

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**DETECCIÓN DE *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS* EN ANUROS
DEL BOSQUE TROPICAL SECO DE COSTA RICA Y MONITOREO DE LA
POBLACIÓN DE *CRAUGASTOR RANOIDES* (ANURA: CRAUGASTORIDAE)
EN LA PENINSULA DE SANTA ELENA**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de
Posgrado en Biología para optar al grado de Magister Scientiae en Biología

HÉCTOR ZUMBADO ULATE

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2009

Dedicatoria

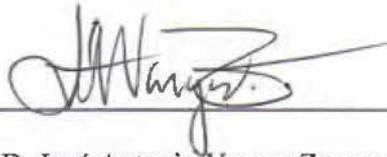
Dedico la presente tesis a mis padres, Héctor y Flory, a mi hermano Emmanuel y a mis hermanas Ana Teresa y Carmen por el apoyo brindado durante todos estos años de esfuerzo y estudio. Así mismo a todos mis amigos, compañeros, investigadores y profesores que colaboraron conmigo de manera desinteresada a lo largo de esta investigación y sin los cuáles este proyecto no se hubiera realizado.

Agradecimientos

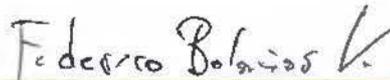
Deseo agradecer al Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICIT), al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICIT) y al Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad de Costa Rica (SEP) por el apoyo financiero para realizar el proyecto. A IdeaWild por la donación de equipo. A la Red de Análisis de Anfibios Amenazados (RANA) por brindarme excelentes oportunidades de entrenamiento. Al comité revisor de tesis Federico Bolaños Vives, Gilbert Barrantes Montero y Gustavo Gutiérrez Espeleta por su paciencia y colaboración para revisar este proyecto. Al personal administrativo del Área de Conservación Guanacaste (ACG), especialmente a Róger Blanco y María Marta Chavarría por los permisos de investigación y el hospedaje. A los guardaparques del ACG, en especial a Javier por su ayuda desinteresada. A Liseth (Tita) por facilitarnos el transporte. A Margarita Lampo por la donación de reactivos. A Sandra Silva y Rebeca Campos del Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular por el préstamo de equipo y laboratorios. A Robert Puschendorf, Vance Vredenburg, Karen Lips, Mason Ryan y Alan Pounds por sus consejos y colaboración con información. A Gerardo Chaves, Adrián García, Rosa Navarro, Lidia Avilés, Iria

con información. A Gerardo Chaves, Adrián García, Rosa Navarro, Lidia Avilés, Iria Chacón, Eyleen Corrales, Carolina Esquivel, Tanya Lobo y Amanda Vicente por su apoyo logístico e informático. A todos los asistentes de campo y laboratorio, Beatriz Hernández, Arlet Calvo, Melissa Muñoz, Elodia Sánchez, Victoria Bogantes, Enrique González, Eugenia Cordero, Catalina Sánchez, Cristina Smith, Katherine Díaz, José Adán Zelaya, Elena Vásquez, Karla Conejo, Priscilla Alpizar, Kathia Alfaro, Kimberly García, Gabriel Ríos, Daniela Masís y especialmente a Fernando Soley y Beatriz Willink.

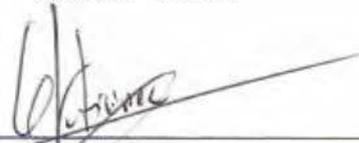
“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Magister Scientiae en Biología.”



Ph. D. José Antonio Vargas Zamora
Representante de la Decana del SEP



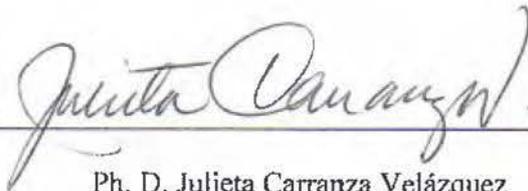
M. Sc. Federico Bolaños Vives
Director de tesis



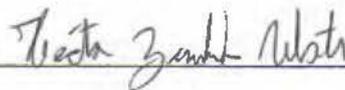
Ph. D. Gustavo Gutiérrez Espeleta
Asesor



Ph. D. Gilbert Barrantes Montero
Asesor



Ph. D. Julieta Carranza Velázquez
Representante del Director del Programa de Posgrado en Biología



Héctor Zumbado Ulate
Candidato

Índice	Página
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	ii
Página de aprobación.....	iv
Lista de cuadros.....	vii
Lista de figuras.....	viii
Prefacio.....	ix
Capítulo 1.....	1
Detección de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en anuros del bosque tropical seco de Costa Rica: evidencias de la existencia de refugios contra la quitridiomycosis.....	2
Introducción.....	3
Materiales y Métodos.....	7
Sitio y especies de estudio.....	7
Toma de muestras en el campo.....	8
Análisis de laboratorio.....	9
Análisis de los datos.....	10
Resultados.....	10
Discusión.....	12
Agradecimientos.....	16
Literatura citada.....	17
Capítulo 2.....	32
Dinámica poblacional y dimorfismo sexual en la rana <i>Craugastor ranoides</i> (Craugastoridae) en el bosque tropical seco de Costa Rica.....	33

Introducción	34
Métodos	36
Sitio de estudio.....	36
Especie de estudio.....	37
Abundancia.....	38
Distribución espacial y uso de hábitat.....	39
Dimorfismo sexual.....	39
Resultados	40
Abundancia.....	40
Distribución espacial y uso de hábitat	41
Dimorfismo sexual.....	41
Discusión	41
Agradecimientos	44
Referencias	44

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Número de muestras por especie, localidad y hábitat, bosque tropical seco, Costa Rica, 2006-2008.....	28
Cuadro 2. <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> . Promedio (\pm desviación estándar) de la cantidad de zoosporas cuantificadas por PCR en tiempo real en las muestras de dos localidades, bosque tropical seco, Costa Rica 2006-2008.....	30
Cuadro 3. <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> . Porcentaje de prevalencia (límite inferior-límite superior) por especie según localidad, bosque tropical seco 2006-2008.....	31
Cuadro 1. Promedio y error estándar de la abundancia por periodo y total de <i>C. ranoides</i> en dos estaciones secas, Península de Santa Elena, 2006-2008.....	51
Cuadro 2. Captura total por edad en cada periodo a lo largo de dos estaciones secas en <i>C. ranoides</i> , Península de Santa Elena, 2006-2008.....	53
Cuadro 3. Valores del índice de dispersión (I) y distribución espacial agregada en <i>C. ranoides</i> durante dos estaciones secas, Península de Santa Elena, 2006-2008.....	55
Cuadro 4. Total de capturas de la especie <i>C. ranoides</i> según sexo, actividad y sustrato, Península de Santa Elena, 2006-2008.....	56
Cuadro 5. Promedio y error estándar, valores mínimos y máximos de tamaño (LHC) y peso en los individuos de <i>C. ranoides</i> , Península de Santa Elena, 2006-2008.....	57

Lista de figuras

Fig. 1. Localidades del bosque tropical seco de Costa Rica dónde se realizó el estudio.....	27
Fig. 2. <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> . Curva estándar utilizada para la cuantificación de muestras del bosque tropical seco de Costa Rica mediante PCR en tiempo real.....	29
Fig. 1. Ubicación geográfica de los tres ríos, Península de Santa Elena, Costa Rica, 2006-2008.....	50
Fig. 2. Promedio y error estándar de la abundancia de <i>C. ranoides</i> en cada río en dos estaciones secas, Península de Santa Elena, 2006-2008.....	52
Fig. 3. Captura total por sexo en adultos de <i>C. ranoides</i> , Península de Santa Elena, 2006-2008.....	54
Fig. 4. Dimorfismo sexual en el diámetro del tímpano en <i>C. ranoides</i> , Península de Santa Elena, 2006-2008.....	57

Prefacio

A partir de los comienzos de la década de 1980, se comenzaron a detectar disminuciones repentinas en las poblaciones de anfibios a nivel mundial (Young *et al.* 2001). Muchas poblaciones de anfibios dejaron de observarse incluso en sitios no alterados (Crump *et al.* 1992, Fellers y Drost 1993, Young *et al.* 2001, Lips *et al.* 2003b). Según Young y colaboradores (2001), hay al menos siete posibles agentes causales de las disminuciones. Éstos son la destrucción y fragmentación del hábitat (Blaustein *et al.* 1994, Nyström *et al.* 2007), las enfermedades y parásitos (Kiesecker y Blaustein 1995, Berger *et al.* 1998, Daszak *et al.* 1999, Jancovich *et al.* 2003), el cambio climático global (Beebee 1995, Parmesan 1996, Pounds *et al.* 1999, Blaustein *et al.* 2001, Carey *et al.* 2001, Jones *et al.* 2001, Pounds 2001, Carey y Alexander 2003), la contaminación (Meteyer 1997, Davidson *et al.* 2001, Hayes *et al.* 2002), la introducción de especies exóticas (Bradford 1989, Hayes y Jennings 1986), el comercio de anfibios (Gorzula 1996, Schlaepfer *et al.* 2005) y el sinergismo o interacción de múltiples causas (Kiesecker *et al.* 2001, Kiesecker 2002, Pounds *et al.* 2006).

En hábitats protegidos, la mayoría de disminuciones ocurrieron en tierras altas (Lips 1998, 1999, Young *et al.* 2001, Lips *et al.* 2003a). Al parecer en estas zonas las especies asociadas a ríos parecen ser más afectadas (Young *et al.* 2001, Lips *et al.* 2003b, 2006, Woodhams y Alford 2005, Whiles *et al.* 2006, Skerrat *et al.* 2007). En Latinoamérica las principales disminuciones han ocurrido en las especies del género *Atelopus* (Bufonidae) (La Marca *et al.* 2005), las del grupo *Craugastor rugulosus* (Craugastoridae) (Campbell 1998, Lips *et al.* 2003b; Puschendorf *et al.* 2006b, 2009; Ryan *et al.* 2008, McCranie y Wilson 2002) y las del grupo *Craugastor milesi* (Craugastoridae) (McCranie y Wilson 2002).

La mayoría de extinciones en hábitats protegidos han sido asociadas con la quitridiomycosis (Berger *et al.* 1998). Esta enfermedad de reciente emersión es producida por el hongo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* (Longcore *et al.* 1999) y ha sido reportada en poblaciones nativas de salamandras y anuros en África (Weldon y du Preez 2004), América (Berger *et al.* 1998, Ron y Merino 2000, Bradley *et al.* 2002, Bonaccorso *et al.* 2003, Lips *et al.* 2003a, 2003b, Puschendorf *et al.* 2006b), Europa (Mutschmann *et al.* 2000, Bosch *et al.* 2001, Garner *et al.* 2005) y Oceanía (Berger *et al.* 1998, Waldman *et al.* 2001).

B. dendrobatidis es un saprófito degradador de queratina. Presenta esporas flageladas y acuáticas que germinan produciendo esporangios sobre los estratos epiteliales superiores y queratinizados de la piel de los anfibios adultos. En larvas se presenta solamente en las partes bucales queratinizadas (Berger *et al.* 1998). Los brotes se caracterizan generalmente por la muerte simultánea de individuos de varias especies en las zonas afectadas (Lips *et al.* 2006). Los síntomas son letargo, pérdida del apetito, decoloración de la piel, pérdida irregular de células, erosiones y engrosamiento anormal del estrato córneo (hiperqueratosis) y de la piel (hiperplasia). Además, exhiben comportamientos inusuales como el colocarse en sitios abiertos con alta exposición al calor (Berger *et al.* 1998).

La detección de la quitridiomycosis se realiza a través de histología (Pessier *et al.* 1999, Longcore *et al.* 1999, Puschendorf y Bolaños 2006), análisis histoquímico (Berger *et al.* 2002, Van Ells *et al.* 2003) y por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Annis *et al.* 2004, Boyle *et al.* 2004). El análisis por PCR en tiempo real presenta una mayor sensibilidad y especificidad (Boyle *et al.* 2004).

En condiciones de laboratorio, este hongo es muy susceptible a las temperaturas mayores a 30°C y a la desecación (Longcore *et al.* 1999, Bradley *et al.* 2002, Johnson y Speare 2003, Berger *et al.* 2004, Piotrowski *et al.* 2004). En condiciones naturales se sugiere que las variaciones estacionales y geográficas que producen variaciones en la temperatura y la humedad controlan la prevalencia del hongo y la aparición de brotes (Retallick *et al.* 2004, Woodhams y Alford 2005, Kriger *et al.* 2007). Durante los periodos de contagio e infección que afectan a múltiples especies se han observado poblaciones que disminuyen y otras que permanecen estables (Williams y Hero 1998, Lips 1999). Además, hay especies que parecen no ser afectadas por la enfermedad y otras capaces de coexistir con el patógeno a pesar de contagiarse fácilmente (Retallick *et al.* 2004). Este diferente patrón de respuesta ante la enfermedad podría deberse a diferencias en los péptidos de la piel (Rollins-Smith *et al.* 2006) o en el comportamiento (Woodhams *et al.* 2003).

El origen de esta enfermedad se atribuye a una introducción global del hongo o a que éste es un organismo endémico que incrementa su virulencia en respuesta a cambios climáticos (Rachowicz *et al.* 2005). Los defensores de la hipótesis de introducción global afirman que el hongo una vez que es introducido en un nuevo ecosistema se mueve en forma de onda con una dirección definida (Laurance *et al.* 1996, Lips *et al.* 2006, 2008). Las posibles formas de introducción han sido principalmente por comercio de especies (Waldman *et al.* 2001, Mazzoni *et al.* 2003, Cunningham *et al.* 2003, Daszak *et al.* 2003, 2004, Weldon *et al.* 2004, Fisher y Garner 2007). Quienes aceptan la hipótesis que *B. dendroatis* es endémico, opinan que los cambios climáticos, especialmente el calentamiento global, producen temperaturas óptimas para la reproducción del hongo (Pounds *et al.* 2006, Alford *et al.* 2007, Bosch *et al.* 2007).

En algunos sitios, que podrían definirse como refugios contra la quitridiomycosis (Puschendorf *et al.* 2005, 2009) se han reportado poblaciones estables de especies cuyas poblaciones han disminuido drásticamente en otras regiones. Al parecer, en estos refugios las condiciones climáticas disminuyen la tasa de crecimiento, dispersión y reproducción del hongo. Por lo tanto, independientemente del origen del patógeno, estos sitios son definidos por la interacción climática con el patógeno (Puschendorf *et al.* 2009).

En Costa Rica se ha detectado a *Batrachochytrium dendrobatidis* en once especies pertenecientes a cinco familias (Lips *et al.* 2003a, Puschendorf 2003, Puschendorf *et al.* 2006a, 2009). La mayoría de las disminuciones poblacionales y extinciones en zonas altas (Pounds y Crump 1994, Bolaños y Ehmcke 1996, Lips 1998) han sido relacionadas directa o indirectamente con esta enfermedad (Lips *et al.* 2003a, 2006, 2008, Pounds *et al.* 2006, Puschendorf *et al.* 2006a). Sin embargo, también se ha asociado a disminuciones en zonas bajas y húmedas. Puschendorf y colaboradores (2006a) detectaron a *B. dendrobatidis* en Costa Rica mediante histología, cuando se revisaron ejemplares recolectados en 1986 en el transecto altitudinal La Selva-Volcán Barva. Esto ocurrió anterior a la disminución o desaparición de varias especies en esa zona. En dicho estudio, se registraron 9 especies afectadas desde los 100 a los 2600 metros de altitud. Whitfield y colaboradores (2007) reportan una menor abundancia de anfibios en la hojarasca de la Estación Biológica La Selva, esto al comparar sus resultados con los datos de antiguos estudios realizados en el mismo sitio.

El grupo *Craugastor rugulosus* comprende 33 especies que se distribuyen desde México hasta Panamá (Campbell y Savage 2000, Hedges *et al.* 2008). Son de hábitos nocturnos y asociadas a ríos. La historia natural y biología reproductiva de la mayoría

de especies es desconocida (Savage 2002) y su conocimiento es importante para el manejo in situ y ex situ. Las poblaciones de la mayor parte de las especies han disminuido debido a múltiples causas y se considera a algunas especies probablemente extintas (Campbell 1998, Pounds 2001, McCranie y Wilson 2002, Lips *et al.* 2003a, 2004, 2006, Bolaños *et al.* 2008, Ryan *et al.* 2008). En Costa Rica se reportan ocho especies (Campbell y Savage 2000) de las cuáles únicamente la especie *Craugastor ranoides* se ha observado en los últimos veinte años.

