

## Aportaciones al conocimiento del impacto de *Batrachochytrium dendrobatidis* en España

Saioa Fernández-Beaskoetxea & Jaime Bosch

Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC). Cl. José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid. España. C.e.: bosch@mncn.csic.es

**Fecha de aceptación:** 5 de diciembre de 2016.

**Key words:** chytridiomycosis, ranavirosis, *Batrachochytrium dendrobatidis*, amphibian decline, Spain.

A las múltiples amenazas que afectan a los anfibios ibéricos durante las últimas décadas, en épocas recientes se ha sumado la quitridiomycosis. El agente causal de esta enfermedad emergente es el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, también conocido como el “hongo asesino” por afectar a más de 700 especies en todo el mundo y ser responsable del declive y la extinción de muchas de ellas (Lips, 2016). Este nuevo género del orden Chytridiales fue descrito formalmente en 1999 (Longcore *et al.*, 1999), siendo el primer y único caso conocido de infección por hongos quitridios en vertebrados. El hongo se reproduce por zoosporas acuáticas que son liberadas al medio e infectan tanto a las larvas como a los adultos, aunque las mortalidades masivas en climas templados suelen suceder al final de la metamorfosis (Bosch *et al.*, 2001; Garner *et al.*, 2009). En general, prefiere temperaturas frescas y detiene su crecimiento, e incluso muere, a altas temperaturas (Piotrowsky *et al.*, 2004). *Batrachochytrium dendrobatidis* (en adelante *Bd*) ha sido detectado ya en más de 50 países y, preocupantemente, los mayores declives conocidos se han producido en zonas tropicales con alta diversidad de anfibios, pero también en áreas de montaña bien conservadas en zonas templadas (revisión en Lips, 2016). Estos requerimientos ambientales del patógeno hacen de los sistemas montañosos ibéricos lugares idóneos para la implantación y la permanencia del hongo, como así ha sucedido desde finales de la década de 1990 hasta la actualidad.

### ¿Qué impacto produce *Bd* en las zonas templadas?

Desde los primeros registros de mortalidades masivas por *Bd* en Australia y Centroamérica, mucho hemos aprendido sobre su biología y sobre la dinámica de la enfermedad. Sin embargo, en los veranos de 1997, 1998 y 1999 detectamos las primeras mortalidades masivas de ejemplares recién metamorfoseados de *Alytes obstetricans* en las lagunas del Macizo de Peñalara, corazón del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama (Figura 1). En ese momento, no podíamos imaginar que un problema aparentemente circunscrito a zonas tropicales (Berger *et al.*, 1998; Daszak *et al.*, 1999; Pessier *et al.*, 1999) pudiera tener un impacto tan severo en las zonas templadas del planeta. Se trataba del primer caso de declive de anfibios



**Figura 1:** Laguna de Pájaros en el Macizo de Peñalara, Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama. Uno de los pocos núcleos de *A. obstetricans* que resistió a la epidemia de quitridiomycosis, aunque pasando de contar con más de 5.000 larvas a menos de 10.

conocido en Europa como consecuencia de la enfermedad (Bosch *et al.*, 2001) y el primer indicio de que, también en las zonas templadas, la quitridiomycosis podía producir extinciones locales y declives superiores al 90%.

Enseguida nos preguntamos si lo que estaba pasando se circunscribía sólo a la Sierra de Guadarrama y pusimos en marcha una serie de muestreos por toda la península ibérica y otras zonas de Europa, en colaboración con colegas de otros países. La respuesta fue clara: *Bd* ya estaba ampliamente distribuido por toda Europa y podría afectar a un gran número de especies, aunque de manera irregular, siendo excepcionalmente alta la prevalencia de la infección en Suiza y España (Garner *et al.*, 2005). Curiosamente, éstos eran los países europeos con mayor altitud media, lo que inducía a pensar que en zonas templadas, las áreas de montaña presentaban las condiciones climáticas más favorables para el desarrollo del patógeno.

Aunque hasta ese momento la enfermedad sólo había sido relacionada con mortalidades masivas en Australia y Centroamérica, los declives “misteriosos” de anfibios se sucedían en todo el mundo desde hacía décadas. De hecho, un tercio de las casi 7.000 especies conocidas de anfibios están catalogadas como en peligro, convirtiendo a los anfibios en el grupo más

amenazado de todos los vertebrados terrestres debido a los múltiples factores que amenazan sus poblaciones y que actúan, además, de forma sinérgica (Stuart *et al.*, 2004, 2008). La incorporación de muchas localidades de la península ibérica y de Europa como puntos favorables para el desarrollo de la quitridiomycosis amplió el rango de los modelos de nicho ecológico que se habían realizado hasta la fecha (Ron, 2005) y nuestros nuevos modelos resultaron aún más alarmantes (Rödder *et al.*, 2009). Casi toda España y grandes zonas del continente europeo se mostraban como zonas muy favorables para el desarrollo de la infección, y hasta un sexto del total de especies de anfibios analizadas, concretamente 379, presentaban su distribución total en zonas sensibles a *Bd*, ampliándose el número de especies potencialmente vulnerables y que deberían ser objeto de atención especial (Rödder *et al.*, 2009).

Además, con la incorporación de grandes zonas de Europa como hábitats susceptibles al desarrollo de la enfermedad, resultaba ya posible establecer una conexión clara entre aquellos declives catalogados como “enigmáticos” décadas atrás en varias regiones del mundo y la quitridiomycosis (Lötters *et al.*, 2009). El problema empezaba a adquirir grandes dimensiones y, sin embargo, aún sabíamos muy poco de por qué la incidencia de la enfermedad era tan desigual entre especies y entre localidades.

Así, nos centramos de nuevo en Peñalara, y comprobamos que tras el declive de *A. obstetricans*, al menos otras dos especies (*Bufo spinosus* y *Salamandra salamandra*) comenzaron a sufrir mortalidades masivas (Bosch & Martínez-Solano, 2006). En otras zonas de la península ibérica, los nuevos brotes que registramos en Pirineos, la Serra da Estrela y Mallorca tenían al género *Alytes* como protagonista indiscutible (Figura 2; Walker *et al.*, 2008, 2010; Rosa *et al.*, 2013). Cu-



**Figura 2:** Ejemplares recién metamorfoseados de *A. obstetricans* en Pirineos muertos por quitridiomycosis.



**Figura 3:** Mortalidad de *B. spinosus* por quitridiomycosis en la Laguna Grande de Peñalara.

riosamente, las tres especies más seriamente afectadas presentaban hábitos eminentemente terrestres, cuando en los trópicos las especies más susceptibles a *Bd* eran aquellas más ligadas al medio acuático. Sin embargo, las tres especies, y especialmente *Alytes*, presentan estadios acuáticos prolongados, incluso con larvas invernantes en el caso de los géneros *Alytes* y *Salamandra* en las zonas de montaña, y las mortalidades masivas se registraban en masas de agua permanentes donde la temperatura del agua nunca es demasiado elevada.

