cantidad apropiada. Es importante tomar en cuenta en la cantidad total ofrecida que muchos grillos caen al agua y se ahogan. También hay que considerar que la presencia de muchos insectos movilizándose por el terrario puede casuar estrés a las ranas. Suplementar como indicado anteriormente. Es buena práctica presentar el alimento en la tarde/noche ya que son ranas nocturnas.

Renacuajos: Se muelen las hojuelas de alimento de pescado y espirulina en partes iguales, y se mezclan con un poco de agua para formar una pasta seca la cual se enrolla en pellets del

tamaño aproximado de una arveja y se deja caer al recipiente. El agua debe cambiarse regularmente y se debe limpiar todo el alimento sobrante.

Reproducción:

Estructura social:

Probablemente es importante y común que los machos vocalicen uno contra el otro durante el cortejo, por lo cual es recomendable mantener a múltiples machos con múltiples hembras en un mismo terrario. La proporción exacta no es importante. No se recomienda tener a muchos machos con pocas o solo una hembra en un mismo terrario. La agresión entre machos es común en cautiverio y probablemente en la naturaleza también. El tamaño del grupo dependerá en el tamaño del terrario y disponibilidad de alimento.

Cortejo y oviposición

Durante la época de reproducción, la cual puede ser todo el año en cautiverio si las condiciones ambientales se mantienen constantes, los machos se pueden escuchar vocalizando. En la naturaleza *P. matudai* suele vocalizar principalmente en la noche, sin embargo, en cautiverio, no era raro escuchar a los machos vocalizar durante horas de luz después de medio día. Se desconoce la duración promedio del amplexus pero puede llegar a durar varias horas. El amplexus puede suceder dentro o fuera del agua.

La puesta de huevos solo se observó en dos ocasiones, solo la hembra presente. En una de estas ocasiones, la puesta de huevos falló, probablemente por un prolapso uterino ocasionado por la retención prolongada de huevos, posiblemente ocasionada por la falta de un sitio adecuado para oviposición, aunque no se puede descartar otros factores ambientales. Aunque no se ha confirmado, se sospecha que *P. matudai* coloca los huevos debajo de rocas o en grietas sumergidas al igual que otras especies del género. En cautiverio, en varias ocasiones, las hembras colocaron los huevos en pequeños grupos alrededor de todo el terrario, incluyendo, agua, tierra y vidrio. Se considera que esto es un comportamiento anormal. Los huevos fuera del agua se degradaban en 1 o 2 días. Solo ocurrió eclosión en huevos dentro del agua. Es importante incluir sitios adecuados de oviposición en el diseño del terrario.

Se desconoce el número promedio de huevos por puesta. En la naturaleza se han colectado hembras con más de 100 huevos en los ovarios, en cautiverio, se contaron más de 50 incluyendo pequeños grupos de huevos repartidos por el terrario.

Cuidado de huevos y larva:

Huevos: Se recomienda evitar manipular o perturbar mucho los huevos sumergidos. Podría considerarse cambiarlos de contenedor para mejor control. Los huevos colocados fuera del agua pueden sumergirse, pero siempre existe la posibilidad que sea huevos no fecundados.

Renacuajos: Aunque pueden sobrevivir y crecer dentro del terrario de los adultos, se recomienda cambiarlos y cuidarlos en un recipiente separado para tener más facilidad en la observación y monitoreo. Al nacer son muy pequeños ~1.3cm pero pueden llegar a superar los 3.5 cm en menos de 3 meses.

Otras consideraciones:

Manipulación y transporte:

Son animales delicados y deben ser manipulados con cuidado. Para el transporte de duración corta (horas o 1-2 días) se puede utilizar bolsas grandes de colecta, de plástico transparente. Estas deben, inflarse, oxigenarse y humedecerse constantemente. Se puede agregar vegetación

como refugio y retención de humedad. Para transportes más largos o periodos cuarentena recipientes plásticos individuales o para 2-3 animales, de aprox. 25x12x12 cm, ofrecen una mejor alternativa. Se deben hacer agujeros en la tapadera o paredes, de manera que el alimento no pueda escaparse y agregar una toalla de papel húmedo lo suficientemente grande para servir como refugio, la cual debe cambiarse mínimo cada dos días. Idealmente, lo animales deben ser manipulados con guantes de vinilo húmedos en todas las ocasiones.