La especie *C. ranoides* tenía una amplia distribución en las zonas bajas y altas de Costa Rica, sin embargo hoy únicamente se le conoce en la Península de Santa Elena (Sasa y Solórzano 1995, Puschendorf *et al.* 2005, 2009, Zumbado-Ulate *et al.* 2007) por lo que es catalogada en peligro crítico (UICN 2009). Las causas de su desaparición son desconocidas, pero podría deberse a la quitridiomycosis debido que otras especies del grupo *C. rugulosus* se han visto afectadas por este hongo (Puschendorf *et al.* 2006b, Ryan *et al.* 2008). Se desconoce su biología reproductiva y dinámica poblacional y las principales observaciones de su historia natural son presentadas por Savage (2002).

La Península de Santa Elena presenta un bosque tropical seco y es la región más seca del país (Janzen 1998). Debido a la persistencia de *C. ranoides*, es considerada un refugio contra la quitridiomycosis (Puschendorf *et al.* 2005, 2009). Según algunos modelos (Ron 2005, Puschendorf *et al.* 2009), la probabilidad de encontrar a *B. dendrobatidis* en esta región es muy baja debido a las condiciones climáticas extremas, por lo que de estar en esta zona probablemente se encuentre en una prevalencia baja y posiblemente sin causar la enfermedad.

Bibliografia

- Alford, R.A., K.S. Bradfield & S.J. Richards. 2007. Global warming and amphibian losses. *Nature* 447:E3-E4
- Annis, S.L., F.P. Dastoor, H. Zleil, P. Daszak & J.E. Longcore. 2004. A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *J. Wildl. Dis.* 40: 420–428.
- Beebee, T.J.C. 1995. Amphibian breeding and climate. *Nature* 374: 219-220.
- Berger, L., R. Speare, P. Daszak, D.E. Green, A.A. Cunningham, R. Slocombe, C.L. Goggin, A. Hyatt, K.R. MacDonald, H.B. Hines, K.R. Lips, G. Marantelli & H.H. Parkes. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rainforest of Australia and Central America. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9031-9036.
- Berger, L., V. Olsen, S.G. Hengstberger, D. Boyle, G. Marantelli, K. Humphreys & J.E. Longcore. 2002. Production of polyclonal antibodies to *Batrachochytrium dendrobatidis* and their use in an immunoperoxidase test for chytridiomycosis in amphibians. *Dis. Aquat. Organ.* 48: 213-220.
- Berger, L., R. Speare, H.B. Hines, G. Marantelli, A.D. Hyatt, K.R. McDonald, L.F. Skerratt, V. Olsen, J.M. Clarke, G. Gillespie, M. Mahony, N. Sheppard, C. Williams & M.J. Tyler. 2004. Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Australian Vet. J.* 82:434–439.
- Blaustein, A.R., D.B. Wake & W.P. Sousa. 1994. Amphibian declines: judging stability, persistence and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conserv. Biol.* 8: 60-71.

- Blaustein, A.R., L. Belden, D. Olson, D. Green, T. Root & J.M. Kiesecker. 2001. Amphibian breeding and climate change. *Conserv. Biol.* 15: 1804-1809.
- Bolaños, F. & J. Ehmcke. 1996. Anfibios y reptiles de la Reserva Biológica de San Ramón, Costa Rica. *Revista Pensamiento Actual* 2: 107-112.
- Bolaños, F., F. Castro, C. Cortez, I. De la Riva, T. Grant, B. Hedges, R. Heyer, R. Ibáñez, E. La Marca, E. Lavilla, D. Leite-Silvano, S. Löters, G. Parra-Olea, S. Reichle, R. Reynolds, L. Rodríguez, G. Santos-Barrera, N. Scout, C. Ubeda, A. Veloso, M. Wilkinson & B. Young. 2008. Amphibians of the Neotropical realm, pp. 92-99. *In*: S.N. Stuart, M. Hoffmann, J.S. Chanson, N.A Cox, R.J. Berridge, P. Ramani & B.E Young (eds.). *Threatened Amphibians of the World*. Linx, Nueva York.
- Bonaccorso, E., J.M. Guayasamin, D. Méndez & R. Speare. 2003. Chytridiomycosis in a Venezuelan amphibian (Bufonidae: *Atelopus cruciger*). *Herpetol. Rev.* 34: 331-334.
- Bosch, J., I. Martínez-Solano & M. García-Paris. 2001. Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biol. Conserv.* 97: 331-7.
- Bosch, J., L.M. Carrascal, L. Durán, S. Walker & M.C. Fisher. 2007. Climate change and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of Central Spain; is there a link? *Proc. R. Soc. B.* 274:253-260.
- Boyle, D.G., D.B. Boyle, V. Olsen, J.A.T. Morgan y A.D. Hyatt. 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis. Aquat. Organ.* 60: 141-148.

- Bradford, D.F. 1989. Allopatric distribution of native frogs and introduced fishes in high Sierra Nevada lakes of California: implications of the negative effect of fishes introductions. *Copeia* 1989: 775-778.
- Bradley, G.A., P.C. Rosen, M.J. Sredl, T.R. Jones & J.E. Longcore. 2002. Chytridiomycosis in native Arizona frogs. *J. Wildl. Dis.* 38: 206-212.
- Campbell, J.A. 1998. The Amphibians and Reptiles of Northern Guatemala, Yucatán, and Belize. Universidad de Oklahoma, Oklahoma. 400 p.
- Campbell, J.A. & J. M. Savage. 2000. Taxonomic reconsideration of Middle American frogs of the *Eleutherodactylus rugulosus* group (Anura: Leptodactylidae): a reconnaissance of subtle nuances among frogs. *Herpetol. Monographs* 14: 186-292.
- Carey, C. & M. Alexander. 2003. Climate change and amphibian declines: is there a link? *Div. Distrib.* 9: 111-121.
- Carey, C., W.R. Heyer, J. Wilkinson, R.A. Alford, J.W. Arntzen, T. Halliday, L. Hungenford, K.R. Lips, E.M. Middleton, S.A. Orchard & A.S. Rand. 2001. Amphibian declines and environmental change: an overview. *Conserv. Biol.* 15: 903-913.
- Crump, M.L., F.R. Hensley & K.L. Clark. 1992. Apparent decline of the Golden Toad: Underground or extinct? *Copeia* 1992: 413-420.
- Cunningham, A.A., P. Daszak & J.P. Rodriguez. 2003. Pathogen pollution: defining a parasitological threat to biodiversity conservation. *J. Paras.* 89: S78-S83.
- Daszak, P., L. Berger, A.A. Cunningham, A.D. Hyatt, D.E. Green & R. Speare. 1999. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infect. Dis.* 5: 735-748.

- Daszak, P., A.A. Cunningham & A.D. Hyatt. 2003. Infectious disease and amphibian population declines. *Div. Distrib.* 9: 141-150.
- Daszak, P., A. Strieby, A.A. Cunningham, J.E. Longcore, C.C. Brown & D. Porter. 2004. Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetol. J.* 14: 201-207.
- Davidson, C., H.B. Shaffer & M.R. Jennings. 2001. Declines of the California red-legged frog: climate, uv-b, habitat, and pesticides hypotheses. *Ecol. Appl.* 11: 464-479.
- Fellers, G.M. & C.A Drost. 1993. Disappearance of the cascades frog *Rana cascadae* at the southern end of its range, California, USA. *Biol. Conserv.* 65 177-181.
- Fisher, M.C. & T.W.J Garner. 2007. The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biol. Rev.* 21: 2-9.
- Garner, T.W.J., S. Walker, J. Bosch, A.D. Hyatt, A.A. Cunningham & M. Fisher. 2005. Chytrid in Europe. *Emerging Infect. Dis.* 11: 1639-1641.
- Gorzula, S. 1996. The trade in dendrobatid frogs from 1987 to 1993. *Herpetol. Rev.* 27: 116-123.
- Hayes, M.P. & M.R. Jennings. 1986. Decline of ranid species in western North America: are bullfrogs responsible?. *J. Herpetol.* 20: 490-509.
- Hayes, T., A. Collins, M. Lee, M. Mendoza, N. Noriega, A.A. Stuart & A. Vonk. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 476-480.

- Hedges, S.B, W.E. Duellman & M.P Heinicke. 2008. New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): Molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa* 1737, 1-182.
- Jancovich, J.K., J. Mao, V.G. Chinchir, C. Wyatt, S.T. Case, S. Kumar, G. Valente, S. Subramanian, E.W. Davidson, J.P. Collins & B.L. Jacobsa. 2003. Genomic sequence of a ranavirus (Family Iridoviridae) associated with salamander mortalities in North America. *Virology* 316: 90-103.
- Janzen, D.H. 1998. Conservation analysis of the Santa Elena property, Peninsula Santa Elena, northwestern Costa Rica. Report to the Government of Costa Rica. Area de Conservación Guanacaste, Liberia, Costa Rica. 135 p.
- Johnson, M.L. & R. Speare. 2003. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and disease control implications. *Emerging Infect. Dis.* 9: 922-925.
- Jones, P.D., T.J. Osborn & K.R. Briffa. 2001. The evolution of climate over the last millennium. *Science* 292: 664-667.
- Kiesecker, J.M. 2002. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 9900-9904.
- Kiesecker, J.M. & A.R. Blaustein. 1995. Synergism between UV-B radiation and a pathogen magnifies amphibian embryo mortality in nature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11049-11052.
- Kiesecker, J.M., A.R. Blaustein & L.K. Belden. 2001. Complex causes of amphibian population declines. *Nature* 410: 681-684.

- Kriger K.M., F. Pereoglou & J.M Hero. 2007. Large-scale seasonal variation in the prevalence and severity of chytridiomycosis. *Conserv. Biol.* 5: 1280-1290.
- La Marca, E., K.R. Lips, S. Lötters, R. Puschendorf, R. Ibáñez, J.V. Rueda-Almonacid, R. Schulte, C. Marty, F. Castro, J. Manzanilla-Puppo, J.E. García Pérez, F. Bolaños, G. Chaves, J.A. Pounds, E. Toral & B.E. Young. 2005. Catastrophic population declines in neotropical harlequin frogs (Bufonidae: *Atelopus*). *Biotropica* 37: 190-201.
- Laurance W.F., K.R. McDonald, R. Speare. 1996. Epidemic disease and the catastrophic decline of Australian rain forest frogs. *Conserv. Biol.* 10:406-413
- Lips, K.R. 1998. Decline of a tropical montane amphibian fauna. *Conserv. Biol.* 12: 106-117.
- Lips, K.R. 1999. Mass mortality of the anuran fauna at an upland site in Panama. *Conserv. Biol.* 13: 117-125.
- Lips, K.R., D.E. Green & R. Papendick. 2003a. Chytridiomycosis in wild frogs from southern Costa Rica. *J. Herpetol.* 37: 215-218.
- Lips, K.R., D. Reeve & L.R. Witters. 2003b. Ecological traits predicting amphibian population declines in Central America. *Conserv. Biol.* 17: 1078-1088.
- Lips, K.R., J.R Mendelson III, A. Muñoz-Alonso, L. Canseco-Marquez, D.G. Mulcahy. 2004. Direct evidence of declines in amphibian populations in montane southern Mexico. *Biol. Conserv.* 119: 555-564.
- Lips, K.R., F. Brem, R. Brenes, J.D. Reeve, R.A. Alford, J. Voyles, C. Carey, L. Livo, A.P. Pessier & J.P. Collins. 2006. Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (9): 3165-3170.

- Lips, K.R., J. Diffendorf, J.R. Mendelson III & M.W. Sears. 2008. Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLOS Biology* 6: 441–453.
- Longcore, J.E., A.P. Pessier & D.K. Nichols. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91: 219-227.
- Mazzoni, R., A.A. Cunningham, P. Daszak, A. Apolo, E. Perdomo & G. Speranza. 2003. Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. *Emerging Infect. Dis.* 9: 995-998.
- McCranie, J.R. & L.D. Wilson. 2002. The Amphibians of Honduras. Sociedad para el Estudio de Anfibios y Reptiles, Ithaca, Nueva York. 625 p.
- Meteyer, C.U. 1997. Frog Malformations. USGS. EEUU. 1p.
- Mutschmann, F., L. Berger, P. Zwart & C. Gaedicke. 2000. Chytridiomycosis in amphibians-first report in Europe. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 113: 380-383.
- Nyström, P., J. Hansson, J. Månsson, M. Sundstedt, C. Reslow & A. Broström. 2007. A documented amphibian decline over 40 years: Possible causes and implications for species recovery. *Biol. Conserv.* 138: 399-411.
- Parmesan, C. 1996. Climate and species range. *Nature* 382: 765–766.
- Pessier A.P., D.K. Nichols, J.E. Longcore & M.S. Fuller. 1999. Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates spp.*) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 194–199.
- Piotrowski, J.S., S.L. Annis & J.E. Longcore. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96:9-15.
- Pounds, J.A. 2001. Climate and amphibian declines. *Nature* 410: 639-640.

- Pounds, J.A. & M.L. Crump. 1994. Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Conserv. Biol.* 8: 72-85.
- Pounds, J.A., M.P.L. Fogden & J.H. Campbell. 1999. Biological response to climate change on a tropical mountain. *Nature* 398: 611-615.
- Pounds, J.A., M.R. Bustamante, L.A. Coloma, J.A. Consuegra, M.P.L. Fogden, P.N. Foster, E. La Marca, K.L. Masters, A. Merino-Viteri, R. Puschendorf, S.R. Ron, G.A. Sánchez-Azofeifa, C.J. Still & B.E. Young. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 439: 161-167.
- Puschendorf, R. 2003. *Atelopus varius* (harlequin frog) fungal infection. *Herpetol. Rev.* 34: 355.
- Puschendorf, R. & F. Bolaños. 2006. Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Eleutherodactylus fitzingeri*: effects of skin sample location and histological stain. *J. Wildl. Dis.* 42: 301-305.
- Puschendorf, R., G. Chaves, A.J. Crawford & D.R. Brooks. 2005. *Eleutherodactylus ranoides*. Dry forest population, refuge from decline? *Herpetol. Rev.* 36: 53.
- Puschendorf, R., F. Bolaños & G. Chaves. 2006a. The amphibian chytrid fungus along an altitudinal transect before the first reported declines in Costa Rica. *Biol. Conserv.* 132: 136-142.
- Puschendorf, R., F. Castañeda & J. R. McCranie. 2006b. Chytridiomycosis in wild frogs from Pico Bonito National Park, Honduras. *EcoHealth* 3:178-181.
- Puschendorf, R., A.C. Carnaval, J. VanDerWal, H. Zumbado-Ulate, G. Chaves, F. Bolaños & R.A. Alford. 2009. Distribution models for the amphibian chytrid

- Batrachochytrium dendrobatidis* in Costa Rica: proposing climatic refuges as a conservation tool. *Div. Distrib.* 15: 401-408.
- Rachowicz, L.J., J.M. Hero, R.A. Alford, J.W. Taylor, J.A.T. Morgan, V.T. Vredenburg, J.P. Collins & C.J. Briggs. 2005. The novel and endemic pathogen hypotheses: competing explanations for the origin of emerging infectious disease of wildlife. *Conserv Biol* 19:1441-1448.
- Retallick, R.W.R., H. McCallum & R. Speare. 2004. Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community post-decline. *PLOS Biology* 2: 1965–1971.
- Rollins-Smith, L.A., C. Carey, J.M. Conlon, L.K. Reinert, J.K. Doersam, T. Bergman, J. Silberring, H. Lankinen & D. Wade. 2003. Activities of temporin family peptides against the chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) associated with global amphibian declines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 1157–1160.
- Ron, S.R. 2005. Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica* 37: 209–221.
- Ron, S.R. & A. Merino. 2000. Declinación de anfibios del Ecuador: Información general y primer reporte de chytridiomycosis para Sudamérica. *Froglog* 42:2.
- Ryan, M.J., K.R. Lips & M.W. Eichholz. 2008. Decline and extirpation of an endangered Panamanian stream frog population (*Craugastor punctariolus*) due to an outbreak of chytridiomycosis. *Biol. Conserv.* 141: 1636-1647.
- Sasa, M. & A. Solórzano. 1995. The reptiles and amphibians of Santa Rosa National Park, Costa Rica, with comments about the herpetofauna of xerophytic areas. *Herp. Nat. Hist.* 3: 113-126.