Con todo, el impacto de la enfermedad en las tres especies resultó muy desigual. Parecía que el elevado tamaño de puesta y el desarrollo larvario restringido a una estación de *B. spinosus* podría hacerle mucho más resistente a la enfermedad. No obstante, cada año gran cantidad de ejemplares recién metamorfoseados aparecían muertos alrededor de las lagunas y, sorprendentemente, muchos de ellos resultaban negativos para *Bd* tras ser analizados en el laboratorio (Figura 3). Lamentablemente, nuestras observaciones de campo

y experimentos de infección en laboratorio sugerían que la lucha contra el hongo conlleva un coste muy elevado, en términos de crecimiento y deterioro de la condición corporal, que acaba traducándose en mortalidad, incluso aunque el sistema inmunológico del ejemplar consiga terminar con el patógeno (Garner *et al.*, 2009). Así, el impacto de *Bd* sobre las poblaciones de *B. spinosus* de Peñalara quedó patente cuando, años más tarde, analizamos sus parámetros demográficos mediante el marcaje y seguimiento individual de más de 1.500 ejemplares durante cinco años (Bosch *et al.*, 2014). En la Laguna Grande de Peñalara, al contrario que en la Laguna Chica donde su carácter temporal suaviza la incidencia de *Bd*, se produce una elevada mortalidad de *B. spinosus* tras la metamorfosis. Esta baja tasa de reclutamiento, menor que la observada en otros sapos de ambientes similares (Muths *et al.*, 2011), no es suficiente para compensar la probabilidad de supervivencia de la especie y, por tanto, condena a la población a un lento, pero continuo, declive (Bosch *et al.*, 2014).

Una vez que sabíamos que la lucha de los hospedadores contra el patógeno conlleva un coste, se hacía importante poder medirlo de alguna forma. Para ello, desarrollamos un nuevo método de análisis no invasivo que nos permitía recoger la cantidad de hormona corticoesterona secretada por los organismos, pudiendo evaluar así su nivel de estrés (Gabor *et al.*, 2013a). Efectivamente, pudimos comprobar en larvas del género *Alytes* que los ejemplares infectados presentaban unos niveles de estrés muy superiores a los no infectados (Gabor *et al.*, 2013b), lo que acabaría probablemente traducándose en afecciones del sistema inmune. Las defensas inmunológicas innatas de la piel de los anfibios podrían ser la principal protección ante la infección por *Bd*, especialmente por la

producción de péptidos antimicrobianos y por las reacciones inflamatorias de la piel y, aunque aún no ha podido ser demostrado, es posible que estas reacciones incrementen aún más la vulnerabilidad de los ejemplares.

Pero *Bd* no sólo produce un elevado coste sobre los individuos o incluso su muerte, sino que ocasiona importantes alteraciones en las comunidades de anfibios. Así, la enfermedad podría estar cambiando la estructura de las comunidades, alterando las interacciones bióticas entre ellas por la diferencia de susceptibilidad entre las especies. En Peñalara, y pese a los profundos efectos adversos de *Bd* sobre *B. spinosus* descritos, fuimos testigos de la expansión de la especie tras la casi completa extinción de *A. obstetricans* (Bosch & Rincón, 2008). Experimentalmente demostramos que *B. spinosus* evita los lugares de puesta con presencia de larvas de *A. obstetricans*, quizás como consecuencia de la reducción en la condición corporal, crecimiento y supervivencia de sus larvas cuando entran en competencia con las de *A. obstetricans* (Richter-Boix *et al.*, 2007). En Peñalara vimos como la desaparición de las grandes larvas invernantes de *A. obstetricans* por *Bd*, motivó la expansión de *B. spinosus* al ocupar las lagunas permanentes que habían quedado vacías, sin sospechar que, años más tarde, se convertirían en una trampa mortal para los ejemplares recién metamorfoseados.

### **¿Por qué el impacto de *Bd* es tan variable entre especies y localidades?**

*Bd* es un patógeno generalista capaz de infectar multitud de especies de anfibios, pero a la vez presenta enormes diferencias en patogenicidad, y no sólo relacionadas con la susceptibilidad del hospedador, como parecía inicialmente. Así, una compleja red de interacciones

entre factores bióticos y abióticos modulan el desarrollo de la enfermedad, y se hace necesario conocer cómo se comportan los diferentes hospedadores, el papel que juegan los distintos estadios de desarrollo y la enorme influencia del ambiente.

A lo largo de estos años hemos ido esclareciendo cómo funcionan algunas de estas interacciones y corroborando ciertas hipótesis. Hoy sabemos que todas las especies de Peñalara son susceptibles de ser infectadas por *Bd*, pero que el grado de susceptibilidad varía enormemente de unas a otras (Fernández-Beas-koetxea *et al.*, 2016). La intensidad de la infección varía mucho en función del estadio de desarrollo de los individuos, siendo la metamorfosis el momento más crítico al coincidir la expansión de la queratina por toda la piel del ejemplar con la supresión del sistema inmune. Pero también la condición corporal de los individuos resulta clave para superar con éxito la infección (Garner *et al.*, 2009), por lo que incluso es importante considerar todo lo que sucede en los estadios larvarios que son susceptibles de albergar la infección y juegan un papel clave como reservorios y transmisores de la enfermedad.

Claramente, *Alytes* es el taxón más vulnerable a la enfermedad en Europa, pero ahora también sabemos que sus larvas, además, se comportan como super-hospedadores que mantienen y amplifican la infección en otras especies por transmisión directa (Fernández-Beas-koetxea *et al.*, 2016). Como vimos antes, su largo período larvario en zonas de montaña (hasta cinco años en Peñalara, M. García-París, comunicación personal) y su gran disco oral con abundante queratina podrían resultar claves.

Pero, sin duda, la existencia de larvas invernantes resulta determinante para el mantenimiento y la amplificación de la infección,

como pudimos comprobar mediante el estudio de las larvas invernantes de *S. Salamandra* (Medina *et al.*, 2015). Así, las interacciones entre el tipo de hábitat (charcas frente arroyos), el estadio de desarrollo (larvas invernantes frente a larvas del año) y el hidroperíodo de las masas de agua (puntos de agua permanentes frente a temporales) resultaron claves para explicar la incidencia de *Bd* en las larvas de *S. salamandra*, que se han convertido en el principal reservorio de la infección tras la desaparición de *A. obstetricans* en Peñalara. En los arroyos, las zoosporas de *Bd* son arrastradas por la corriente, por lo que la transmisión es menor y las cargas de infección son más bajas. En las charcas, la transmisión del patógeno es más fácil, pero las masas de agua temporales se calientan mucho en verano y no permiten infecciones elevadas. Sólo en las charcas permanentes, la ausencia de temperaturas elevadas hace que los niveles de infección se mantengan elevados en las larvas invernantes, que mantienen la infección todo el año y transmiten el patógeno a las nuevas larvas del año nacidas en primavera. Así, las larvas de arroyos y de charcas temporales no sucumben al patógeno y mantienen la población de *S. salamandra* de Peñalara, mientras que muchas larvas invernantes de charcas permanentes mueren al completar la metamorfosis, permitiendo a la vez la persistencia de *Bd* en el sistema.