Salud y cuidado veterinario:

Se recomienda evitar los procedimientos excesivamente invasivos o disruptivos de manera regular. Se recomienda utilizar agua filtrada y monitorear la calidad de esta regularmente. Es buena práctica realizar chequeos fecales en búsqueda de parásitos cada cierto tiempo. Se recomienda hacer pruebas de *Bd*, especialmente en los animales nuevos. Es importante monitorear regularmente la salud física y comportamiento de los animales sin manipularlos excesivamente para evitar estrés.

Referencias:

Duellman, W. E. (2001). *The Hylid Frogs of Middle America*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Ithaca, New York.

Duellman, W. E., Campbell, J.A. (1992). "Hylid frogs of the genus *Plectrohyla*: systematics and phylogenetic relationships." *Miscellaneous Publications, Museum of Zoology, University of Michigan*, 181, 1-32.

Hartweg, N. (1941). "Notes on the genus *Plectrohyla*, with descriptions of new species." *Occas. Papers Mus. Zool. Univ. Michigan*, 437, 1-10.

Fotografías:



Machos peleando



agua

Amplexus dentro del



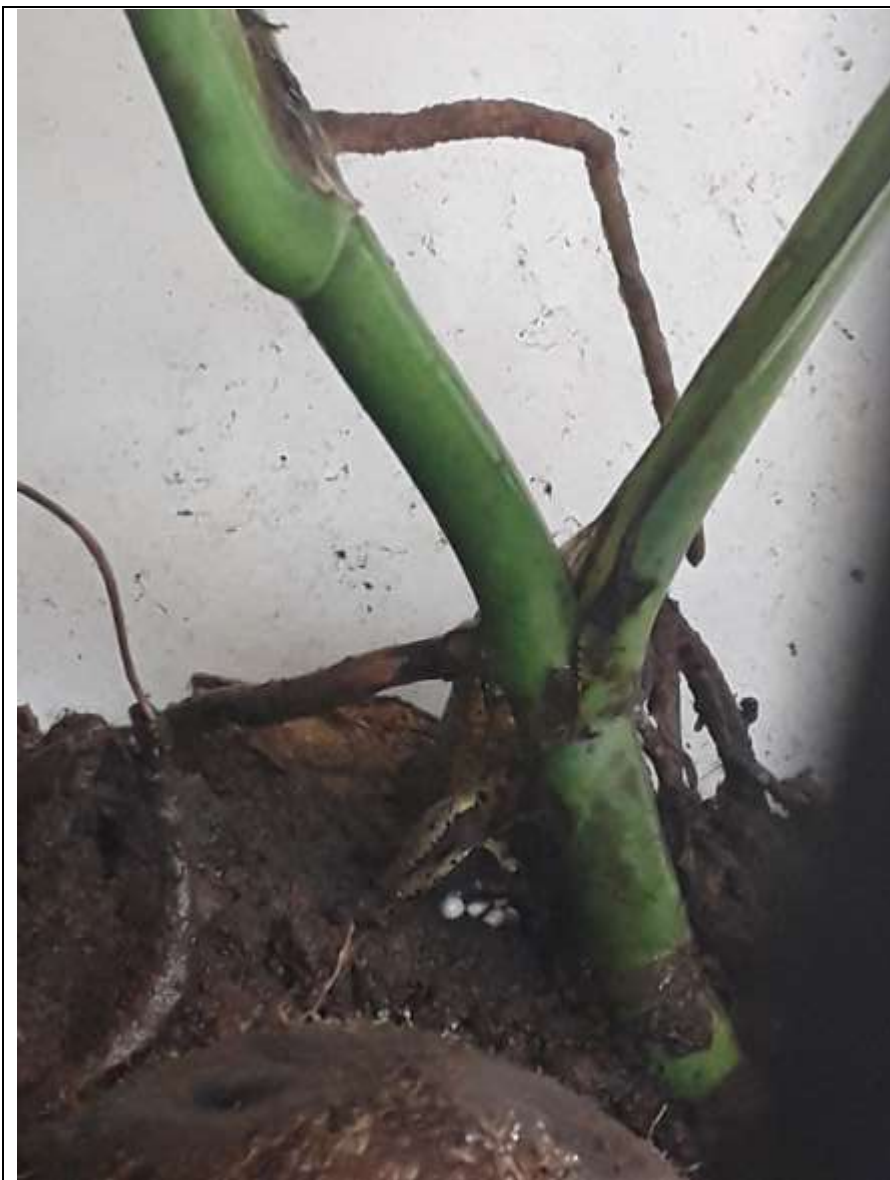
roca

Ranita debajo de



huevo

Renacuajo y



huevos

Hembra en colocando



comercial

Refugio



Uno de los terrarios