- Savage, J.M. 2002. The Amphibians and Reptiles of Costa Rica: a Herpetofauna Between Two Continents, Between Two Seas. Universidad de Chicago, Chicago. 934p.
- Schlaepfer, M.A., C. Hoover & C.K. Dodd Jr. 2005. Challenges in evaluating the impact of the trade in amphibians and reptiles on wild populations. *BioScience* 55: 256-264.
- Skerratt, L.F., L. Berger, R. Speare, S. Cashins, K.R. McDonald, A.D. Phillott, H.B. Hines & N. Kenyon. 2007. Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth* 4:125-134.
- UICN, 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1. Consultado 16 julio 2009 www.iucnredlist.org
- Van Ells, T., J. Stanton, A. Strieby, P. Daszak, A.D. Hyatt & C.C. Brown. 2003. The use of immunohistochemistry to diagnose chytridiomycosis in dyeing poison dart frogs (*Dendrobates tinctorius*). *J. Wildl. Dis.* 39: 742-745.
- Waldman, B., K.E. Van de Wolfshaar, J.D. Klena, V. Andjic, P.J. Bishop, R.J. Norman & B. Norman. 2001. Chytridiomycosis in New Zealand frogs. *Surveillance* 28: 9-11.
- Weldon, C. & L. H. du Preez. 2004. Decline of the Kihansi spray toad, *Nectophrynoides asperginis*, from the Udzungwa mountains, Tanzania. *Froglog* 62: 2-3.
- Weldon, K.M., L.H du Preez, A.D. Hyatt, R. Muller & R. Speare. 2004. Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infect. Dis.* 10: 2100-2105.
- Whiles, M.R., K.R. Lips, C.M. Pringle, S.S. Kilham, R.J. Bixby, R. Brenes, S. Connelly, J.C Colón-Gaud, M. Hunte-Brown, A.D. Huryn, C. Montgomery & S.

- Peterson. 2006. The effects of amphibian population declines on the structure and function of Neotropical stream ecosystems. *Front. Ecol. Environ.* 4: 27-34.
- Whitfield, S.M., K.E. Bell, T. Philippi, M. Sasa, F. Bolaños, G. Chaves, J.M. Savage & M.A. Donnelly. 2007. Amphibian and reptile declines over 35 years at La Selva, Costa Rica. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 8201-8202.
- Williams, S.E. & J.M. Hero. 1998. Rainforest frogs of the Australian wet tropics: guild classifications and the ecological similarity of declining species. *Proceedings of the Royal Society of London, Serie B* 265: 597-602.
- Woodhams, D.C. & R.A Alford. 2005. Ecology of chytridiomycosis in rainforest stream frog assemblages of tropical Queensland. *Conserv Biol* 19: 1449–1459.
- Woodhams, D.C., R.A. Alford & G. Marantelli. 2003. Emerging diseases of amphibian cured by elevated body temperature. *Dis. Aquat. Organ.* 55: 65-67.
- Young, B., K. Lips, J. Reaser, R. Ibáñez, A. Salas, R. Cedeño, L. Coloma, S. Ron, E. La Marca, J. Meyer, A. Muñoz, F. Bolaños, G. Chaves & D. Romo. 2001. Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conserv. Biol.* 15: 1213-1223.
- Zumbado-Ulate, H., R. Puschendorf & M.M Chavarría. 2007. *Eleutherodactylus ranoides* (NCN) Distribution. *Herpetol. Rev.* 38: 184–185.

En formato de artículo científico para ser sometido a la Revista Diseases of Aquatic Organisms.

Detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anuros del bosque tropical seco de Costa Rica: evidencias de la existencia de refugios contra la quitridiomycosis.

Héctor Zumbado Ulate

Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San Pedro-San José, Costa Rica.

Dirección de correspondencia: Escuela de Biología, Sistema de Estudios de Posgrado, Universidad de Costa Rica, San Pedro-San José, Costa Rica. Tel.: (506) 22533194

Dirección electrónica: hugozul@yahoo.com

RESUMEN: La quitridiomycosis es una enfermedad letal para muchos anfibios producida por el hongo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis*. Este patógeno está distribuido ampliamente en Costa Rica, sin embargo antes de este estudio no se había encontrado en el bosque tropical seco. En Costa Rica la extinción de varias especies en zonas altas ha sido atribuida a esta enfermedad. Se cree que está asociado con la disminución de poblaciones del género *Atelopus* y del grupo *Craugastor rugulosus*, tanto en zonas bajas como en zonas altas del país. La especie *Craugastor ranoides*, perteneciente al grupo *C. rugulosus* dejó de verse en casi todo el país, pero persiste en el bosque seco de Costa Rica lo que sugiere que este lugar podría ser un refugio contra la quitridiomycosis. Se detectó a *B. dendrobatidis* en cuatro especies en dos localidades del bosque tropical seco mediante PCR en tiempo real. En ambos sitios se cuantificaron cantidades muy bajas de zoosporas. La Península de Santa

Elena presentó menos especies afectadas, menos casos y menores prevalencias probablemente por ser un sitio más seco que Santa Rosa. La cantidad de esporas de *B. dendrobatidis* y su virulencia parecen estar relacionadas de manera sinérgica con factores como la especie del anfibio, la estacionalidad, la ubicación geográfica y el clima; de manera que solo bajo cierta combinación de condiciones el hongo llega a ser letal. En este sentido, la temperatura y principalmente la humedad ambiental parecen estar más involucradas con el crecimiento y la dispersión del hongo.

Palabras clave: *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Craugastor ranoides*, disminución de poblaciones de anfibios, grupo *Craugastor rugulosus*, quitridiomycosis, refugios

INTRODUCCIÓN

La quitridiomycosis (Berger et al. 1998) es una enfermedad clasificada como de reciente emersión (Daszak et al. 1999, 2003) y es producida por el hongo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* (Longcore et al. 1999). Esta enfermedad ha sido reportada en una gran cantidad de especies en cinco continentes (Berger et al. 1998, Mutschmann et al. 2000, Ron y Merino 2000, Bosch et al. 2001, Waldman et al. 2001, Bradley et al. 2002, Bonaccorso et al. 2003, Lips et al. 2003a, Puschendorf 2003, Ron et al. 2003, Weldon & du Preez 2004, Garner et al. 2005). Este hongo degrada la queratina de la piel de los anfibios causando hiperqueratosis e hiperplasia debido al daño provocado sobre los estratos córneo y granuloso (Berger et al. 1998).

Se ha sugerido que las variaciones estacionales y geográficas que producen variaciones en la temperatura y la humedad afectan la prevalencia del hongo y la aparición

de brotes (Retallick et al. 2004, Woodhams & Alford 2005, Kriger et al. 2006a). Se ha demostrado en cultivos de laboratorio como estos factores influyen en el crecimiento y la supervivencia del hongo (Longcore et al. 1999, Bradley et al. 2002, Berger et al. 2004, Piotrowski et al. 2004). Longcore et al. (1999) indican que en condiciones controladas este hongo tolera un ámbito de temperatura entre los 4 y 28°C con un óptimo de 23°C. A temperaturas mayores a 29° C el hongo muere. En relación a la humedad, se ha indicado que en condiciones más húmedas *Batrachochytrium dendrobatidis* es más letal (Piotrowski et al. 2004) y no sobrevive a la desecación (Johnson y Speare 2003).

El origen de esta enfermedad se atribuye a una introducción global del hongo o a que éste es un organismo endémico que incrementó su virulencia en respuesta a cambios climáticos (Rachowicz et al. 2005); sin embargo, ambas hipótesis no son necesariamente excluyentes. La primera hipótesis sugiere la idea de que *Batrachochytrium dendrobatidis* es un patógeno introducido en la mayor parte del mundo (Daszak et al. 2003), posterior a esa introducción, el patógeno se ha dispersado en forma de una onda con una dirección definida (Laurance et al. 1996, Lips et al. 2006, 2008). La baja diversidad genética encontrada en varias cepas de *B. dendrobatidis* (Morehouse et al. 2003) y la posibilidad de introducción mediante comercio y cultivo de anfibios son argumentos utilizados para defender esta hipótesis (Waldman et al. 2001, Mazzoni et al. 2003, Cunningham et al. 2003, Daszak et al. 2003, 2004, Weldon et al. 2004, Fisher & Garner 2007). La otra hipótesis establece que debido al cambio climático global se producen cambios en los patrones climáticos, de manera que el hongo encuentra condiciones óptimas para crecer y dispersarse. Esa suposición se basa principalmente en el efecto sinérgico que puede ocurrir con otra causa que se ve favorecida por el cambio en el clima (Blaustein et al. 1994, Kiesecker et al.

2001). Pounds et al. (2006) proponen la hipótesis llamada epidemia ligada al clima para explicar como *B. dendrobatidis* produjo la disminución de las especies de *Atelopus* en tierras altas.

La sensibilidad que presenta el hongo en cultivos de laboratorio a condiciones ambientales como la temperatura y la humedad (Longcore et al. 1999, Berger et al. 2004, Piotrowski et al. 2004, Woodhams et al. 2003, 2008), que hacen que su crecimiento y dispersión aumente o disminuya, son importantes razones para los defensores de esta hipótesis. Así mismo, en algunas zonas geográficas en las que hay variaciones climáticas y estacionales marcadas, se han reportado extinciones y disminuciones en algunas poblaciones, mientras que otras poblaciones han logrado persistir a pesar de estar infectadas con el patógeno (Retallick et al. 2004, Woodhams & Alford 2005, Kriger & Hero 2006, Murray et al. 2009). Otro argumento son las correlaciones encontradas entre años de extinciones múltiples y periodos de calentamiento (Pounds & Crump 1994, Pounds et al. 1997, 1999, Pounds 2001, Carey & Alexander 2003, Alford et al. 2007, Bosch et al. 2007).

La mayoría de especies con disminuciones provocadas por la quitridiomycosis se asocian con elevaciones altas (Lips 1998, 1999, Young et al. 2001, Lips et al. 2003a). Aquí, las poblaciones asociadas a ríos parecen ser más susceptibles (Young et al. 2001, Lips et al. 2003b, Woodhams & Alford 2005, Lips et al. 2006, Whiles et al. 2006, Skerratt et al. 2007). Entre estos, los casos en América de especies del género *Atelopus* (Bufonidae) (La Marca et al. 2005) y las del grupo *Craugastor rugulosus* (Craugastoridae) (Lips et al. 2003b, Puschendorf et al. 2006b, Ryan et al. 2008), las cuales presentan gran cantidad de poblaciones extintas y otras en riesgo crítico (UICN 2009).

En Costa Rica se ha detectado a *Batrachochytrium dendrobatidis* en once especies pertenecientes a cinco familias (Lips et al. 2003a, Puschendorf 2003, Puschendorf et al. 2006a, 2009). Este patógeno se encuentra ampliamente distribuido en zonas bajas y altas; sin embargo, su asociación con la extinción de anfibios se reporta solo en zonas altas (Lips et al. 2003a, Pounds et al. 2006, Puschendorf et al. 2006a). Se ha sugerido que las extinciones del sapo dorado y de la rana arlequín de Monteverde (Pounds & Crump 1994, Puschendorf 2003, Pounds et al. 2006, Puschendorf et al. 2006a) así como varias poblaciones de anfibios en tierras altas de la zona sur de Costa Rica están asociadas con la quitridiomycosis (Lips et al. 2003a). Pounds et al. (2006) afirman que el calentamiento que ocurrió en Monteverde en los años 80 produjo que el hongo encontrara un óptimo ambiental para reproducirse. Lips et al. (2006, 2008) afirman que el hongo es introducido y altamente virulento en zonas altas y que se dispersa en forma de onda, desde Costa Rica hasta Panamá en dirección oeste-sureste.

Craugastor ranoides (Cope), pertenece al grupo *C. rugulosus* (Campbell & Savage 2000, Savage 2002). Fue una especie abundante en zonas bajas y altas de Costa Rica, tanto en la vertiente Pacífica como Atlántica. Con excepción de las poblaciones del bosque tropical seco, ubicadas en la Península de Santa Elena (Sasa & Solórzano 1995, Puschendorf et al. 2005, Zumbado-Ulate et al. 2007) todas las demás poblaciones parecen haber desaparecido debido a causas desconocidas (F. Bolaños com. pers.). Precisamente en la Península de Santa Elena hay nuevos registros de poblaciones en los últimos años (Zumbado-Ulate et al. 2007). Varias poblaciones de especies del grupo *C. rugulosus* han desaparecido debido a la quitridiomycosis en zonas altas (Ryan et al. 2008); sin embargo, si

la extinción de las poblaciones de *C. ranoïdes* está asociada con la quitridiomycosis se demostraría que incluso en zonas bajas esta enfermedad puede ser letal.

Puschendorf et al. (2009) señalan que la probabilidad de encontrar el quitridio en el bosque seco de Costa Rica es muy baja, pero que de estar presente su abundancia debería ser muy baja debido a las condiciones de alta temperatura y baja humedad que restringen el crecimiento y la dispersión del hongo, lo que hace de este sitio un refugio contra la quitridiomycosis (Puschendorf et al. 2005). El objetivo de este estudio fue demostrar si la existencia de un refugio contra la quitridiomycosis propuesto por Puschendorf et al. (2009) se cumplía para el bosque tropical seco, en especial para la Península de Santa Elena. De esta forma, se esperaba que el hongo estuviera presente en el sitio en prevalencias muy bajas y sin causar la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio y especies de estudio. La investigación se realizó en dos localidades del Área de Conservación Guanacaste (ACG), provincia de Guanacaste, en la región noroeste de la costa del Pacífico, Costa Rica (Fig.1). El primer sitio fue el Sector Murciélagos (SM) (10° 54' N 85° 43' O) localizado en la Península de Santa Elena (Janzen 1998). El segundo sitio correspondió al Sector Santa Rosa (SSR) (10° 50' N 85° 37' O), 15 km al sureste de la Península de Santa Elena.

Ambos sitios tienen un clima estacional bien marcado, con una estación seca que comprende de diciembre a abril y una estación lluviosa de mayo a noviembre. Se encuentra un bosque tropical seco, semideciduo, con dos estratos de bosque (Hartshorn 1983). La temperatura promedio es de 25°C y la precipitación pluvial anual de 1500 mm. Debido a

que la Península de Santa Elena se encuentra en su mayor parte rodeada por el mar presenta una humedad relativa mucho menor que el Sector Santa Rosa (Janzen 1998).

Se trabajó con quince especies pertenecientes a siete familias (Cuadro 1). Todas las especies son clasificadas por UICN (2009) como preocupación menor (LC), excepto *Craugastor ranoides* que es clasificada en peligro crítico (CR). Se recolectó un mayor número de muestras en las especies *Craugastor fitzingeri* (O. Schmidt) y *C. ranoides* dado que: (1) previamente *Batrachochytrium dendrobatidis* había sido detectado en *C. fitzingeri* en otras regiones bajas del país mediante técnicas histológicas (Puschendorf et al. 2006a), pero el hongo no había sido detectado en el bosque tropical seco (Puschendorf et al. 2009), (2) la Península de Santa Elena alberga a las únicas poblaciones actualmente conocidas de *C. ranoides* (Sasa & Solórzano, Puschendorf et al. 2005 Zumbado-Ulate et al. 2007) y (3) en un análisis previo, *B. dendrobatidis* no fue detectado en 16 muestras de frotis en *C. ranoides* analizados mediante PCR convencional (K. Lips com. pers, R. Puschendorf com. pers.).

Toma de muestras en el campo. A lo largo del muestreo se realizaron un total de 445 capturas de anuros (Cuadro 1). En el Sector Murciélagos se capturaron 345 ranas en dos periodos, el primero entre diciembre del 2006 y julio del 2007 y el segundo entre diciembre del 2007 y julio del 2008. La mayoría de muestras fueron tomadas durante los inicios de la estación lluviosa. En el Sector Santa Rosa se realizaron 100 capturas, durante setiembre del 2007 y julio del 2008, durante la estación lluviosa.

Las ranas capturadas fueron puestas dentro de bolsas plásticas nuevas y manipuladas con guantes de látex sin talco. Cada una se frotó en la piel con un aplicador de dacrón (Medical Wire & Equipment, MW 113) o de algodón de la siguiente forma: 20

veces en la superficie ventral, 20 veces en la parte inferior del muslo, 20 veces de la axila a la ingle, 20 veces del muslo a la pata, 10 veces en una mano y 10 en una pata. Los frotis fueron colocados en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se dejaron secar al aire por aproximadamente 10 min siguiendo el protocolo de Vredenburg y Briggs (2007). Posteriormente los frotis fueron congelados a -20°C . Se utilizaron aplicadores de algodón en 47 muestras tomadas en el Sector Murciélagos durante el periodo entre diciembre del 2006 y abril del 2007

Las ranas fueron clasificadas por especie y se determinó su edad (juvenil o adulto) y el hábitat de acuerdo a los criterios dados por Savage (2002) (Cuadro 1). Se obtuvo para cada individuo la medida de longitud hocico-cloaca (LHC) hasta el mm más cercano con un calibrador digital (Mitumoyo).