Pero no sólo ciertos factores bióticos de los hospedadores moldean la dinámica de la quitridiomycosis, sino que el propio patógeno está también sujeto a factores intrínsecos. Al tratarse de una enfermedad emergente producida por un organismo claramente invasor, al principio no se prestó mucha atención a la variación del patógeno. Sin embargo, cuando comparamos la morfología de diferentes cul-

tivos de la península ibérica con otros de Mallorca y de Inglaterra, encontramos variaciones morfológicas importantes como el tamaño del esporangio y que, de forma reveladora, aparecían ligadas a distintos niveles de patogenicidad (Fisher *et al.*, 2009). Este hecho abrió la puerta a estudios genéticos complejos del hongo y culminó con la descripción de diversos linajes genéticos de *Bd* que ha resultado clave para entender la incidencia de la enfermedad en el mundo. Efectivamente, *Bd* no es homogéneo a lo largo y ancho de toda su área de distribución. No obstante, la forma más generalizada, y también la más patógena que se encuentra en continua expansión, es la que denominamos GPL, de sus siglas en inglés, 'global panzootic lineage', que habría surgido por recombinación genética de linajes previamente alopátricos que habrían entrado en contacto mediante movimientos artificiales de anfibios por el ser humano (Farrer *et al.*, 2011).

Inmediatamente, se puso de manifiesto la influencia de ciertos factores abióticos sobre el desarrollo de la infección. Hoy sabemos, por ejemplo, que la prevalencia de la infección en *A. obstetricans* está inversamente correlacionada con la cantidad de radiación UV y que el riesgo de mortalidad aumenta drásticamente en áreas con bajas temperaturas mínimas y elevada altitud (Bosch *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2010; Ortíz-Santaliestra *et al.*, 2011). Hasta hace relativamente poco tiempo, se pensaba que la radiación UV podría agravar el efecto de la quitridiomycosis al hacer a los anfibios más vulnerables a la enfermedad por el debilitamiento de su sistema inmune (revisión en Tevini, 1993). Esta idea resultaba razonable teniendo en cuenta que muchos declives de anfibios se habían registrado en regiones montañosas de todo el mundo, que se había constatado que *Bd* podía desarrollarse por encima de

los 5.000 m de altura y que la radiación UV parecía no afectarle en experimentos de laboratorio (Johnson *et al.*, 2003). Sin embargo, al contrario de lo esperado, cuando analizamos experimentalmente la influencia de la radiación UV en la infección de larvas de *B. spinosus* en Peñalara, observamos una prevalencia más baja en las larvas expuestas a la radiación que en las que estaban protegidas de la misma (Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2011), coincidiendo con lo que obtuvimos en poblaciones naturales de *A. obstetricans* de la península ibérica (Walker *et al.*, 2010). Esto es, la radiación UV destruye las zoosporas y contribuye, por tanto, a controlar la infección en zonas altas, aunque su efecto está supeditado a otros factores, como veremos más adelante.

Pero, sin duda, el factor abiótico que más contribuye al desarrollo de la enfermedad es la temperatura. Así, la misma modula, por un lado, la capacidad de respuesta del hospedador a la infección y, por tanto, su susceptibilidad y, por otro, la tasa de crecimiento y desarrollo del patógeno (Woodhams *et al.*, 2003; Berger *et al.*, 2004; Ribas *et al.*, 2009).

Cuando tuvimos ocasión de estudiar el efecto de *Bd* sobre las poblaciones de *A. muletensis* en Mallorca, pudimos comprobar la enorme influencia de la temperatura sobre el desarrollo de la enfermedad (Figura 4). Dos poblaciones muy próximas de la isla estaban infectadas con una prevalencia en torno al 100% en invierno (Walker *et al.*, 2008). Sin embargo, mientras que la población natural (el Torrent des Ferrerets) casi llegó a desaparecer completamente tras la introducción del hongo, la otra población (el Cocó de Sa Bova) no ha dejado de crecer desde que fue creada con el programa de reintroducción de la especie. La diferencia entre ambas poblaciones radica en su régimen de temperaturas, que

regula completamente las dinámicas entre el patógeno y el hospedador. Así, las pozas del Cocó de Sa Bova están totalmente expuestas a la insolación y las temperaturas del agua se mantienen casi todo el tiempo por encima de los 25°C, una temperatura suficiente para disminuir el crecimiento del hongo. Sin embargo, en el Torrent des Ferrerets, la ausencia de insolación directa en las pozas hace que las temperaturas se mantengan muy estables durante todo el año, y nunca superen los 20°C, lo que aumentaría la producción de zoosporas y su período con capacidad de infección (Doddington *et al.*, 2013). Por lo tanto, incluso a una escala geográfica de escasos kilómetros, las condiciones ambientales determinan completamente el impacto de *Bd* sobre las poblaciones de anfibios.

De hecho, son las temperaturas bajas, y a una corta escala temporal, el mejor predictor de la intensidad de la infección, tal y como observamos en poblaciones de *A. obstetricans* a baja altitud infectadas en Zamora (Fernández-Beaskoetxea *et al.*, 2015). Tras realizar un seguimiento exhaustivo de seis poblaciones durante un año completo registrando tanto la temperatura del agua como el grado de infección de las larvas, obtuvimos un marcado patrón estacional. La infección se corre-



**Figura 4:** Ejemplar adulto de *A. muletensis* muerto por quitridiomycosis en un torrente de la Sierra de Tramuntana.

lacionaba inversamente con la temperatura, presentando sus valores más altos (tanto en intensidad como en prevalencia de infección) en los meses más fríos del invierno. Como dijimos antes, estos resultados podrían explicarse por la falta de capacidad de las larvas para hacer frente a la infección bajo condiciones ambientales extremas, y no tanto a la patogenicidad del hongo, ya que las temperaturas registradas se encontraban fuera del rango de crecimiento óptimo del patógeno *in vitro*.

Pero la naturaleza siempre es más compleja y rara vez el estudio de un solo factor puede explicar completamente la dinámica de la infección en un determinado lugar. Así, uno de nuestros últimos estudios en Peñalara ha revelado que existen complejas interacciones entre factores bióticos y abióticos, concretamente la radiación UV, el zooplancton y la composición de las comunidades de anfibios, enmascarando el efecto del hábitat sobre la prevalencia de infección (Hite *et al.*, 2016). Por un lado, los experimentos de campo demostraron que la radiación UV, efectivamente, elimina gran cantidad de zoosporas. Sin embargo, los puntos de agua permanentes que reciben mayor radiación presentan también los niveles más altos de infección. Esta paradoja se resuelve por la existencia de dos efectos indirectos que trabajan juntos para compensar la pérdida de zoosporas por la radiación UV: la presencia de larvas invernantes en los puntos de agua permanentes, que hacen proliferar la infección, y la reducción de la cantidad de zooplancton debido a la radiación, que es un importante depredador de las zoosporas. Para complicar aún más el sistema, la diversidad de especies hospedadoras, que no está relacionada con el hidropériodo ni con la radiación, actúa contrarrestando la infección por el llamado efecto "dilución" (Searle *et al.*,

2011) y además, la presencia de urodelos favorece la infección, ya que sus larvas depredan sobre el zooplancton, depredador a su vez de zoosporas de *Bd* (Hite *et al.*, 2016).

### ¿Por qué *Bd* está actuando ahora?

Existen dos grandes hipótesis, no mutuamente excluyentes, para explicar el creciente impacto de *Bd* sobre las poblaciones de anfibios. La "hipótesis del patógeno introducido" postula que *Bd* es una especie introducida que ha ido expandiéndose mostrando el típico frente epidémico (Lips *et al.*, 2006). Esta hipótesis recibió el soporte de los primeros estudios de genética de poblaciones (Daszak *et al.*, 2003; Morehouse *et al.*, 2003) y del hecho de que existen especies invasoras muy extendidas por el ser humano que portan la enfermedad de manera asintomática, como la rana toro americana *Lithobates catesbeianus* (Garner *et al.*, 2006). Por otro lado, hace ya algunos años, algunos investigadores vieron en la "hipótesis del patógeno endémico" la única forma sensata de explicar la repentina aparición de la enfermedad en todo el mundo. Esto es, *Bd* siempre habría estado en las zonas afectadas por la enfermedad, pero un cambio en las condiciones climáticas habría favorecido su desarrollo (Pounds *et al.*, 2006). Sin embargo, todos los estudios genéticos que vinieron después de esos años apoyaron la primera hipótesis (e.g., Morgan *et al.*, 2007; James *et al.*, 2009). En España, nuestro estado de conocimiento de la situación nos llevó a buscar relaciones entre las condiciones ambientales y la intensidad de la infección en 126 poblaciones de *A. obstetricans* (Walker *et al.*, 2010). Los resultados fueron claros: como ya hemos visto, las condiciones ambientales modulaban completamente el desarrollo de la enfermedad, tal y como esta-

blece la hipótesis del patógeno endémico, sin embargo, el patrón observado de presencia del hongo era consistente con la hipótesis del patógeno introducido, es decir, las características ambientales no explicaban la presencia de este patógeno generalista que está presente, prácticamente, allí donde ha podido llegar.

Sin embargo, y como también vimos antes, el hecho de tratarse de un patógeno introducido no significa que no pueda mostrar una considerable diversificación, sobre todo si tenemos en cuenta que: 1) se trata de un organismo con capacidad de evolucionar rápidamente, 2) su expansión por todo el mundo podría haber sido anterior a lo que imaginábamos y 3) el linaje globalmente distribuido y altamente patógeno convive con linajes autóctonos en varias regiones del planeta.

De hecho, documentar la llegada de *Bd* a un territorio concreto no es fácil. Mallorca es, precisamente, uno de los pocos lugares en el mundo para el que tenemos esta certeza: tristemente, *Bd* fue introducido en la isla a través del programa de reintroducción de *A. muletensis* (Walker *et al.*, 2008). Tras la aparición del primer ejemplar recién metamórfico encontrado muerto en 2004 en Mallorca y la confirmación de que estaba infectado con *Bd*, analizamos todas las poblaciones existentes en la naturaleza, así como la historia de las reintroducciones realizadas a través del plan de recuperación de la especie en la década de 1990. Por desgracia, los ejemplares criados en el Zoo de Jersey, y que fueron liberados en Mallorca logrando un éxito sin precedentes en la recuperación de un anfibio gravemente amenazado, habían estado en contacto estrecho con ejemplares de *Xenopus gilli* de Sudáfrica. Tras la llegada de estos ejemplares a Jersey en 1991, cinco de ellos murieron junto con otros 23 *A. muletensis* de la colonia cautiva, sin que

nadie supiese explicar el motivo. Varios de estos ejemplares muertos y preservados en formol en la década de 1990 darían positivo para *Bd* cuando los analizamos, y esto explica que Mallorca sea el único lugar en el mundo donde se conoce la presencia de la cepa de *Bd* del Cabo, presente en Sudáfrica. Afortunadamente, esta cepa es menos virulenta que la GPL, y la infección quedó relegada sólo a las dos localidades que veíamos antes: el Torrent des Ferrerets y el Cocó de Sa Bova.

La especial susceptibilidad de las especies del género *Alytes*, así como la de otras especies endémicas, con distribuciones restringidas y localizadas en zonas favorables al desarrollo de la quitridiomycosis, nos impulsó a analizar la situación en otras áreas geográficas. En el norte de Marruecos, *Alytes maurus*, y en el sur peninsular, *Alytes dickhilleni*, están restringidos casi completamente a zonas montañosas idóneas para el desarrollo de la enfermedad. Nuestros muestreos en Marruecos determinaron la presencia de *Bd*, por primera vez en el norte del continente africano, en varias especies y distintas zonas del país (El Mouden *et al.*, 2011) y, aunque en ese momento no constatamos la infección en *A. maurus*, muestreos más recientes han confirmado mortalidad por *Bd* en la especie (D. Donaire & J. Bosch, datos no publicados). En el sur peninsular, nuestros muestreos llevados a cabo en toda la distribución del sapo partero bético (*A. dickhilleni*) detectaron la presencia de *Bd* en dos zonas muy alejadas entre sí, y con una prevalencia del 100%, sugiriendo una introducción reciente con escasa dispersión (Bosch *et al.*, 2013). Aunque en ese momento no detectamos mortalidad en el campo, ésta fue superior al 70% en laboratorio, confirmándose el riesgo que supondría la expansión de *Bd* para la especie. La emergencia de *Bd* en esta especie seguía

un patrón parecido al que observamos en Mallorca. Las dos únicas poblaciones infectadas se relacionaban con la actividad naturalista o investigadora, lo que ponía de manifiesto, una vez más, nuestra enorme responsabilidad como naturalistas para evitar la expansión del patógeno (Bosch *et al.*, 2013). En los últimos años, *Bd* se está extendiendo por toda su área de distribución, y las primeras mortalidades masivas registradas han dado paso a la casi total extinción de varias poblaciones que resultaban clave para la especie (J. Bosch *et al.*, datos no publicados). A lo largo del mismo año, también llevamos a cabo muestreos en todas las poblaciones existentes de *Calotriton arnoldi*, el tritón del Montseny, aunque en este caso, con resultados negativos en todas las muestras (Obón *et al.*, 2013).