Análisis de laboratorio. La extracción de ADN de los frotis y las condiciones de la reacción de PCR cuantitativo se realizaron según el protocolo de Boyle et al. (2004) con las modificaciones de Kriger et al. (2006a, 2006b). La detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* se llevó a cabo con un sistema detector de secuencias (Applied BioSystems Prism 7500 Sequence Detection System). Para detectar inhibidores en las muestras se usó un kit de control positivo interno (Applied BioSystems TaqMan Exogeneous internal positive control reagents N° 4308323) (Hyatt et al. 2007). Las muestras fueron corridas una única vez (Kriger et al. 2006b) en un ensayo Plus/minus con los respectivos controles positivos y negativos (Applied BioSystems 2006).

Un total de 36 muestras tomadas con aplicadores de algodón en el Sector Murciélagos fueron analizadas en febrero del 2007 en la Universidad Autónoma de México (UNAM) en México D.F., pero debido a degradación de los estándares no fue posible

cuantificar las muestras positivas. El resto de las muestras (409) fue analizado en el Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica (UCR). Se determinó como positivas las muestras en las que amplificaron el control positivo interno y la secuencia blanco del quitridio. Se consideraron negativas aquellas en las que solo amplificó el control positivo interno. En los casos en los que no hubo amplificación del control positivo interno se consideró que existía un inhibidor de la reacción. Para eliminarlo se procedió a diluir la muestra en agua en una dilución 1:10. Las muestras positivas fueron analizadas por triplicado. Si alguna de las muestras no amplificaba en los tres ensayos se consideraría como sospechosa. Las muestras fueron cuantificadas con las soluciones estándar como indica Boyle et al. (2004), sin embargo, la curva de cuantificación se realizó con soluciones que contenían 1000, 100, 10 y 1 esporas (Fig.2). Los estándares fueron preparados en el Australian Animal Health Laboratory (CSIRO) en Australia y donados por M. Lampo.

Análisis de los datos. Se determinaron las especies afectadas, la cantidad de zoosporas y la prevalencia. Se realizaron pruebas de bondad y ajuste para comparar el número de infectados y la prevalencia por localidad. Se comparó la prevalencia según la edad de las ranas y el hábitat. Para cada valor de prevalencia se calcularon límites de confianza binomiales con un alfa de 0.05%.

RESULTADOS

En ninguna de las ranas capturadas se observó algún síntoma de quitridiomycosis. Se detectó el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* en doce individuos pertenecientes a cuatro especies (cuadro 2). Dos de las muestras positivas no se pudieron cuantificar. En el

análisis de PCR en tiempo real de los otros diez casos se obtuvo un resultado positivo en los tres ensayos del análisis de cuantificación, lo cual descartó muestras sospechosas. Los mayores niveles de infección se obtuvieron en un individuo adulto de la especie *Leptodactylus poecilochilus* (Cope) proveniente del Sector Santa Rosa, sin embargo el individuo no mostraba síntomas aparentes. Todos los casos positivos se detectaron en adultos y los niveles de infección fueron leves. Se presentó inhibición del control positivo interno en 75 muestras. Luego de ser diluidas nuevamente en una proporción 1:10 se logró en todos los casos la amplificación del control positivo interno y no se detectó a *B. dendrobatidis*.

El Cuadro 3 muestra como al comparar proporcionalmente los casos positivos con el número de muestras tomadas por especie hay una mayor cantidad de individuos con el patógeno en Santa Rosa ($X^2 = 19.53$; gl = 1; $P < 0.01$). En el Sector Murciélago dos especies tuvieron individuos afectados y la prevalencia de individuos afectados es diferente entre las especies ($G = 6.53$; gl = 2; $P = 0.01$). En el Sector Santa Rosa, tres especies tuvieron individuos infectados y la prevalencia también varía entre las especies ($G = 16.73$; gl = 2; $P < 0.01$). A pesar de que *Engystomops pustulosus* (Cope) y *L. forreri* (Boulenger) tienen una prevalencia alta en el Sector Santa Rosa no se detectó ningún caso positivo en Murciélago. La prevalencia general del patógeno en el bosque tropical seco fue del 2.7% (límite inferior 0.14%, límite superior 4.66%) y la especie con más individuos infectados fue *E. pustulosus* ($G = 41.41$; gl = 3; $P < 0.01$). La prevalencia del hongo fue mayor en las especies que habitan en charcos ($G = 24.38$; gl = 2; $P < 0.01$) (10 casos, 244 muestras, prevalencia = 4.10%, límite inferior 1.98%, límite superior 7.41%) con respecto a las que habitan en ríos (2 casos, 132 muestras, prevalencia = 1.52%, límite inferior 0.18%, límite

superior 5.36%) y en bosque (0 casos, 69 muestras, prevalencia = 0.00%, límite inferior 0.00%, límite superior 5.21%)

DISCUSIÓN

En ningún individuo juvenil se detectó el hongo quitridio, únicamente en adultos. Según otros estudios (Kriger et al. 2006a, Burrowes et al. 2008a, Woodhams & Alford 2005), los individuos con menor tamaño tienden a tener mayor prevalencia y mayores grados de infección que individuos con mayor tamaño. La discordancia con el resultado encontrado podría deberse a que la mayor parte de las muestras positivas se tomaron en la estación lluviosa, durante la época reproductiva, lo que puede producir un sesgo. Esto porque los adultos se congregan en cuerpos de agua y aumentan sus interacciones físicas, aumentando así el riesgo de transmisión del patógeno (de Castro & Bolker 2005, Brem & Lips 2008). Si realmente el resultado obtenido es probable que al aumentar la muestra de juveniles de las especies afectadas aumente la prevalencia en individuos con menor tamaño. Si realmente los juveniles son menos afectados en el bosque tropical seco, podría deberse a que no forman agregaciones durante la estación lluviosa, época en que el contagio debería ser mayor por el aumento en la cantidad de lluvia.

Los modelos de Ron (2005) y Puschendorf et al. (2009) indican que la probabilidad de encontrar a *Batrachochytrium dendrobatidis* causando quitridiomycosis en regiones secas y con altas temperaturas es muy baja. Esto concuerda con el resultado obtenido, ya que la prevalencia general encontrada en el bosque tropical seco fue menor al 3%. Además, ningún individuo presentó señales de quitridiomycosis. Esto sugiere que en determinadas condiciones ambientales, el hongo podría vivir en la piel de la rana de manera saprófita, sin

causar ningún daño a su hospedero como ha sido previamente indicado (Daszak et al. 2003, Retallick et al. 2004). Estos sitios donde las condiciones ambientales impiden el crecimiento y el surgimiento de brotes manteniendo al hongo en concentraciones muy bajas podrían definirse como refugios contra la quitridiomycosis (Puschendorf et al. 2005, 2009). El estudio de Murray et al. (2009) muestra como en algunos sitios las poblaciones de anfibios pueden persistir a pesar de estar afectadas por la quitridiomycosis. En estas regiones, la mortalidad asociada a la enfermedad así como su prevalencia parecen disminuir en respuesta al aumento de la temperatura. En otras regiones donde no se presenta este patrón climático, las poblaciones de las mismas especies no logran sobrevivir. Este mismo caso podría haber ocurrido con la especie *Craugastor ranoides* a lo largo de su distribución en Costa Rica. La persistencia de esta especie en la región de la Península de Santa Elena podría mostrar como el clima puede ser un factor muy importante involucrado en la capacidad de dispersión e infección del quitridio *B. dendrobatidis*.

Otros estudios también muestran como especies de anfibios en zonas bajas presentan quitridiomycosis, sin embargo su prevalencia disminuye en regiones secas y con mayor temperatura. Por ejemplo, Burrowes et al. (2008b) indican que la ausencia de quitridiomycosis en las zonas bajas de Puerto Rico podría deberse a las altas temperaturas debido a que éstas son mayores que el ámbito que el quitridio parece soportar. Puschendorf et al. (2006a) encontraron individuos de *Craugastor fitzingeri* infectados ligeramente con *Batrachochytrium dendrobatidis* en las zonas bajas del bosque tropical húmedo de Costa Rica. Estas zonas presentan temperaturas igualmente altas, por lo que es posible que la humedad sea también un factor ambiental determinante en el crecimiento y dispersión de *B. dendrobatidis* (Piotrowski et al. 2004, Puschendorf et al. 2009).

La Península de Santa Elena ha sido considerada como un posible refugio debido a sus condiciones climáticas, que parecen ser inhóspitas para *Batrachochytrium dendrobatidis*. Esta zona es la más seca del país e incluso presenta menor humedad relativa que otros sitios cercanos que se ubican en la misma zona de vida, como es el caso del Sector Santa Rosa (Janzen 1998). Es notable observar como las especies que presentaron las prevalencias mayores en el Sector Santa Rosa presentaron una prevalencia de 0% en Sector Murciélagos. En ambos sitios la temperatura promedio es alta y supera los 30°C durante la estación seca, lo que demuestra que el hongo es capaz de vivir aún en altas temperaturas, sin embargo su prevalencia aumenta en sitios más húmedos y probablemente durante la estación lluviosa. Estos datos concuerdan con otros estudios que indican como la interacción entre temperatura y humedad producen diferentes prevalencias en poblaciones de la misma especie. Estos estudios indican que durante los meses más calientes y con menos lluvias la prevalencia de quitridiomycosis en la población tiende a bajar o a desaparecer por completo (Berger et al. 2004, Retallick et al. 2004, Woodhams & Alford 2005, McDonald et al. 2005, Kriger & Hero 2006, Kriger et al. 2007, Kriger & Hero 2008, Muths et al. 2008, Murray et al. 2009).

Precisamente, uno de los principales argumentos para indicar que el bosque tropical seco y la Península de Santa Elena son refugios contra la quitridiomycosis es la persistencia en la región de *Craugastor ranoides* (Sasa & Solórzano 1995, Puschendorf et al. 2005, Zumbado-Ulate et al. 2007, Zumbado & Soley en prensa). Esta especie disminuyó drásticamente en el país en todo su ámbito de distribución altitudinal, incluso en sitios situados a muy corta distancia de la Península de Santa Elena como es el caso de Volcán Cacao y Volcán Rincón de la Vieja, localidades que son climáticamente muy diferentes y

tienen ámbitos de temperatura y humedad que posiblemente permitieron la ocurrencia de brotes letales de quitridiomicosis.

Otro importante argumento a favor de los refugios es basado en los estudios de Puschendorf et al. (2006a) que reportaron la presencia de el hongo en individuos de *Craugastor fitzingeri* en zonas bajas del atlántico (bosque tropical húmedo) mediante técnicas histológicas. En este estudio, no fue posible detectar a *B. dendrobatidis* en *C. fitzingeri* en el bosque tropical seco, ni siquiera con una técnica más sensible y específica como es el PCR en tiempo real (Boyle et al. 2004).

En cuanto a la prevalencia encontrada en las diferentes especies, es conocido que la sensibilidad al quitridio varía entre especies debido a péptidos defensivos en la piel y a la respuesta inmune (Woodhams et al. 2006). La especies *Engystomops pustulosus* y *Lithobates forreri* presentaron una prevalencia relativamente alta en el Sector Santa Rosa. Esto pudo deberse a que son especies que se congregan en grandes números en pequeños cuerpos de agua, incluso huecos en el camino (Savage 2002), lo que aumenta el riesgo de contagio.

En este estudio *Engystomops pustulosus* presentó la mayor prevalencia general. Esto puede deberse al hecho de que esta especie forma grandes agregaciones reproductivas en cuerpos de agua muy pequeños (Marsh et al. 2000). En cuanto a *Lithobates forreri*, es importante indicar que otras especies de este género se han visto afectadas por la disminución de sus poblaciones. Incluso estas disminuciones han sido asociadas con la quitridiomicosis, como es el caso de *L. vibicarius* (Cope) y *L. warszewitschii* (O. Schmidt) (Puschendorf et al. 2006a, UICN 2009), por lo que es importante realizar nuevos estudios a

lo largo de toda la distribución geográfica de esta rana para determinar si otras poblaciones presentan el quitridio y su prevalencia.

A pesar que algunos estudios aseguran que las poblaciones asociadas a corrientes tienden a ser más afectadas (Young et al. 2001, Skerrat et al. 2007), se encontró que en el bosque tropical seco las especies que se reproducen en charcos presentaron mayor cantidad de casos positivos con *Batrachochytrium dendrobatidis*. Esto podría deberse a que la única especie asociada a ríos en esta zona (*Craugastor ranoides*) es menos susceptible al quitridio o a que las especies de charco forman grandes agregaciones que facilitan el contagio del quitridio. Es necesario realizar más estudios para lograr determinar la verdadera causa de las diferencias en las prevalencias.

Este estudio representa el primer reporte de la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en las especies *Craugastor ranoides*, *Engystomops pustulosus*, *Leptodactylus poecilochilus* y *Lithobates forreri* en el bosque tropical seco de Costa Rica. Son necesarios nuevos estudios en otros sitios del mundo para determinar la existencia de refugios potenciales contra la quitridiomycosis. La protección y el manejo adecuado del bosque tropical seco es realmente importante para la conservación de las últimas poblaciones de *C. ranoides* que aún persisten en Costa Rica.

Agradecimientos: Al Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICIT), al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICIT) y al Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad de Costa Rica (SEP) por el apoyo financiero para realizar el proyecto. A IdeaWild por la donación de equipo. A la Red de Análisis de Anfibios Amenazados (RANA) por el curso de entrenamiento. Al comité revisor de tesis F. Bolaños, G. Barrantes y G. Gutiérrez-

Espeleta por su colaboración. Al personal del Área de Conservación Guanacaste (ACG), especialmente a R. Blanco y M.M Chavarría. A M. Lampo, R. Puschendorf, V. Vredenburg, S. Silva, R. Campos, G. Chaves, A. García, F. Soley y B. Willink por su colaboración. A los asistentes de campo.