Como veíamos antes, el hecho de que estemos ante un patógeno introducido no significa que no puedan existir cambios ambientales que contribuyan a exacerbar la enfermedad. Así, y dado que las áreas colonizadas por el patógeno tienen que cumplir unos requerimientos concretos para que se alcance su óptimo de crecimiento y produzca un impacto evidente, la hipótesis de la epidemia ligada a cambios ambientales o del patógeno endémico ha sido rebautizada como “hipótesis del óptimo térmico del hongo” (Pounds *et al.*, 2006). En Peñalara, nuestros análisis de los datos meteorológicos durante 28 años, antes y después de la aparición de los primeros brotes de la enfermedad (Bosch *et al.*, 2007), revelaron una asociación significativa entre ciertos cambios en las condiciones climáticas locales y la incidencia de la quitridiomycosis. El aumento de la temperatura y de la humedad en la zona fue notable justo antes de la epidemia, registrándose un aumento significativo en el número de días soleados y cálidos en julio y

agosto, cuando tiene lugar la metamorfosis y los anfibios son más vulnerables a *Bd*. Así, los efectos del calentamiento global registrados en la zona estarían aumentando el número de días con temperaturas que se encuentran dentro del óptimo de desarrollo del patógeno sin que, por supuesto, las temperaturas alcancen los valores elevados que resultan ya críticos para *Bd*. Por tanto, el calentamiento global de las zonas templadas, más notable en zonas de montaña, podría estar exacerbando la enfermedad en zonas altas, acercando la temperatura del medio al óptimo de crecimiento del patógeno. Por otro lado, el cambio climático también podría estar relacionado con la expansión del hongo hacia zonas altas de montaña, pues también en Peñalara hemos podido registrar la expansión en altitud de algunas especies más propias de zonas bajas que podrían haberse comportado como vectores de *Bd* (Bosch *et al.*, datos no publicados).

Otro efecto notable producido por el calentamiento global en zonas de montaña es el adelanto de la fecha de deshielo. Nuestros trabajos en Pirineos revelaron la implicación de este fenómeno en la intensidad de infección de tres especies que están sufriendo declives poblacionales como consecuencia de la quitridiomycosis: *Rana temporaria* (la especie local más resistente a la infección), *B. spinosus* (con una tolerancia media a la infección) y *A. obstetricans* (extremadamente susceptible). Tras más de una década trabajando en la zona, pudimos comprobar cómo el adelanto en la fecha de deshielo en la zona aumenta enormemente el grado de infección por *Bd* en las dos especies menos vulnerables, mientras que *A. obstetricans* presentaba siempre una elevada prevalencia independientemente del momento del deshielo (Clare *et al.*, 2016).

### ¿Qué podemos hacer ante esta situación?

Recientes investigaciones que hemos desarrollado también en Peñalara han demostrado, de forma esperanzadora, que el componente heredable asociado a la infección por *Bd* parece ser lo suficientemente alto como para que pueda existir una adaptación al patógeno (Palomar *et al.*, 2016). No obstante, este proceso, si llega a producirse, será largo. Y mientras sucede, muchas poblaciones de las especies altamente sensibles, y quizás incluso algunas de nuestras especies endémicas, desaparecerán. Por lo tanto, no podemos quedarnos con los brazos cruzados y debemos enfocar todas nuestras investigaciones al desarrollo de métodos paliativos de la enfermedad.

En nuestra primera revisión sobre las posibles medidas de mitigación de la enfermedad (Woodhams *et al.*, 2011) establecimos las prioridades de manejo, que se concentran en frenar la expansión del patógeno, mantener colonias cautivas seguras de las especies y poblaciones más vulnerables y desarrollar métodos de profilaxis o remedios contra la enfermedad. Sin embargo, todo intento de mitigación debe ajustarse a las condiciones ambientales para disminuir la susceptibilidad de los anfibios y/o la patogenicidad de *Bd* y no debemos centrarnos únicamente en la erradicación del patógeno o en la cría en cautividad, sino proponer tratamientos a nivel poblacional. Para ello, es necesario, primero, identificar los mecanismos de supresión de la enfermedad y, después, parametrizar las variables que regulan la infección mediante modelos testados en condiciones naturales para, finalmente, emprender procesos de manejo adaptativos en el campo en condiciones naturales.

Transcurridos algunos años desde el establecimiento de estas recomendaciones y aunque las actuaciones de conservación *ex situ* siguen siendo necesarias, son muy escasos los programas de investigación que han ensayado actuaciones *in situ* en el mundo (Garner *et al.*, 2016). Precisamente en Mallorca, el hecho de tratarse de un sistema insular, con un único hospedador, unido al ambiente extraordinariamente seco que presenta la isla y a la altísima probabilidad de que el patógeno acabe llegando a todas las poblaciones a través de los barranquistas, nos animó a emprender un intento de erradicación del patógeno pionero en el mundo (Bosch *et al.*, 2015). El trabajo, de más de cinco años, utilizando antifúngicos en laboratorio para el tratamiento de todas las larvas existentes al final del verano y el posterior secado de las pozas, recibió una atención mediática considerable (Lubik, 2010), pero culminó sin éxito con la reinfección de las poblaciones tratadas. Sin embargo, la inminente extinción local de la población del Torrent des Ferrerets (aquel de aguas frías que era una de las pocas localidades naturales donde la especie consiguió resistir), junto con la autorización de la Consejería de Medio Ambiente del Gobierno Balear, nos animó a la aplicación de un desinfectante químico en el medio una vez retirados los animales y vaciadas las pozas. De esta forma, la infección fue erradicada en cuatro de los cinco sitios tratados, y se mantuvo así durante varios años después de la aplicación. No fue el fin de la guerra contra la quitridiomycosis, pero sí un batalla ganada que demuestra que actuaciones sencillas, aunque costosas, pueden y deben llevarse a cabo mientras no contemos con otras soluciones más definitivas (Bosch *et al.*, 2015).

## Nuevas amenazas

Paralelamente al avance en el conocimiento de los mecanismos que regulan las dinámicas de la quitridiomycosis, nuevas amenazas surgen para los anfibios. Una nueva especie de hongo quitridio, *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*), originario de Asia, ha llegado ya al norte de Europa probablemente a través del comercio internacional de mascotas como los tritones del género *Cynops*. Su presencia restringida en Europa, unas pocas localidades entre Holanda, Bélgica y Alemania, ha provocado ya declives dramáticos en *S. salamandra* del norte de Europa (Martel *et al.*, 2013; Spitzenvan der Sluijs *et al.*, 2013). Nuestro análisis de más de 5.000 muestras de toda Europa y las infecciones experimentales en laboratorio de un número importante de especies de anfibios confirman que aún no se ha extendido desde su zona de introducción, pero también que se trata de otro hongo altamente patógeno para la gran mayoría de las especies de urodelos (Martel *et al.*, 2014). Su inevitable llegada a la península ibérica supondrá un nuevo reto en la conservación de nuestra herpetofauna, que debería tomar ventaja de todas nuestras experiencias y conocimientos adquiridos con *Bd*.

Por último, otro viejo patógeno conocido como causante de mortalidades masivas de anfibios, *Ranavirus*, ha cobrado relevancia recientemente. Cuando en 1992 se detectaron miles de larvas muertas de *A. obstetricans*, en un ibón del Pirineo oscense (Márquez *et al.*, 1995), con evidentes síntomas de hemorragias e inflamaciones generalizadas, se atribuyó a un crecimiento anormal de la bacteria *Aeromonas hydrophyla* y el conocido como mal de "la pata roja". Años más tarde, los ejemplares muertos que registramos en el Parque Nacional de Picos de Europa presentaban las mis-

mas características que los que observamos en Pirineos, pero esta vez ya éramos capaces de identificar su agente causal: *Ranavirus* sp. (Price *et al.*, 2014). Ahora sabemos que, contrariamente a lo que pensábamos hace sólo algunos años, *Ranavirus* es un patógeno multihospedador que no sólo produce mortalidad en poblaciones deprimidas, sino que es capaz de producir extinciones locales en poblaciones prístinas. Todo apunta a que *Ranavirus* está en proceso de expansión en Europa, una vez más, como consecuencia de la globalización, el comercio de especies y los movimientos incontrolados de animales, y su erradicación podría ser incluso más complicada que la de *Batrachochytrium* spp.

## Actuaciones futuras

Actualmente son muchos los frentes abiertos en los que estamos trabajando para intentar frenar las enfermedades emergentes de los anfibios. Por supuesto, como en cualquier enfermedad infecciosa, la principal forma de actuar contra ella es evitar su propagación, por lo que nunca debemos bajar la guardia y seguir estrictamente los protocolos de desinfección del material de campo en nuestros trabajos, que básicamente consisten en sumergirlos en lejía, o en cualquier otro desinfectante usado en sanidad animal como *Virkon*, aclarar con agua limpia y dejar secar completamente antes de ser utilizados en otro lugar. También es fundamental divulgar el problema y concienciar a la sociedad en general sobre el riesgo de entrar en contacto estrecho con los animales y, sobre todo, del enorme riesgo que supone mover ejemplares y materiales de un sitio a otro. Hay mucho trabajo por hacer con los diferentes usuarios de los cursos acuáticos, incluyendo pescadores, cazadores,

herpetólogos, piragüistas y un largo etc, para conseguir que no realicen prácticas de riesgo que podrían ser catastróficas para los anfibios.

Además, hay que seguir luchando para que se implementen medidas legales para regular más severamente, e incluso prohibir, el comercio de anfibios. La reciente reincorporación de *Bd* en el listado de especies exóticas invasoras ha sido un éxito, pero de nada servirá si no estamos atentos para que se apliquen las leyes. Para el caso de *Bsal*, actualmente estamos trabajando para constituir un sistema de vigilancia temprana de la enfermedad a nivel europeo que podría evitar la llegada de este nuevo patógeno a la península ibérica.

Uno de los campos en los que estamos trabajando actualmente es el control de especies hospedadoras y reservorios. En Peñalara, la casi desaparición de *A. obstetricans* ha hecho que los niveles de infección bajen mucho, aunque, como vimos, la presencia de larvas invernantes de *S. salamandra* asegura la permanencia de *Bd* en el medio. Por eso, en los últimos años estamos realizando experimentos piloto en campo y laboratorio para comprobar si el control de este reservorio puede romper el ciclo anual de infección de nuevos ejemplares. En algunas lagunas y charcas permanentes, y con la ayuda de voluntarios, hemos retirado después del verano una enorme cantidad de larvas de *S. salamandra*, que han sido mantenidas en laboratorio hasta su metamorfosis. Con esta acción, en la primavera temprana, las nuevas larvas del año de *B. spinosus* y de *S. salamandra* no han entrado en contacto con larvas invernantes de salamandra altamente infectadas.

Otro campo abierto es el uso de bacterias anti-*Bd* para proporcionar una ayuda extra a los animales. Recientemente, hemos aislado una cepa de *Pseudomonas fluorescens* de ejem-

plares adultos de *A. obstetricans* de Peñalara que, en el laboratorio, inhibe el crecimiento de *Bd* (L.A. Davis *et al.*, datos no publicados). Así, los ejemplares en fase larvaria de *A. obstetricans* que estamos reintroduciendo en Peñalara reciben previamente un baño de estas bacterias (aunque con cautela dado que *Pseudomonas aeruginosa* y *P. fluorescens* pueden comportarse como patógenos en herpetos inmunodeprimidos), y pronto sabremos si les están proporcionando una ayuda efectiva para controlar el hongo.

Estos ejemplares liberados con las bacterias simbiotas anti-*Bd* han sido criados en el Centro de Cría de Anfibios Amenazados de la Sierra de Guadarrama, donde mantenemos una colonia cautiva desde 2008 creada a partir de los poquísimos ejemplares que conseguimos capturar tras el brote agudo de la enfermedad (Figura 5). Desde entonces, hemos venido reforzando la población liberando cientos de metamórficos criados en cautividad que, de momento, nos ha permitido establecer dos nuevos núcleos de cría en el Parque y mantener viva la población. Además, con la creación del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama, hemos empezado a establecer nuevas poblaciones a cotas más bajas, pero dentro del Parque, y en áreas anteriormente



Figura 5: Instalaciones del Centro de Cría de Anfibios Amenazados de la Sierra de Guadarrama.

ocupadas por la especie donde, hipotéticamente, las temperaturas más altas impedirán que *Bd* resulte letal para los animales.

Por supuesto, estos trabajos de reintroducción se han realizado tras el análisis genético de las poblaciones existentes (Albert *et al.*, 2015), al igual que estamos haciendo en la actualidad en las zonas afectadas por *Ranavirus* para futuras reintroducciones. En este caso, y al contrario que para *Bd*, nuestros primeros ensayos de inmunización de los animales son más esperanzadores, y pronto podremos probar en el campo si realmente son efectivos.

Tras casi dos décadas intentando combatir las nuevas enfermedades de los anfibios, es hora de encontrar soluciones. Aunque se trata de una tarea difícil de conseguir, debemos

explorar cualquier posibilidad, por pequeña o descabellada que pueda parecer, con el convencimiento de que si no hacemos nada, nunca avanzaremos en el control de esta pandemia.

**AGRADECIMIENTOS:** La Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid, los trabajadores del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama y, en especial, J.A. Vielva nos han apoyado sin reticencias desde el principio en toda esta lucha contra las enfermedades de los anfibios. La Consejería de Medio Ambiente de las Islas Baleares también ha respondido con valentía al reto de la quitridiomycosis, y el Parque Nacional de Picos de Europa, y especialmente A. Mora, también nos han ayudado a intentar frenar el problema de *Ranavirus*. Finalmente, Banco Santander y la Fundación BBVA han financiado gran parte de nuestra investigación en los últimos años.