LITERATURA CITADA

- Alford RA, Bradfield KS, Richards SJ (2007) Global warming and amphibian losses. *Nature* 447:E3-E4
- Applied BioSystems (2006) Plus/Minus assay getting started guide. Applied BioSystems, California
- Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham AA, Slocombe R, Goggin CL, Hyatt AD, MacDonald KR, Hines HB, Lips KR, Marantelli G, Parkes HH (1998) Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rainforest of Australia and Central America. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9031-9036
- Berger L, Speare R, Hines HB, Marantelli G, Hyatt AD, McDonald KR, Skerratt LF, Olsen V, Clarke JM, Gillespie G, Mahony M, Sheppard N, Williams C, Tyler MJ (2004) Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Australian Vet J* 82:434-439
- Blaustein AR, Hoffman PD, Hokit DG, Kiesecker JM, Walls SC, Hays JB (1994) UV repair and resistance to solar UV-B in amphibian eggs: a link to population declines? *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1791-1795

- Bonaccorso E, Guayasamin JM, Méndez D, Speare R (2003) Chytridiomycosis in a Venezuelan amphibian (Bufonidae: *Atelopus cruciger*). *Herpetol Rev* 34:331-334
- Bosch J, Martínez-Solano I, García-Paris M (2001) Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biol Conserv* 97:331-7
- Bosch J, Carrascal LM, Durán L, Walker S, Fisher MC (2007) Climate change and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of Central Spain; is there a link? *Proc R Soc B* 274:253-260
- Boyle DG, Boyle DB, Olsen V, Morgan JAT, Hyatt AD (2004) Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis Aquat Org* 60:141-148
- Bradley GA, Rosen PC, Sredl MJ, Jones TR, Longcore JE (2002) Chytridiomycosis in native Arizona frogs. *J Wildl Dis* 38:206-212
- Brem FMR, Lips KR (2008) *Batrachochytrium dendrobatidis* infection patterns among Panamanian amphibian species, habitats and elevations during epizootic and enzootic stages. *Dis Aquat Org* 81:189-202
- Burrowes PA, Longo AV, Rodríguez CA (2008a) Potential fitness cost of *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Eleutherodactylus coqui*, and comments on environment-related risk of infection. *Herpetotropicos* 4:51-57
- Burrowes PA, Longo AV, Joglar RL (2008b) Geographic distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Puerto Rico. *Herpetol Rev* 39:321-324

- Campbell JA, Savage JM (2000) Taxonomic reconsideration of Middle American frogs of the *Eleutherodactylus rugulosus* group (Anura: Leptodactylidae): a reconnaissance of subtle nuances among frogs. *Herpetol Monographs* 14:186-292
- Carey C, Alexander M (2003) Climate change and amphibian declines: is there a link? *Div Distrib* 9:111-121
- Cunningham AA, Daszak P, Rodriguez JP (2003) Pathogen pollution: defining a parasitological threat to biodiversity conservation. *J Parasitol* 89(Suppl):S78-S83
- Daszak P, Berger L, Cunningham AA, Hyatt AD, Green DE, Speare R (1999) Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infect Dis* 5:735-748
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD (2003) Infectious disease and amphibian population declines. *Div Distrib* 9:141-150
- Daszak P, Strieby A, Cunningham AA, Longcore JE, Brown CC, Porter D (2004) Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetol J* 14:201-207
- de Castro F, Bolker B (2005) Mechanisms of disease-induced extinction. *Ecol Lett* 8:117-126
- Fisher MC, Garner TWJ (2007) The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biol Rev* 21:2-9
- Garner TWJ, Walker S, Bosch J, Hyatt AD, Cunningham AA, Fisher M (2005) Chytrid in Europe. *Emerging Infect Dis* 11:1639-1641

- Hartshorn GS (1983) Plants: Introduction. In: Janzen DH (ed) Costa Rica natural history. Universidad de Chicago, Chicago, p 118-157.
- Hyatt AD, Boyle DG, Olsen V, Boyle DB, Berger L, Obendorf D, Dalton A, Kriger K, Hero M, Hines H, Phillott R, Campbell P, Marantelli G, Gleason F, Colling A (2007) Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis Aquat Org* 73:175-192
- Janzen DH (1998) Conservation analysis of the Santa Elena property, Peninsula Santa Elena, northwestern Costa Rica. Report to the Government of Costa Rica. Area de Conservación Guanacaste, Liberia, Costa Rica
- Johnson ML, Speare R (2003) Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and disease control implications. *Emerging Infect Dis* 9:922-92
- Kiesecker JM, Blaustein AR, Belden LK (2001) Complex causes of amphibian population declines. *Nature* 410:681-684
- Kriger KM, Hero JM (2006) Survivorship in wild frogs infected with chytridiomycosis. *EcoHealth* 3:171-177
- Kriger KM, Hero JM (2008) Altitudinal distribution of chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) infection in subtropical Australian frogs. *Austral Ecol* 33:1022-1032
- Kriger KM, Hines HB, Hyatt AD, Boyle DG, Hero JM (2006a) Techniques for detecting chytridiomycosis in wild frogs: comparing histology with real-time Taqman PCR. *Dis Aquat Org* 71:141-148
- Kriger KM, Hero JM, Ashton KJ (2006b) Cost efficiency in the detection of chytridiomycosis using PCR assay. *Dis Aquat Org* 71:149-154

- Kruger KM, Pereoglou F, Hero JM (2007) Large-scale seasonal variation in the prevalence and severity of chytridiomycosis. *Conserv Biol* 5:1280-1290
- La Marca E, Lips KR, Lötters S, Puschendorf R, Ibáñez R, Rueda-Almonacid JV, Schulte R, Marty C, Castro F, Manzanilla-Puppo J, García Pérez JE, Bolaños F, Chaves G, Pounds JA, Toral E, Young BE (2005) Catastrophic population declines in neotropical harlequin frogs (Bufonidae: *Atelopus*). *Biotropica* 37:190-201
- Laurance WF, McDonald KR, Speare R (1996) Epidemic disease and the catastrophic decline of Australian rain forest frogs. *Conserv Biol* 10:406-413
- Lips KR (1998) Decline of a tropical montane amphibian fauna. *Conserv Biol* 12:106-117.
- Lips KR (1999) Mass mortality of the anuran fauna at an upland site in Panama. *Conserv Biol* 13:117-125
- Lips KR, Green DE, Papendick R (2003a) Chytridiomycosis in wild frogs from southern Costa Rica. *J Herpetol* 37:215-218
- Lips KR, Reeve D, Witters LR (2003b) Ecological traits predicting amphibian population declines in Central America. *Conserv Biol* 17: 1078-1088
- Lips KR, Brem F, Brenes R, Reeve JD, Alford RA, Voyles J, Carey C, Livo J, Pessier AP, Collins JP (2006) Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:3165-317
- Lips KR, Diffendorf J, Mendelson JR III, Sears MW (2008) Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLOS Biology* 6:441-453
- Longcore JE, Pessier AP, Nichols DK (1999) *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91:219-227

- Marsh DM, Rand AS, Ryan MJ (2000) Effects of inter-pond distance on the breeding ecology of tungara frogs. *Oecologia* 122:505–513
- Mazzoni R, Cunningham AA, Daszak P, Apolo A, Perdomo E, Speranza G (2003) Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. *Emerging Infect Dis* 9:995-998
- McDonald KR, Mendez D, Muller R, Freeman AB, Speare R (2005) Decline in the prevalence of chytridiomycosis in frog populations in North Queensland, Australia. *Pac Conserv Biol* 11:114–20
- Morehouse EA, James TY, Ganley ARD, Vilgaly R, Berger L, Murphy PJ, Longcore JE (2003) Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone. *Mol Ecol* 12:395–403
- Murray KA, Skerrat LF, Speare R, McCallum H (2009) Impact and dynamics of disease in species threatened by the amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conserv Biol* DOI: 10.1111/j.1523-1739.2009.01211.x
- Muths E, Pilliod DS, Livo LJ (2008) Distribution and environmental limitations of an amphibian pathogen in the Rocky Mountains, USA. *Biol Cons* 141: 1484-1492
- Mutschmann F, Berger L, Zwart P, Gaedicke C (2000) Chytridiomycosis in amphibians—first report in Europe. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 113:380–383
- Piotrowski JS, Annis SL, Longcore JE (2004) Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96:9-15
- Pounds JA (2001) Climate and amphibian declines. *Nature* 410:639-640
- Pounds JA, Crump ML (1994) Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Conserv Biol* 8: 72-85

- Pounds JA, Fogden MPL, Savage JM, Gorman GC (1997) Test of null models for amphibian declines on a tropical mountain. *Conserv Biol* 11:1307-1322
- Pounds JA, Fogden MPL, Campbell JH (1999) Biological response to climate change on a tropical mountain. *Nature* 398:611-615
- Pounds JA, Bustamante MR, Coloma LA, Consuegra JA, Fogden MPL, Foster PN, La Marca E, Masters KL, Merino-Viteri A, Puschendorf R, Ron SR, Sánchez-Azofeifa GA, Still CJ, Young BE (2006) Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 439:161-167
- Puschendorf R (2003) *Atelopus varius* (harlequin frog) fungal infection. *Herpetol Rev* 34:355
- Puschendorf R, Chaves G, Crawford AJ, Brooks DR (2005) *Eleutherodactylus ranoides*. Dry forest population, refuge from decline? *Herpetol Rev* 36: 53.
- Puschendorf R, Bolaños F, Chaves G (2006a) The amphibian chytrid fungus along an altitudinal transect before the first reported declines in Costa Rica. *Biol Conserv* 132:136-142
- Puschendorf R, Castañeda F, McCranie JR (2006b) Chytridiomycosis in wild frogs from Pico Bonito National Park, Honduras. *EcoHealth* 3:178-181
- Puschendorf R, Carnaval AC, VanDerWal J, Zumbado-Ulate H, Chaves G Bolaños F, Alford RA (2009) Distribution models for the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in Costa Rica: proposing climatic refuges as a conservation tool. *Div Distrib* 15: 401-408
- Rachowicz LJ, Hero JM, Alford R, Taylor JW, Morgan JAT, Vredenburg VT, Collins JP, Briggs CJ (2005) The novel and endemic pathogen hypotheses: competing

- explanations for the origin of emerging infectious disease of wildlife. *Conserv Biol* 19:1441-1448
- Retallick RWR, McCallum H, Speare R (2004) Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community post-decline. *PLOS Biology* 2:1965-1971
- Ron SR (2005) Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica* 37:209–221
- Ron SR, Merino A (2000) Declinación de anfibios del Ecuador: Información general y primer reporte de chytridiomycosis para Sudamérica. *Froglog* 42:2
- Ron SR, Duellman WE, Coloma LM, Bustamante MR (2003) Population decline of the Jambato toad *Atelopus ignescens* (Anura: Bufonidae) in the Andes of Ecuador. *J Herpetol* 37:116-126
- Ryan MJ, Lips KR, Eichholz MW (2008) Decline and extirpation of an endangered Panamanian stream frog population (*Craugastor punctariolus*) due to an outbreak of chytridiomycosis. *Biol Conserv* 141:1636-1647
- Sasa M, Solórzano A (1995) The reptiles and amphibians of Santa Rosa National Park, Costa Rica, with comments about the herpetofauna of xerophytic areas. *Herpetol Nat Hist* 3:113-126
- Savage JM (2002) The amphibians and reptiles of Costa Rica: a herpetofauna between two continents, between two seas. Universidad de Chicago, Chicago.
- Skerratt LF, Berger L, Speare R, Cashins S, McDonald KR, Phillott AD, Hines HB, Kenyon N (2007) Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth* 4:125-134

- UICN (2009) IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2009.1. Consultado 16 julio 2009 www.iucnredlist.org
- Vredenburg VT, Briggs C (2007) Chytrid Swab Protocol. Consultado 1 marzo 2007 www.amphibiaweb.org/chytrid/swab_instruction07.pdf
- Waldman B, van de Wolfshaar KE, Klena JD, Andjic V, Bishop PJ, Norman RJ de B (2001) Chytridiomycosis in New Zealand frogs. *Surveillance* 28: 9-11
- Weldon C, du Preez LH (2004) Decline of the Kihansi spray toad, *Nectophrynoides asperginis*, from the Udzungwa mountains, Tanzania. *Froglog* 62:2-3
- Weldon KM, du Preez LH, Hyatt AD, Muller R, Speare R (2004) Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infect Dis* 10:2100–2105
- Whiles MR, Lips KR, Pringle CM, Kilham SS, Bixby RJ, Brenes R, Connelly S, Colón-Gaud JC, Hunte-Brown M, Huryn AD, Montgomery C, Peterson S (2006) The effects of amphibian population declines on the structure and function of Neotropical stream ecosystems. *Front Ecol Environ* 4:27-34
- Woodhams DC, Alford RA (2005) Ecology of chytridiomycosis in rainforest stream frog assemblages of tropical Queensland. *Conserv Biol* 19:1449–1459
- Woodhams DC, Alford RA, Marantelli G (2003) Emerging diseases of amphibian cured by elevated body temperature. *Dis Aquat Org* 55:65-67
- Woodhams DC, Voyles J, Lips KR, Carey C, Rollins-Smith LA (2006) Predicted disease susceptibility in a Panamanian amphibian assemblage based on skin peptide defenses. *J Wildl Dis* 42:207–218

- Woodhams DC, Alford RA, Briggs CJ, Johnson M, Rollins-Smith LA (2008) Life-history trade-offs influence disease in changing climates: strategies of an amphibian pathogen. *Ecology* 89:1627-1639
- Young BE, Lips KR, Reaser J, Ibáñez R, Salas A, Cedeño R, Coloma LM, Ron SR, La Marca E, Meyer J, Muñoz A, Bolaños F, Chaves G, Romo D (2001) Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conserv Biol* 15:213-223
- Zumbado-Ulate H, Puschendorf R, Chavarría MM (2007) *Eleutherodactylus ranoides* (NCN) Distribution. *Herpetol Rev* 38:184–185

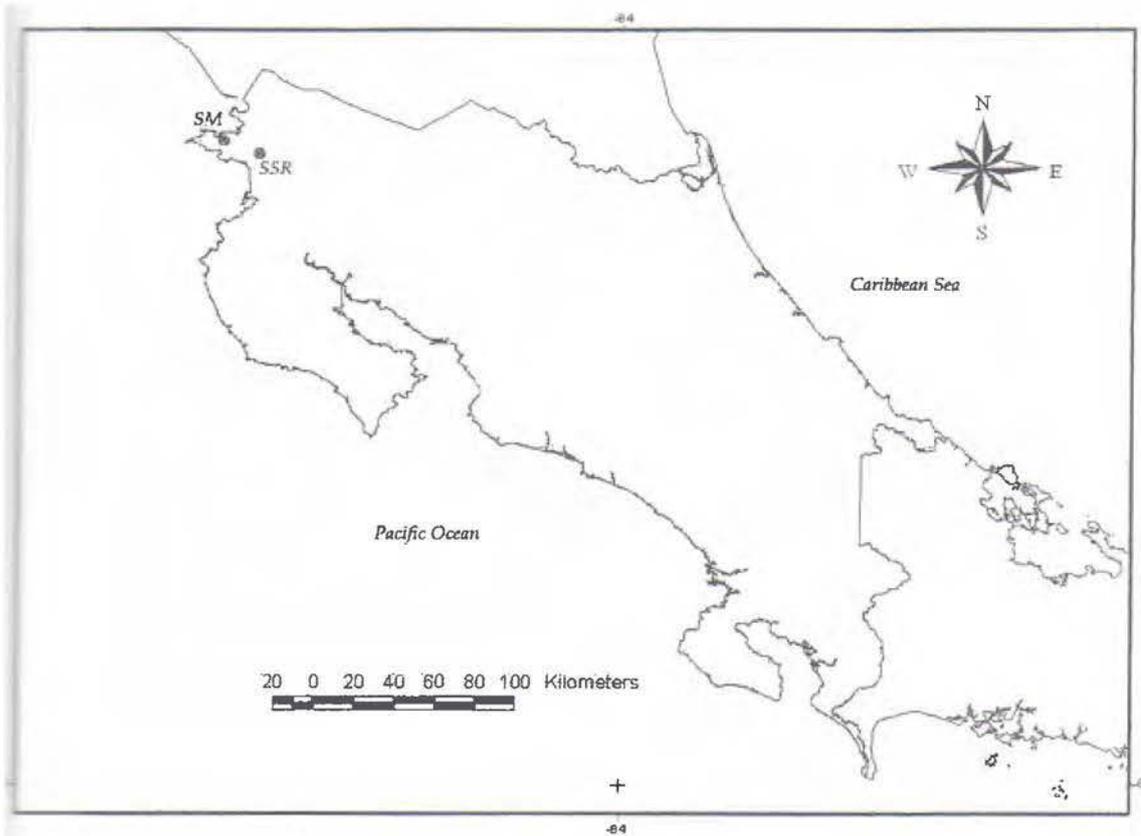


Fig. 1. Localidades del bosque tropical seco de Costa Rica dónde se realizó el estudio. **Sector Murciélago (SM)** en la Península de Santa Elena y **Sector Santa Rosa (SSR)** al sureste de la Península de Santa Elena.

Cuadro 1. Número de muestras por especie, localidad y hábitat, bosque tropical seco, Costa Rica, 2006-2008.

Familia	Especie	Murciélago	Santa Rosa	Hábitat
Bufonidae	<i>Chaunus marinus</i> (Linné)	16	10	Charco
	<i>Incilius coccifer</i> (Cope)	21	7	Charco
	<i>Incilius luetkenii</i> (Boulenger)	11	0	Charco
Craugastoridae	<i>Craugastor fitzingeri</i>	69	0	Bosque
	<i>Craugastor ranoides</i>	132	0	Río
Hylidae	<i>Dendropsophus microcephalus</i> (Cope)	2	6	Charco
	<i>Scinax boulengeri</i> (Cope)	0	1	Charco
	<i>Scinax staufferi</i> (Cope)	0	3	Charco
	<i>Smilisca baudinii</i> (C. Duméril y Bibron)	27	4	Charco
	<i>Trachycephalus venulosus</i> (Laurenti)	2	11	Charco
Leiuperidae	<i>Engystomops pustulosus</i>	11	19	Charco
Leptodactylidae	<i>Leptodactylus melanonotus</i> (Hallowell)	18	0	Charco
	<i>Leptodactylus poecilochilus</i>	14	22	Charco
Microhylidae	<i>Hypopachus variolosus</i> (Cope)	1	8	Charco
Ranidae	<i>Lithobates forreri</i>	21	9	Charco

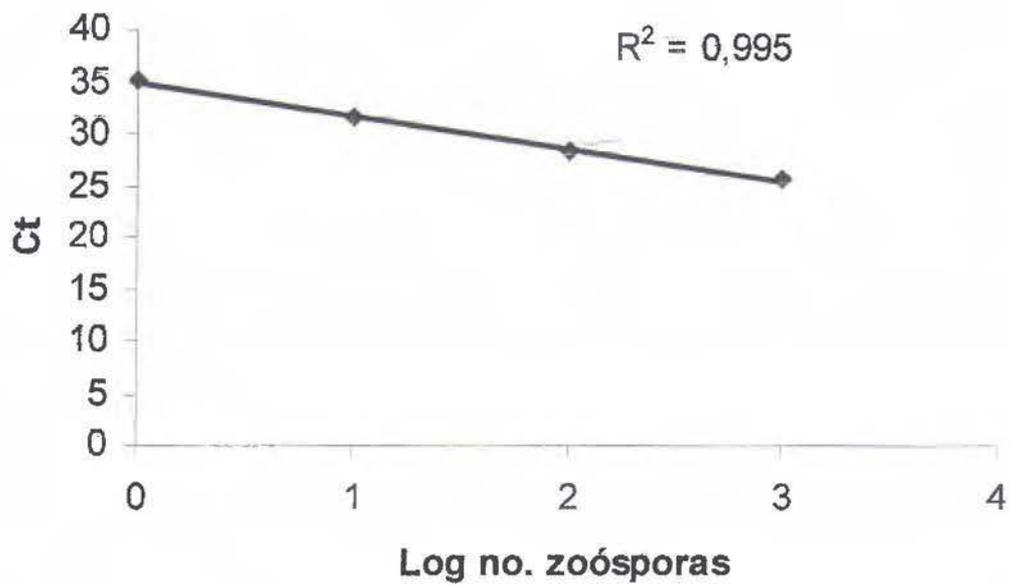


Fig. 2. *Batrachochytrium dendrobatidis*. Curva estándar utilizada para la cuantificación de muestras del bosque tropical seco de Costa Rica mediante PCR en tiempo real. El valor Ct muestra el número de ciclos en los cuáles la dilución del estándar es detectada y determinada como positiva.

Cuadro 2. *Batrachochytrium dendrobatidis*. Promedio (\pm desviación estándar) de la cantidad de zoosporas cuantificadas por PCR en tiempo real en las muestras de dos localidades, bosque tropical seco, Costa Rica 2006-2008.

Especie	Zoosporas	Localidad
<i>Craugastor ranoides</i>	*	
<i>Craugastor ranoides</i>	535.64 \pm 3.87	Murciélago
<i>Leptodactylus poecilochilus</i>	*	
<i>Leptodactylus poecilochilus</i>	1073.45 \pm 6.45	
<i>Lithobates forreri</i>	328.14 \pm 1.50	
<i>Lithobates forreri</i>	810.34 \pm 13.71	
<i>Engystomops pustulosus</i>	17.16 \pm 0.90	
<i>Engystomops pustulosus</i>	51.98 \pm 4.79	Santa Rosa
<i>Engystomops pustulosus</i>	21.79 \pm 2.89	
<i>Engystomops pustulosus</i>	76.03 \pm 5.59	
<i>Engystomops pustulosus</i>	150.05 \pm 11.42	
<i>Engystomops pustulosus</i>	14.74 \pm 1.04	

* Las muestras no fueron cuantificadas

Cuadro 3. *Batrachochytrium dendrobatidis*. Porcentaje de prevalencia (límite inferior-límite superior) por especie según localidad, bosque tropical seco 2006-2008.

Especie	Murciélago (%)	Santa Rosa (%)	Bosque seco (%)
<i>Craugastor ranoides</i>	1.52 (0.18-5.36)	*	1.52 (0.18-5.36)
<i>Engystomops pustulosus</i>	0.00 (0.00-28.50)	31.6 (12.58-56.60)	20.00 (7.71-38.57)
<i>Leptodactylus poecilochilus</i>	7.14 (0.18-33.87)	4.55 (0.68-18.66)	5.56 (0.68-18.66)
<i>Lithobates forreri</i>	0.00 (0.00-16.10)	22.20 (2.28-60.00)	6.67 (0.82-22.10)

* La especie no se encontró en el Sector Santa Rosa

Capítulo 2

En formato de artículo científico para ser sometido a la revista *Biological Conservation*.

**Dinámica poblacional y dimorfismo sexual en la rana *Craugastor ranoides*
(Craugastoridae) en el bosque tropical seco de Costa Rica.**

Héctor Zumbado Ulate

Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. San Pedro, San José, Costa Rica.

Dirección de correspondencia: Escuela de Biología, Sistema de Estudios de Posgrado, Universidad de Costa Rica. San Pedro-San José, Costa Rica. Tel.: (506) 22533194

Dirección electrónica: hugozul@yahoo.com

Resumen: El grupo de especies *Craugastor rugulosus* ha sido uno de los más afectados por la disminución de poblaciones de anfibios en América. Son especies asociadas a ríos que se han visto amenazadas en todos los ámbitos altitudinales en que se distribuyen. *Craugastor ranoides* es catalogada en peligro crítico debido a la desaparición de sus poblaciones en zonas altas y bajas de Costa Rica, y hoy únicamente se le conoce en la Península de Santa Elena. Se realizó un estudio de abundancia y morfometría de esta especie en tres ríos de la Península de Santa Elena durante dos estaciones secas consecutivas. Se encontró que la abundancia de ranas fue similar en ambas. La abundancia por edad y sexo varió entre estaciones. Durante la estación seca las ranas se agruparon posiblemente en respuesta a la disminución de agua en los ríos y se les observó principalmente posadas sobre rocas. Hay dimorfismo sexual en el tamaño, el peso y el diámetro del tímpano. Los resultados obtenidos concuerdan con lo descrito para otras especies del grupo *C. rugulosus*.

Palabras claves: *Craugastor ranoides*, grupo *Craugastor rugulosus*, disminución de poblaciones, anfibios

1. Introducción

Se estima que el 32.5% de las poblaciones de especies actuales de anfibios han disminuido, por lo que estas especies se encuentran actualmente amenazadas, incluso muchas se han extinto (Stuart et al., 2004). Estas disminuciones han ocurrido en sitios alterados y en hábitats prístinos y protegidos en todo el mundo (Crump et al., 1992; Fellers y Drost, 1993; Lips, 1998, 1999; Young et al., 2001). Se han asociadas con varios posibles factores causantes como la destrucción de hábitat, las enfermedades y el cambio climático global (Young et al., 2001). Muchas poblaciones han logrado recuperarse parcialmente, aunque es incierto cuántas lograran estabilizarse (Retallick et al., 2004; Kriger y Hero, 2006).

Las poblaciones de anfibios que habitan elevaciones intermedias son las más afectadas (Lips, 1998, 1999; Lips et al., 2003a; Young et al., 2001, Lips et al., 2008). En estas regiones, las especies asociadas a ríos parecen ser más vulnerables (Young et al., 2001; Lips et al., 2003b, 2006; Woodhams y Alford, 2005; Whiles et al., 2006; Skerrat et al., 2007). En América destacan los casos de las especies del género *Atelopus* (Bufonidae) (La Marca et al., 2005), del grupo *Craugastor milesi* (Craugastoridae) (McCranie y Wilson, 2002) y del grupo *Craugastor rugulosus* (Campbell, 1998; Lips et al., 2003b; Puschendorf et al., 2006b, 2009; Ryan et al., 2008; McCranie y Wilson, 2002).

En Costa Rica, la mayor parte de extinciones y disminuciones han ocurrido en zonas altas (Pounds y Crump, 1994; Bolaños y Ehmke, 1996; Lips, 1998; Pounds et al. 1997,

1999; Puschendorf et al., 2006a). Algunas especies asociadas a ríos se han visto muy afectadas, como *Craugastor andi* (Savage), *Istmohyla calypsa* (Lips) (Hylidae), las del grupo *Craugastor rugulosus* y las del género *Atelopus* (Bolaños y Ehmke, 1996; Pounds, 2001; Lips et al., 2003a, 2004; Puschendorf, 2003; La Marca et al., 2005). Otras disminuciones y extinciones han ocurrido en zonas bajas en *C. ranoides* (Cope) y *C. taurus* (Taylor) (ambas del grupo *C. rugulosus*) y *Strabomantis bufoniformis* (Boulenger) (Strabomantidae) (Puschendorf et al., 2005; UICN 2009). También se reporta la disminución en zonas bajas de poblaciones de especies asociadas a la hojarasca (Withfield et al., 2007).

El grupo *C. rugulosus* también llamado la serie de especies *C. punctariolus* (Peters) está formado por 33 especies (Hedges et al., 2008), de las cuáles ocho se encuentran en Costa Rica (Campbell y Savage, 2000). En la mayoría se han comunicado disminuciones y posibles extinciones por causas desconocidas, destrucción del hábitat o quitridiomycosis (Campbell, 1998; Pounds, 1991; McCranie y Wilson, 2002; Lips et al., 2003a, 2004, 2006; Puschendorf et al., 2006b; Bolaños et al., 2008; Ryan et al., 2008). En Costa Rica se clasifica a *C. escoces* (Savage) como extinta, dos especies presentan datos deficientes y al resto en peligro crítico (Bolaños et al., 2008, UICN 2009). Únicamente se conocen poblaciones actuales para *C. ranoides* en el bosque tropical seco de la Península de Santa Elena (Sasa y Solórzano, 1995; Puschendorf et al., 2005, 2009; Zumbado-Ulate et al., 2007; Zumbado y Soley, datos sin publicar). El resto de las poblaciones del país no se observa desde hace veinte años.

Se han realizado pocos estudios de dinámica poblacional y ecología reproductiva en las especies del grupo *Craugastor rugulosus*. Los principales son de Hayes (1985) en *C.*

angelicus y Ryan et al. (2008) en *C. punctariolus*. El objetivo de este estudio fue caracterizar los cambios de abundancia y el dimorfismo sexual de *C. ranoides* en la Península de Santa Elena durante dos estaciones secas consecutivas.

2. Métodos

2.1 Sitio de estudio

El estudio se realizó en la Estación Murciélago, Área de Conservación Guanacaste (ACG), Península de Santa Elena, Guanacaste, Costa Rica (10° 54' N 85° 43' O; Fig. 1). Presenta un bosque tropical seco y semideciduo con dos estratos (Hartshorn, 1983), una temperatura promedio de 25° C y una precipitación media anual de 1500 mm. Tiene un clima estacional, con una estación seca entre diciembre y abril y una estación lluviosa entre mayo y noviembre. Hay muchos ríos y quebradas que pierden su caudal en la mayor parte de su recorrido durante la estación seca pero que conservan agua en sus nacientes y cerca de éstas durante todo el año (H. Zumbado, observación personal). Algunos ríos grandes conservan el caudal durante todo el año y durante la estación lluviosa su volumen y la velocidad de la corriente se incrementan considerablemente. Bosques de galería crecen contiguos a los ríos.

Los transectos de muestreo se localizaron en tres sitios (Fig. 1), Río Murciélago (10° 53' N, 85° 43' O), Quebrada Pedregal 1 (10° 54' N, 85° 44' O) y Quebrada Pedregal 2 (10° 54' N y 85° 45' O). Los tres presentan condiciones similares: una corriente de agua continua, que intercala con pequeños remansos. Durante la estación lluviosa el caudal de los ríos es muy alto, al entrar en la estación seca y conforme ésta avanza el caudal disminuye considerablemente e incluso algunos sectores se secan completamente. Los principales

sustratos consisten de rocas grandes y sedimentos (arena, grava y barro). Al avanzar la estación seca, la cantidad de hojarasca flotante sobre el agua aumenta, lo que proporciona un nuevo sustrato.

2.2 Especie de estudio

La rana *C. ranoides* pertenece al grupo *C. rugulosus* (Savage, 1975; Campbell y Savage 2000, Hedges et al, 2008) y su distribución incluye desde el este de Nicaragua hasta el hasta el oeste de Panamá, en un ámbito altitudinal de los 0-1300 m. En Costa Rica su distribución abarca la Península de Santa Elena y las zonas bajas e intermedias del Caribe, del Pacífico sur y del Valle Central (Savage 2002). Se encuentra asociada a ríos y quebradas en bosques de premontano, bosque tropical lluvioso y bosque tropical seco en el noroeste de Costa Rica. Esta clasificada en peligro crítico (UICN 2009) debido a que la mayoría de sus poblaciones no se observan desde hace aproximadamente 20 años. Su desaparición podría estar asociada a la quitridiomycosis, ya que esta ha provocado la disminución de otras poblaciones de especies del grupo *C. rugulosus* (Lips et al., 2004, Puschendorf et al., 2006b, Ryan et al., 2008).

Campbell y Savage (2000) han reportado dimorfismo sexual en esta especie. Las hembras presentan una mayor longitud hocico-cloaca (LHC) (hembras 42.3-74 mm, machos 29.3-45 mm) y el diámetro del tímpano (DT) es mayor en los machos (longitud 66-71% en los machos adultos, del 33 al 50% en hembras adultas). Los machos al parecer carecen de excrecencias nupciales, saco bucal y cuerdas vocales. Han sido descritos como aparentemente mudos; sin embargo, en este estudio fue posible en varias ocasiones escuchar machos emitiendo cantos aislados, pero no fue posible grabarlos. No hay información sobre la biología reproductiva de esta especie de desarrollo directo y no se observó ningún

amplexo ni masas de huevos. Así mismo, se cuenta con poca información sobre la reproducción en el grupo *C. rugulosus*. Hayes (1985) describió a una hembra de la especie *C. angelicus* enterrando una masa de 77 huevos en un nido de arena y posándose sobre éste durante varios días en Monteverde, Costa Rica. Ryan et al, (2008) reportaron un amplexo en *C. punctariolus*; sin embargo, no hicieron una descripción detallada.

2.3 Abundancia

El estudio se realizó durante dos estaciones secas consecutivas (se incluyeron los primeros dos meses de la estación lluviosa) entre diciembre del 2006 y julio del 2007 y diciembre del 2007 y julio del 2008. En cada estación seca se trabajó en cinco periodos de tres días, cada uno separado del otro por aproximadamente 45 días. Durante cada periodo se trabajó una noche en cada uno de los tres transectos (esfuerzo total: 10 giras, 30 muestreos, 350 horas). Los muestreos en ambas estaciones fueron realizados en las mismas fechas para reducir sesgos. Se trabajó durante la estación seca e inicios de la estación lluviosa debido a que el caudal de los ríos aumenta considerablemente y las ranas son difíciles de observar (Savage, 2002). En cada río se delimitó un transecto de 1 km de longitud, el cual se dividió en 20 intervalos de 50 m. Los intervalos en cada sitio fueron enumerados del uno al veinte y marcados con cinta topográfica y referenciados geográficamente con un GPS (Garmin eTrek). En cada noche de trabajo, de cuatro a seis personas caminaron lentamente corriente arriba y se realizaron inspecciones visuales (Lips et al., 2001) sobre y bajo las rocas y en los bordes de los ríos a lo largo del transecto.

Las ranas fueron atrapadas con la mano y puestas en bolsas plásticas nuevas. A cada una se le midió el tamaño (LHC) y el diámetro del tímpano (DT) hasta el mm más cercano con un calibrador digital (Mitumoyo) y se pesó con balanzas de 10 o 50 g (Pesola®). Para

sexar las ranas se utilizó información morfométrica (Campbell y Savage 2000). Se determinó el número del intervalo de cada rana atrapada en el transecto, el sustrato en que estaba (rocas, arena/grava/barro, agua, hojarasca, ramas) y su actividad (sobre el suelo, nadando, saltando, perchada en ramas).

No se pudo marcar a los individuos por lo que con los datos de cada intervalo se comparó la abundancia de ranas entre estaciones secas, entre periodos y entre ríos por medio de un análisis de varianza de mediciones repetidas, en el que el factor intervalo fue la variable de repetición. Para comparar la abundancia por edad y sexo entre ambas estaciones secas y según el periodo de muestreo se realizaron pruebas de bondad y ajuste.

2.4 Distribución espacial y uso de hábitat

Con los datos de sustrato y actividad se realizaron tablas de contingencia y pruebas de homogeneidad. Se calculó para cada periodo un coeficiente de dispersión (I) con una prueba de bondad y ajuste (Krebs, 1999) excepto para el quinto periodo de cada estación seca porque el total de capturas fue muy bajo.