## REFERENCIAS

- Albert, E.M., Fernández-Beakoetxea, S., Godoy, J.A., Tobler, U., Schmidt, B.R. & Bosch, J., 2015. Genetic management of an amphibian population after a chytridiomycosis outbreak. *Conservation Genetics*, 16: 103-111.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Earl Green, D., Cunningham, A.A., Goggin, C.L., Ron, S., Ragan, M.A., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Hines, H.B., Lips, K.R., Marantelli, G. & Parkes, H. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 9031-9036.
- Berger, L., Speare, R., Hines, H.B., Marantelli, G., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Skerratt, L.F., Olsen, V., Clarke, J.M., Gillespie, G., Mahony, M., Sheppard, N., Williams, C. & Tyler, M.J. 2004. Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Australian Veterinary Journal*, 82: 434-439.
- Bosch, J., Martínez-Solano, I. & García-París, 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. *Biological Conservation*, 97: 331-337. (doi:10.1016/S0006-3207(00)00132-4)
- Bosch, J. & Martínez-Solano, I. 2006. Chytrid fungus infection related to unusual mortalities of *Salamandra salamandra* and *Bufo bufo* in the Peñalara Natural Park (Central Spain). *Oryx*, 40: 84-89.
- Bosch, J., Carrascal, L.M., Duran, L., Walker, S. & Fisher, M.C. 2007. Climate change and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of Central Spain; is there a link? *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274(1607): 253-260.
- Bosch, J. & Rincón, P.A., 2008. Chytridiomycosis-mediated expansion of *Bufo bufo* in a montane area of Central Spain: an indirect effect of the disease. *Diversity & Distributions*, 14: 637-643.
- Bosch, J., García-Alonso, D., Fernández-Beakoetxea, S., Fisher, M.C., & Garner, T.W. 2013. Evidence for the introduction of lethal chytridiomycosis affecting wild betic midwife toads (*Alytes dickhilleni*). *EcoHealth*, 10: 82-89.
- Bosch, J., Fernández-Beakoetxea, S., Scherer, R.D., Amburgey, S.M., & Muths, E. 2014. Demography of common toads after local extirpation of co-occurring midwife toads. *Amphibia-Reptilia*, 35: 293-303.
- Bosch, J., Sanchez-Tomé, E., Fernández-Loras, A., Oliver, J.A., Fisher, M.C. & Garner, T.W. 2015. Successful elimination of a lethal wildlife infectious disease in nature. *Biology Letters*, 11: 20150874.
- Clare, F.C., Halder, J.B., Daniel, O., Bielby, J., Semenov, M.A., Jombart, T., Loyau, A., Schmeller, D.S., Cunningham, A.A., Rowcliffe, M., Garner, T.W.J., Bosch, J. & Fisher, M.C. 2016. Climate forcing of an emerging pathogenic fungus across a montane multi-host community. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 371(1709): 20150454.
- Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., Green, D.E. & Speare, R. 1999. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases*, 5: 735.
- Daszak, P., Cunningham, A.A. & Hyatt, A.D. 2003. Infec-

- tious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*, 9: 141-150.
- Doddington, B.J., Bosch, J., Oliver, J.A., Grassly, N.C., Garcia, G., Schmidt, B.R., Garner, T.W. & Fisher, M.C. 2013. Context-dependent amphibian host population response to an invading pathogen. *Ecology*, 94: 1795-1804.
- El Mouden, E.H., Slimani, T., Donaire, D., Fernández-Beas-koetxea, S., Fisher, M.C. & Bosch, J. 2011. First record of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in North Africa. *Herpetological Review*, 42: 71-75.
- Farrer, R.A., Weinert, L.A., Bielby, J., Garner, T.W., Balloux, F., Clare, F., Bosch, J., Cunninghamb, A.A., Weldon, C., du Preezd, L.H., Anderson, L., Kosakovsky Ponde, S.L., Shahar-Golana, R., Henka, D.A. & Fisher, M.C. 2011. Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 18732-18736.
- Fernández-Beas-koetxea, S., Carrascal, L.M., Fernández-Loras, A., Fisher, M.C. & Bosch, J. 2015. Short term minimum water temperatures determine levels of infection by the amphibian chytrid fungus in *Alytes obstetricans* tadpoles. *PLoS ONE*, 10: e0120237.
- Fernández-Beas-koetxea, S., Bosch, J. & Bielby, J. 2016. Infection and transmission heterogeneity of a multi-host pathogen (*Batrachochytrium dendrobatidis*) within an amphibian community. *Diseases of Aquatic Organisms*, 118: 11-20.
- Fisher, M.C., Bosch, J., Yin, Z., Stead, D.A., Walker, J., Selway, L., Brown, A.J.P., Walker, L.A., Gow, N.A.R., Stajich, J.E. & Garner, T.W. 2009. Proteomic and phenotypic profiling of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* shows that genotype is linked to virulence. *Molecular Ecology*, 18: 415-429.
- Gabor, C.R., Bosch, J., Fries, J.N., & Davis, D.R. 2013a. A non-invasive water-borne hormone assay for amphibians. *Amphibia-Reptilia*, 34: 151-162.
- Gabor, C.R., Fisher, M.C. & Bosch, J. 2013b. A non-invasive stress assay shows that tadpole populations infected with *Batrachochytrium dendrobatidis* have elevated corticosterone levels. *PLoS ONE*, 8: e56054.
- Garner, T.W.J., Walker, S., Bosch, J., Hyatt, A.D., Cunningham, A.A. & Fisher, M.C. 2005. Chytrid fungus in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 11: 1639-1642.
- Garner, T.W.J., Perkins, M.W., Govindarajulu, P., Seglie, D., Walker, S., Cunningham, A.A. & Fisher, M.C. 2006. Global distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biology Letters*, 2: 455-459 (doi:10.1098/rsbl.2006.0494)
- Garner, T.W.J., Walker, S., Bosch, J., Leech, S., Rowcliffe, J.M., Cunningham, A.A. & Fisher, M.C. 2009. Life history tradeoffs influence mortality associated with the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Oikos*, 118: 783-791.
- Garner, T.W.J., Schmidt, B.R., Martel, A., Pasmans, F., Muths, E., Cunningham, A.A., Weldon, C., Fisher, M.C., Bosch, J. 2016. Mitigating amphibian chytridiomycoses in nature. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 371: 20160207.
- Hite, J.L., Bosch, J., Fernández-Beas-koetxea, S., Medina, D., & Hall, S.R. 2016. Joint effects of habitat, zooplankton, host stage structure and diversity on amphibian chytrid. *Proceedings of the Royal Society B*, 283: 20160832.
- James, T.Y., Litvintseva, A.P., Vilgalys, R., Morgan, J.A.T., Taylor, J.W., Fisher, M.C., Berger, L., Weldon, C., du Preez, L. & Longcore, J.E. 2009. Rapid global expansion of the fungal disease chytridiomycosis into declining and healthy amphibian populations. *PLoS Pathogens*, 5: e1000458.
- Johnson, M.L., Berger, L., Philips, L. & Speare, R. 2003. Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 57:255-260.
- Lips, K.R. 2016. Overview of chytrid emergence and impacts on amphibians. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 371: 20150465.
- Lips, K.R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J.D., Alford, R.A., Voyles, J., Carey, C., Livo L., Pessier A.P. & Collins, J.P. 2006. Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 3165-3170.
- Longcore, J.E., Pessier, A.P. & Nichols, D.K. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91: 219-227.
- Lötters, S., Kielgast, J., Bielby, J., Schmidlein, S., Bosch, J., Veith, M., Walker, S.F., Fisher, M.C. & Rödder, D. 2009. The link between rapid enigmatic amphibian decline and the globally emerging chytrid fungus. *EcoHealth*, 6: 358-372.
- Lubick, N. 2010. Ecology: Emergency medicine for frogs. *Nature*, 465: 680-681.
- Márquez, R., Olmo J.L., Bosch, J. 1995. Recurrent mass mortality of larval midwife toads *Alytes obstetricans* in a lake in the Pyrenean Mountains. *Herpetological Journal*, 5: 287-289.
- Martel, A., Spitzen-van der Sluijs, A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M.C., Woeltjes, A., Bosman, W., Chiersa, K., Bossuyt, F. & Pasmans, F. 2013. *Batrachochytrium salamandrivoran* ssp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: 15325-15329.
- Martel, A., Blooi, M., Adriaensen, C., Van Rooij, P., Beukema, W., Fisher, M.C., Farrer, R.A., Schmidt, B.R., Tobler, U., Goka, K., Lips, K.R., Muletz, C., Zamudio, K.R., Bosch, J., Lötters, S., Wombwell, E., Garner, T.W.J., Cunningham, A.A., Spitzen-van der Sluijs, A., Salvidio, S., Ducatelle, R., Nishikawa, K., Nguyen, T.T., Kolby, J.E., Van Bocxlaer, I., Bossuyt, F. & Pasmans, F. 2014. Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science*, 346: 630-631.
- Medina, D., Garner, T.W.J., Carrascal, L.M. & Bosch, J. 2015. Delayed metamorphosis of amphibian larvae facilitates *Batrachochytrium dendrobatidis* transmission and persistence. *Diseases of Aquatic Organisms*, 117: 85-92.
- Morehouse, E.A., James, T.Y., Ganley, A.R., Vilgalys, R., Berger, L., Murphy, P.J. & Longcore, J.E. 2003. Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone. *Molecular Ecology*, 112: 395-403.