2.5 Dimorfismo sexual

Se comparó el peso y la longitud del cuerpo (LHC) con un análisis de varianza de una vía. Para no recontar individuos se tomaron los datos del segundo periodo de la segunda estación seca, ya que en este muestreo se realizó la mayor cantidad de capturas. Sin embargo, los valores mínimos y máximos de tamaño y peso se obtuvieron con los datos de todos los muestreos. Se utilizó una prueba de covarianza con la categoría sexo como variable dependiente y longitud del cuerpo como covariable para demostrar el dimorfismo sexual en el diámetro del tímpano. El resultado de la covarianza se comparó con una prueba a posteriori de Tukey.

Resultados

3.1 Abundancia

Se capturó un total de 858 ranas durante las dos estaciones secas, 415 capturas en la primera estación y 443 en la segunda. El número capturas por estación fue similar ($\chi^2 = 0.91$, $gl = 1$, $P = 0.34$). Se encontró que la abundancia por intervalo (Cuadro 1) fue mayor en el tercer periodo de la primera estación y en el segundo periodo de la segunda ($F = 7.58$, $gl = 4/228$, $P < 0.001$). En los últimos periodos de cada estación seca (correspondiente a los inicios de la estación lluviosa) la abundancia por intervalo disminuyó considerablemente. La abundancia total por intervalo fue la misma durante las dos estaciones secas ($F = 0.61$, $gl = 1/57$, $P = 0.44$). La quebrada Pedregal 2 presentó la mayor abundancia durante ambas estaciones ($F = 19.68$, $gl = 2/57$, $P < 0.001$) y la abundancia en cada estación varió entre los ríos ($F = 10.917$, $gl = 2/57$, $P < 0.001$) (Fig. 2).

Si se toma en cuenta los cinco periodos de ambas estaciones (Cuadro 2), se capturó más juveniles en la primera estación seca ($\chi^2 = 17.60$, $gl = 4$, $P = 0.001$). La captura de subadultos ($\chi^2 = 11.83$, $gl = 4$, $P = 0.01$) y de adultos fue mayor en la segunda estación ($\chi^2 = 11.94$, $gl = 4$, $P = 0.02$). De manera general, la proporción de capturas por edad no fue igual entre las estaciones ($\chi^2 = 47.16$, $gl = 2$, $P < 0.001$), ya que en la primera estación seca el número de capturas fue similar en todas las edades ($\chi^2 = 3.74$, $gl = 2$, $P = 0.16$) pero en la segunda la mayor cantidad fue de subadultos ($\chi^2 = 64.77$, $gl = 2$, $P < 0.001$). En adultos (Fig. 3), la proporción de machos sobre hembras fue cercana a 3:1 a lo largo de la primera estación seca ($\chi^2 = 1.22$, $gl = 4$, $P = 0.87$) y cercana a 2:1 en la segunda estación, aunque esto no se observó en los últimos dos periodos ($\chi^2 = 6.02$, $gl = 4$, $P = 0.20$).

3.2 Distribución espacial y uso de hábitat

El índice de dispersión mostró un patrón espacial agregado en todos los periodos (Cuadro 3). La actividad más registrada por sexo fue la de mantenerse posado sobre un sustrato ($G = 19.69$, $gl = 4$, $P < 0.001$), principalmente rocas ($G = 104.64$, $gl = 8$, $P < 0.001$). Los juveniles utilizaron los sustratos en diferente proporción que los machos y las hembras ($G = 133.32$, $gl = 8$, $P < 0.001$) (Cuadro 4).

3.3 Dimorfismo sexual

Las hembras fueron más grandes ($F = 147.80$, $gl = 4/176$, $P < 0.001$) y pesadas ($F = 72.67$, $gl = 4/176$, $P < 0.001$) (Cuadro 5). Con respecto al DT, éste varía por sexo ($F = 200.03$, $gl = 2/176$, $P < 0.001$) y tamaño ($F = 112.85$, $gl = 1/176$, $P < 0.001$) (Fig. 4). Los machos (adultos y subadultos) varían con hembras (Tukey = 1.68, $P < 0.001$) y juveniles (Tukey = 1.62, $P < 0.001$). Juveniles y hembras no varían (Tukey = 0.06, $P = 0.86$).

Discusión

En ambas estaciones secas la abundancia de ranas fue similar, lo que indica la estabilidad que presentaron las poblaciones de *C. ranoides* en el área de Santa Elena durante el periodo de estudio. Esta aparente estabilidad concuerda con los datos de Puschendorf et al. (2005) y Zumbado et al. (2007) quienes comunican un número considerable de individuos en pequeños transectos de algunos ríos de la Península de Santa Elena.

En escala temporal, la agregación de ranas de *C. ranoides* aumentó conforme avanzó la estación seca. Esto porque el nivel de los ríos desciende y en algunas partes se seca completamente, por lo que los individuos tienden a agruparse en pozas y pequeñas caídas de agua o se mueven hacia las nacientes. Este patrón se observó también en otras especies que

no están asociadas a ríos como *C. fitzingeri*, *Leptodactylus melanonotus* y *L. poecilochilus*, lo que demuestra que en este caso el agua es posiblemente el factor limitante que explica las agregaciones de anuros durante la estación seca.

La fuerte disminución en la abundancia en el último periodo de cada estación seca (inicios de la época lluviosa) se debe probablemente al fuerte incremento de la corriente. Este punto ya había sido mencionado por Savage (2002) quién indica que las ranas del grupo *C. rugulosus* son muy difíciles de encontrar en los ríos durante la estación lluviosa. Las fuertes corrientes podrían arrastrar a los juveniles causándoles lesiones e incluso la muerte. Durante una noche lluviosa en enero del 2007 dos individuos juveniles se encontraban sobre ramas que estaban encima de la corriente, probablemente para protegerse del aumento en el caudal del río; esta conducta nunca había sido descrita en esta especie. Es posible que la poca abundancia de ranas de *C. ranoides* en los ríos durante la estación lluviosa se deba a que las ranas entren al bosque. En varias ocasiones en noches lluviosas durante julio del 2007 y 2008 se encontraron adultos movilizándose varios metros fuera del río, incluso a orillas del camino, lo cuál consituye un reporte nuevo para esta especie.

Dentro del grupo *C. rugulosus*, solo el estudio de Ryan et al. (2008) analiza patrones de abundancia entre adultos. Ellos encontraron para la especie *C. punctariolus* una proporción de 1:1 entre machos y hembras. En el presente trabajo la proporción de machos de *C. ranoides* fue mayor durante la mayor parte del tiempo.

Respecto al grupo *C. rugulosus*, Ryan et al. (2008) muestran un análisis del uso y preferencia de sustrato por parte de *C. punctariolus*. Al compararlo con este estudio se encontró un uso diferente del sustrato según el sexo por parte de *C. ranoides*, similar a lo descrito por Ryan et al. (2008). Ambas especies estuvieron más frecuentemente sobre rocas,

sin embargo debido a las condiciones semidecidualas del bosque tropical seco, muchos individuos de *C. ranoides*, principalmente juveniles estaban sobre la hojarasca en el agua y junto a los márgenes de los ríos, lo que difiere con los resultados para *C. punctariolus*. Similar a lo comentado por otros autores (Savage, 1975, 2002; Campbell, 1998; Campbell y Savage, 2000; McCranie y Wilson 2002), las especies del grupo *C. rugulosus* presentan poca movilidad durante la noche, y son generalmente encontradas sobre sustratos cercanos a los ríos donde habitan. Este patrón coincide con en este estudio, ya que sin importar la edad o el sexo, la mayoría de ranas estaban sobre rocas.

Los resultados morfométricos de juveniles y de adultos coinciden con los de Campbell y Savage (2000) y Savage (2002). En este estudio se caracteriza por primera vez a los subadultos. Como ocurre en la mayoría de anuros y en todas las especies del grupo *C. rugulosus*, las hembras presentaron mayor tamaño y peso que los machos. Este dimorfismo sexual está generalmente asociado a la posición del macho en el amplexo (Zug et al., 2001). Con respecto al diámetro del tímpano, este fue mayor en machos independientemente del tamaño (Fig. 6). Este dimorfismo está generalmente asociado a la posesión de un canto de advertencia en machos (Brenowitz et al., 2001; Kelley et al., 2001) lo que concuerda con la posibilidad de que esta especie presente este tipo canto, a diferencia de las descripciones dadas por Savage (2002).

Las poblaciones de la especie *C. ranoides* de la Península de Santa Elena parecen ser estables en su abundancia. Presentan una distribución agrupada durante la época seca en respuesta a la pérdida de agua en los ríos. Los datos morfométricos y las comparaciones sobre uso de sustrato concuerdan con otros estudios en otras especies del grupo *C. rugulosus*. Se recomienda realizar nuevos monitoreos en estas poblaciones debido a su

status de especie en peligro crítico así como para determinar cambios en la abundancia por sexo y edad.

Agradecimientos

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICIT), al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICIT) y al Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad de Costa Rica por el apoyo financiero para realizar el proyecto. A IdeaWild por la donación de equipo. A los miembros del comité revisor, F. Bolaños, G. Barrantes G. Gutiérrez-Espeleta por su apoyo durante la realización del proyecto. A R. Puschendorf, K.R. Lips, G. Chaves y A. García por su colaboración. A los asistentes de campo.

REFERENCIAS

- Brenowitz, E.A., Rose, G.J., Alder, T., 2001. The Neuroethology of Acoustic Communication in Pacific Treefrogs. In: Ryan, M. (Ed.) Anuran communication. Smithsonian Institution Press, Washington, pp. 145-155.
- Bolaños, F., Ehmcke, J., 1996. Anfibios y reptiles de la Reserva Biológica San Ramón, Costa Rica. *Revista Pensamiento actual* 2, 107-112.
- Bolaños, F., Castro, F., Cortez, C., De la Riva, I., Grant, T., Hedges, B., Heyer, R., Ibáñez, R., La Marca, E., Lavilla, E., Leite-Silvano, D., Lötters S., Parra-Ólea G., Reichle, S., Reynolds, R., Rodríguez L., Santos-Barrera, G., Scout, N., Ubeda, C., Veloso, A., Wilkinson, M., Young, B., 2008. Amphibians of the Neotropical Realm. In: Stuart, S.N., Hoffmann, M., Chanson, J.S., Cox, N.A., Berridge, R.J., Ramani, P., Young,

- B.E. (Eds.) Threatened Amphibians of the World. Linx Editions, New York, pp. 92-99.
- Campbell, J.A., 1998. Amphibians and Reptiles of Northern Guatemala, the Yucatan, and Belize. Universidad de Oklahoma, Oklahoma, USA.
- Campbell, J.A., Savage J.M., 2000. Taxonomic reconsideration of Middle American frogs of the *Eleutherodactylus rugulosus* group (Anura: Leptodactylidae): a reconnaissance of subtle nuances among frogs. Herpetological Monographs 14, 186-292.
- Crump, M.L., Hensley, F.R., Clark, K.L., 1992. Apparent decline of the Golden Toad: Underground or extinct? Copeia, 1992, 413-420.
- Fellers, G.M., Drost, C.A., 1993. Disappearance of the cascades frog *Rana cascadae* at the southern end of its range, California, USA. Biological Conservation 65, 177-181.
- Hartshorn, G.S., 1983. Plants: Introduction. In: Janzen, D.H. (Ed.), Costa Rica Natural History. Universidad de Chicago, Chicago, pp. 118-157.
- Hayes, M.P., 1985. Nest structure and attendance in the stream-dwelling frog, *Eleutherodactylus angelicus*. Herpetological Review 19, 169-171.
- Hedges, S.B, Duellman, W.E., Heinicke, M.P., 2008. New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): Molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. Zootaxa 1737, 1-182.
- Kelley, D.B., Tobias, M.L., Hornig, S., 2001. Producing and Perceiving Frog Songs: Dissecting the Neural Bases for Vocal Behaviors in *Xenopus laevis*. In: Ryan, M. (Ed.) Anuran communication. Smithsonian Institution Press, Washington, 156-166.
- Krebs, C.J., 1999. Ecological Methodology. Addison-Wesley, Nueva York., EEUU.

- Krigger, K.M., Hero, J.M., 2006. Survivorship in wild frogs infected with chytridiomycosis. *EcoHealth* 3, 171-177.
- La Marca, E., Lips, K.R., Lötters, S., Puschendorf, R., Ibáñez, R., Rueda-Almonacid, J.V., Schulte, R., Marty, C., Castro, F., Manzanilla-Puppo, J., García-Pérez, J.E., Bolaños, F., Chaves, G., Pounds, J.A., Toral, E., Young, B.E., 2005. Catastrophic population declines in neotropical harlequin frogs (Bufonidae: *Atelopus*). *Biotropica* 37, 190-201.
- Lips, K.R., 1998. Decline of a tropical montane amphibian fauna. *Conservation Biology* 12, 106-117.
- Lips, K.R., 1999. Mass mortality of the anuran fauna at an upland site in Panama. *Conservation Biology* 13, 117-125.
- Lips, K.R., Reaser, J., Young, B., Ibáñez, R., 2001. Monitoreo de Anfibios en América Latina: Manual de Protocolos. Sociedad para el Estudio de Anfibios y Reptiles. EEUU.
- Lips, K.R., Green, D.E., Papendick, R., 2003a. Chytridiomycosis in wild frogs from southern Costa Rica. *Journal of Herpetology* 37, 215-218.
- Lips K.R., Reeve, D., Witters, L.R., 2003b. Ecological traits predicting amphibian population declines in Central America. *Conservation Biology* 17, 1078-1088.
- Lips, K.R., Mendelson III, J.R., Muñoz-Alonso, A., Canseco-Marquez, L., Mulcahy, D.G., 2004. Direct evidence of declines in amphibian populations in montane southern Mexico. *Biological Conservation* 119, 555-564.
- Lips, K.R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J.D., Alford, R.A., Voyles, J., Carey, C., Livo, J., 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 Science USA* 103, 3165-3170.
- Lips, K.R., Diffendorf, J., Mendelson, J.R., III, Sears, M.W., 2008. Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLOS Biology* 6:441-453
- McCranie, J.R., Wilson, L.D., 2002. *The Amphibians of Honduras*. Sociedad para el Estudio de Anfibios y Reptiles, Ithaca, NY, EEUU.
- Pounds, J.A. 2001. Climate and amphibian declines. *Nature* 410, 639-640.
- Pounds, J.A., Crump, M.L., 1994. Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Conservation Biology* 8, 72-85.
- Pounds, J.A., Fogden, M.P.L., Savage, J.M., Gorman, G.C., 1997. Test of null models for amphibian declines on a tropical mountain. *Conservation Biology* 11, 1307-1322.
- Pounds, J.A., Fogden, M.P.L., Campbell, J.H., 1999. Biological response to climate change on a tropical mountain. *Nature* 398, 611-615.
- Puschendorf, R., 2003. *Atelopus varius* (harlequin frog) fungal infection. *Herpetological Review* 34, 355.
- Puschendorf, R., Chaves, G., Crawford, A.J., Brooks, D.R., 2005. *Eleutherodactylus ranoides*. Dry forest population, refuge from decline? *Herpetological Review* 36, 53.
- Puschendorf, R., Bolaños, F., Chaves, G., 2006a. The amphibian chytrid fungus along an altitudinal transect before the first reported declines in Costa Rica. *Biological Conservation* 132, 136-142.
- Puschendorf, R., Castañeda, F., McCranie, J.R., 2006b. Chytridiomycosis in wild frogs from Pico Bonito National Park, Honduras. *EcoHealth* 3, 178-181.

- Puschendorf, R., Carnaval, A.C., VanDerWal, J., Zumbado-Ulate, H., Chaves, G., Bolaños, F., Alford, R.A., 2009. Distribution models for the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in Costa Rica: proposing climatic refuges as a conservation tool. *Diversity and Distributions* 15, 401-408.
- Retallick, R.W.R., McCallum, H., Speare, R., 2004. Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community post-decline. *PLOS Biology* 2, 1965-1971.
- Ryan, M.J., Lips, K.R., Eichholz, M.W., 2008. Decline and extirpation of an endangered Panamanian stream frog population (*Craugastor punctariolus*) due to an outbreak of chytridiomycosis. *Biological Conservation* 141, 1636-1647.
- Sasa, M., Solórzano, A., 1995. The reptiles and amphibians of Santa Rosa National Park, Costa Rica, with comments about the herpetofauna of xerophytic areas. *Herpetological Natural History* 3, 113-126.
- Savage, J.M., 1975. Systematics and distribution of the Mexican and Central American stream frogs related to *Eleutherodactylus rugulosus*. *Copeia* 1975, 254-306.
- Savage, J.M., 2002. *The Amphibians and Reptiles of Costa Rica: a Herpetofauna Between Two Continents, Between Two Seas*. Universidad de Chicago, Chicago.
- Skerratt, L.F., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., McDonald, K.R., Phillott, A.D., Hines, H.B., Kenyon, N., 2007. Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth* 4, 125-134.
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L., Waller, R.W., 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306, 1783-1786.

- UICN., 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1. <www.iucnredlist.org>. Descargado el 16 de julio del 2009.
- 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 USA* 104, 8201-8202.
- Whiles, M.R., Lips, K.R., Pringle, C.M., Kilham, S.S., Bixby, R.J., Brenes, R., Connelly, S., Colón-Gaud, J.C., Hunte-Brown, M., Hury, A.D., Montgomery, C., Peterson, S., 2006. The effects of amphibian population declines on the structure and function of Neotropical stream ecosystems. *Frontiers Ecological Environment* 4, 27-34.
- Woodhams, D.C., Alford, R.A., 2005. Ecology of chytridiomycosis in rainforest stream frog assemblages of tropical Queensland. *Conservation Biology* 19, 1449-1459.
- Young, B.E., Lips, K.R., Reaser, J., Ibáñez, R., Salas, A., Cedeño, R., Coloma, L.M., Ron, S.R., La Marca, E., Meyer, J., Muñoz, A., Bolaños, F., Chaves, G., Romo, D. 2001. Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conservation Biology* 15, 213-1223.
- Zug, G.R., Vitt, L.J., Caldwell, J.P., 2001. *Herpetology: an Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Academic Press, California.
- Zumbado-Ulate, H., Puschendorf, R., Chavarría, M.M., 2007. *Eleutherodactylus ranoides* (NCN) Distribution. *Herpetological Review* 38, 184-185.

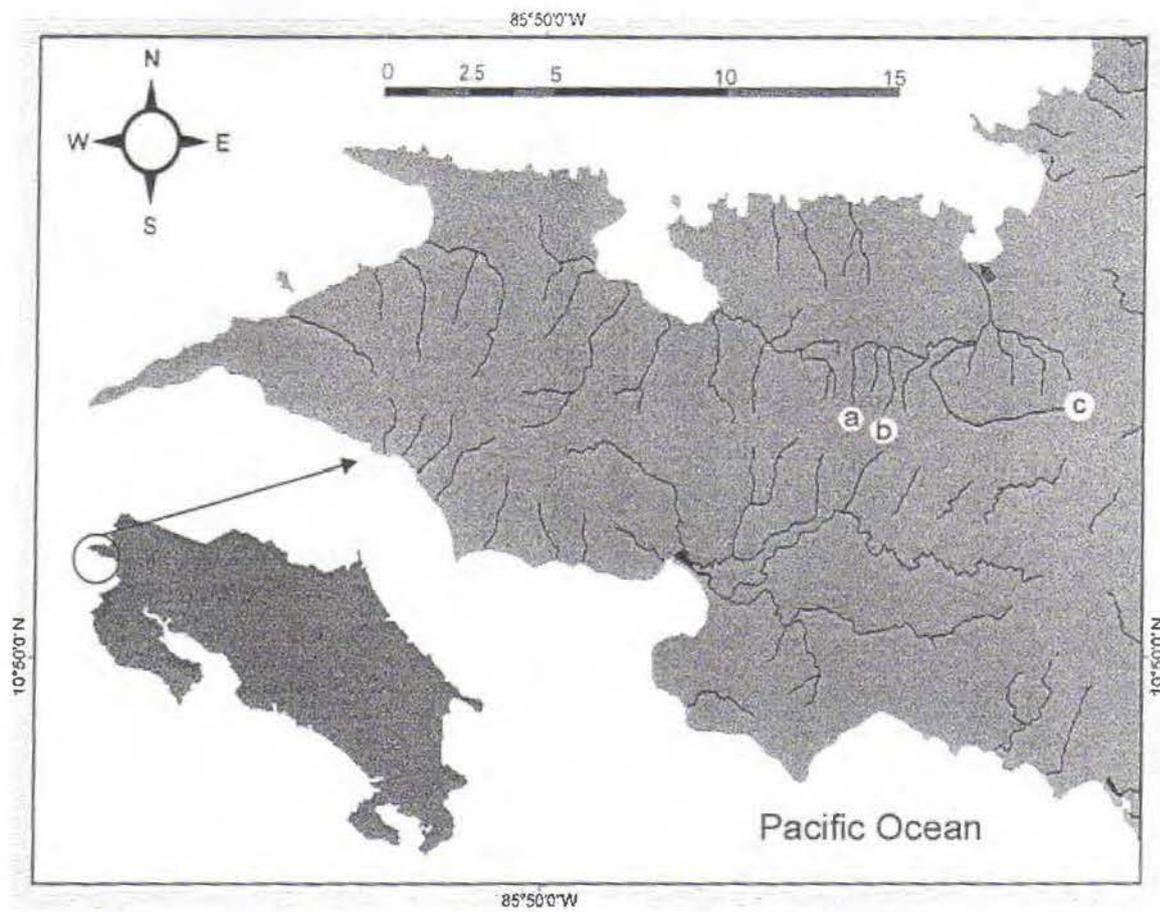


Fig. 1. Ubicación geográfica de los tres ríos, Península de Santa Elena, Costa Rica, 2006-2008. A- Quebrada Pedregal 1; B- Quebrada Pedregal 2; C- Río Murciélago.

Cuadro 1. Promedio y error estándar de la abundancia por periodo y total de *C. ranoides* en dos estaciones secas, Península de Santa Elena, 2006-2008.

Estación	Periodo	Abundancia	Total
	1	0.77 ± 0.89	
	2	1.77 ± 1.83	
1	3	2.18 ± 2.17	1.38 ± 1.57
	4	1.78 ± 1.80	
	5	0.42 ± 0.63	
	1	1.22 ± 1.12	
	2	3.00 ± 2.03	
2	3	1.87 ± 1.62	1.48 ± 1.54
	4	1.10 ± 1.11	
	5	0.20 ± 0.32	

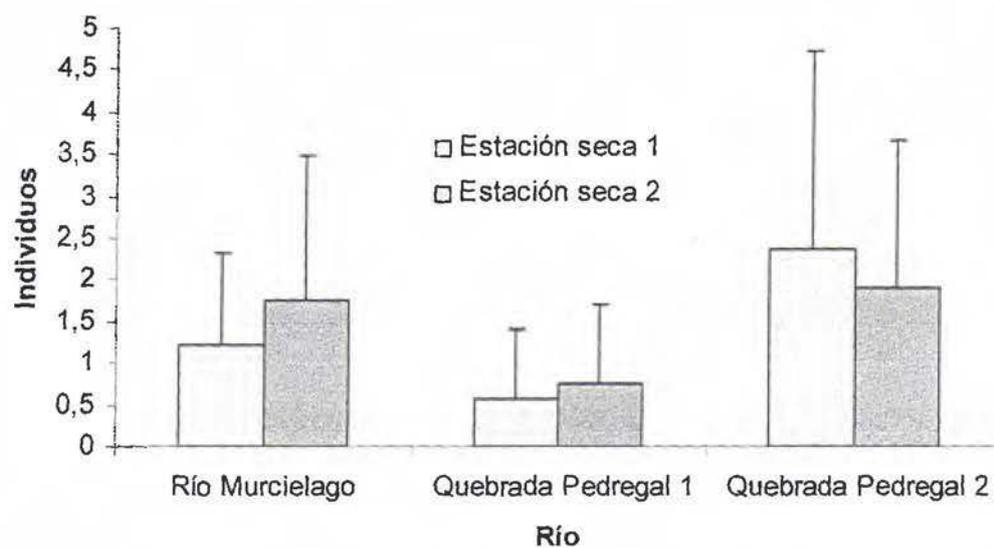
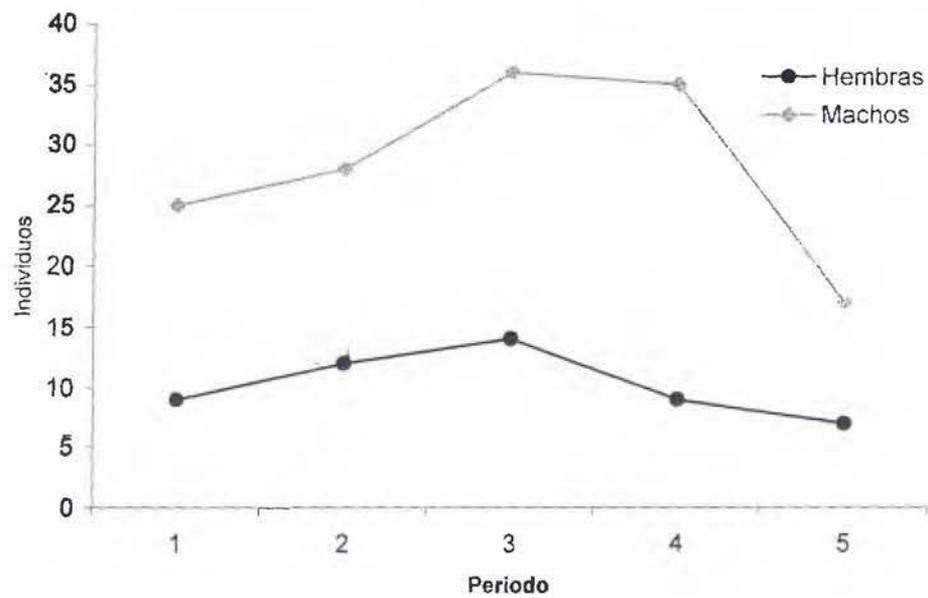


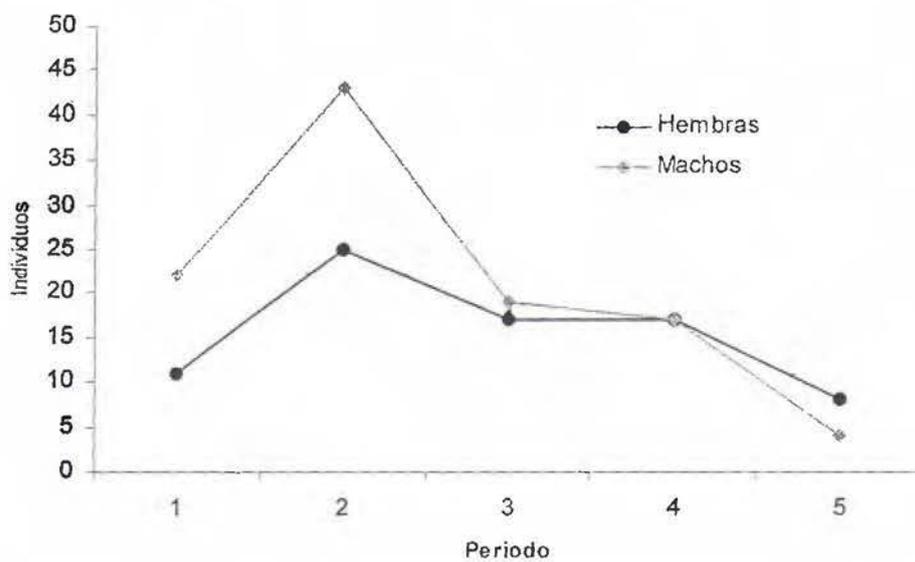
Fig. 2. Promedio y error estándar de la abundancia de *C. ranoides* en cada río en dos estaciones secas, Península de Santa Elena, 2006-2008.

Cuadro 2. Captura total por edad en cada periodo a lo largo de dos estaciones secas en *C. ranoides*. Península de Santa Elena, 2006-2008.

Estación	Periodo	Juveniles	Subdultos	Adultos
1	1	7	13	26
	2	41	37	28
	3	49	42	40
	4	47	28	32
	5	1	0	24
2	1	7	39	27
	2	37	91	52
	3	24	54	34
	4	8	30	28
	5	0	0	12
Total		221	334	303



(A)



(B)

Fig. 3. Captura total por sexo en adultos de *C. ranoides*, Península de Santa Elena, 2006-2008. A) Estación seca 1 B) Estación seca 2.

Cuadro 3. Valores del índice de dispersión (I) y distribución espacial agregada en *C. ranoides* durante dos estaciones secas, Península de Santa Elena, 2006-2008.

Estación	Periodo	N	I	χ^2
1	1	46	2.36	139.36
	2	106	3.91	230.86
	3	131	3.63	214.52
	4	107	4.05	239.14
2	1	73	2.35	138.77
	2	180	2.28	134.86
	3	112	2.83	167.02
	4	66	2.62	154.78

*gl = 59; P < 0.01

Cuadro 4. Total de capturas de la especie *C. ranoides* según sexo, actividad y sustrato
 Península de Santa Elena, 2006-2008.

		Actividad			Sexo		
		Posado	Saltando	Nadando	Juvenil	Hembra	Macho
	Piedra	725	34	0	410	115	234
	Sedimentos	6	0	0	6	0	0
Sustrato	Hojarasca	70	12	0	61	12	9
	Ramas	8	0	0	5	1	2
	Agua	0	0	3	1	1	1
	Juvenil	454	28	1			
Sexo	Hembra	121	7	1			
	Macho	234	11	1			

Sedimentos: arena, grava y barro

Cuadro 5. Promedio y error estándar, valores mínimos y máximos de tamaño (LHC) y peso en los individuos de *C. ranoides*, Península de Santa Elena, 2006-2008.

Edad-Sexo	N	LHC (mm)			Peso (g)		
		Promedio	Mínimo	Máximo	Promedio	Mínimo	Máximo
Juvenil	37	20.86 ± 3.17	8.30	24.00	1.04 ± 0.42	0.50	2.50
Subadulto hembra	75	31.65 ± 3.47	25.40	39.90	3.52 ± 1.37	2.10	9.00
Subadulto macho	16	28.96 ± 2.11	25.00	33.90	2.77 ± 0.60	2.00	5.50
Hembra	25	49.16 ± 7.64	40.00	70.30	14.49 ± 7.05	6.20	34.00
Macho	27	37.60 ± 1.91	28.50	45.40	6.05 ± 0.71	3.00	10.00

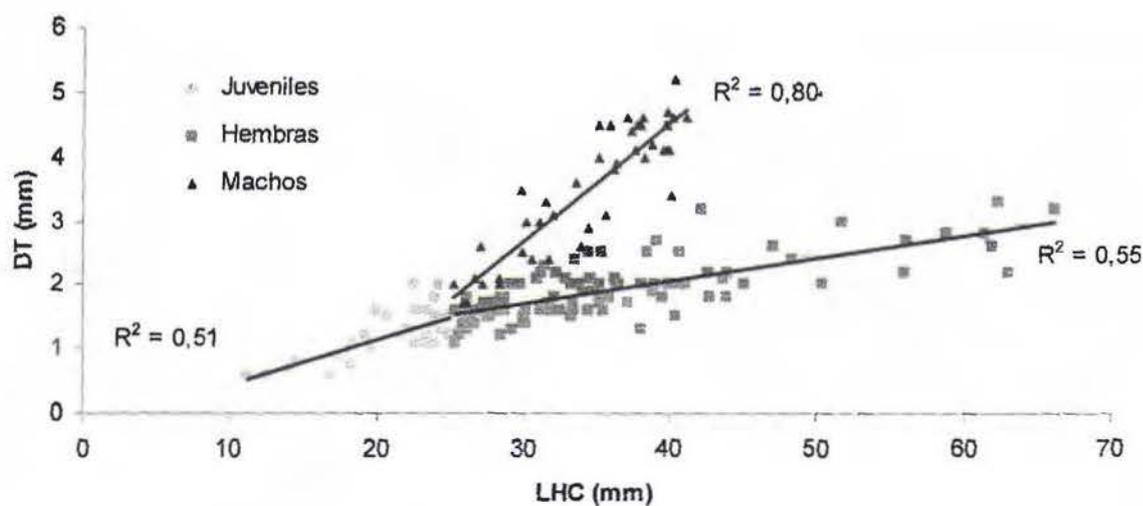


Fig. 4. Dimorfismo sexual en el diámetro del tímpano en *C. ranoides*, Península de Santa Elena, 2006-2008.