- Morgan, J.A., Vredenburg, V., Rachowicz, L., Knapp, R., Stice, M., Tunstall, T., Bingham, R.E., Parker, J.M., Longcore, J.E., Moritz, C., Briggs, C.J. & Taylor, J.W. 2007. Enigmatic amphibian declines and emerging infectious disease: population genetics of the frog killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 1385-1390.
- Muths, E., Scherer, R.D. & Pilliod, D.S. 2011. Compensatory effects of recruitment and survival when amphibian populations are perturbed by disease. *Journal of Applied Ecology*, 48: 873-879.
- Obón, E., Carbonell, F., Valbuena-Ureña, E., Alonso, M., Larios, R., Fernández-Beasakoetxea, S., Fisher, M.C. & Bosch, J. 2013. Chytridiomycosis surveillance in the critically endangered Montseny brook newt, *Calotriton arnoldi*, northeastern Spain. *The Herpetological Journal*, 23: 237-240.
- Ortiz-Santaliestra, M.E., Fisher, M.C., Fernández-Beasakoetxea, S., Fernández-Benítez, M.J. & Bosch, J. 2011. Ambient ultraviolet B radiation and prevalence of infection by *Batrachochytrium dendrobatidis* in two amphibian species. *Conservation Biology*, 25: 975-982.
- Palomar, G., Bosch, J. & Cano, J.M. 2016. Heritability of *Batrachochytrium dendrobatidis* burden and its genetic correlation with development time in a population of Common toad (*Bufo spinosus*). *Evolution*, 70: 2346-2356.
- Pessier, A.P., Nichols, D.K., Longcore, J.E. & Fuller, M.S. 1999. Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11: 194-199.
- Piotrowski, J.S., Annis, S.L. & Longcore, J.E. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, 96: 9-15.
- Pounds, J.A., Bustamante, M.R., Coloma, L.A., Consuegra, J.A., Fogden, M.P., Foster, P.N., La Marca, E., Masters, K.L., Merino-Viteri, A., Puschendorf, R., Ron, S.R., Sánchez-Azofeifa, G.A., Still, C.J. & Ron, S.R. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439: 161-167.
- Price, S.J., Garner, T.W., Nichols, R.A., Balloux, F., Ayres, C., de Alba, A.M.C. & Bosch, J. 2014. Collapse of amphibian communities due to an introduced *Ranavirus*. *Current Biology*, 24: 2586-2591.
- Ribas, L., Li, M.S., Doddington, B.J., Robert, J., Seidel, J.A., Kroll, J.S., Zimmerman, L.B., Grassly, N.C., Garner, T.W. & Fisher, M.C. 2009. Expression profiling the temperature-dependent amphibian response to infection by *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS ONE*, 4: e8408.
- Richter-Boix, A., Llorente, G.A. & Montori, A. 2007. Hierarchical competition in pond-breeding anuran larvae in a Mediterranean area. *Amphibia-Reptilia*, 28: 247-261.
- Rödger, D., Kielgast, J., Bielby, J., Schmidlein, S., Bosch, J., Garner, T.W.J., Veith, M., Walker, S., Fisher, M.C. & Lötters, S. 2009. Global amphibian extinction risk assessment for the panzootic chytrid fungus. *Diversity*, 1: 52-66.
- Ron, S.R. 2005. Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica*, 37: 209-221.
- Rosa, G.M., Anza, I., Moreira, P.L., Conde, J., Martins, F., Fisher, M.C. & Bosch, J. 2013. Evidence of chytrid-mediated population declines in common midwife toad in Serra da Estrela, Portugal. *Animal Conservation*, 16: 306-315.
- Searle, C.L., Biga, L.M., Spatafora, J.W. & Blaustein, A.R. 2011. A dilution effect in the emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108:16322-16326.
- Spitzen-van der Sluijs, A., Spikmans, F., Bosman, W., de Zeeuw, M., van der Meij, T., Goverse, E., Kik, M., Pasman, F. & Martel, A. 2013. Rapid enigmatic decline drives the fire salamander (*Salamandra salamandra*) to the edge of extinction in the Netherlands. *Amphibia-Reptilia*, 34: 233-239.
- 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.
- Stuart, S.N., Hoffman, M., Chanson, J.S., Cox, N.A., Berridge, R.J., Ramani, P. & Young, B.E. (eds.). 2008. *Threatened amphibian species of the world*. Lynx Edicions. Barcelona, Spain. IUCN. Gland, Switzerland. Conservation International. Arlington, Virginia, USA.
- Tevini, M. 1993. *UV-B radiation and ozone depletion: effects on humans, animals, plants, microorganisms, and materials*. Lewis. Boca Raton, Florida.
- Walker, S.F., Bosch, J., James, T.Y., Litvintseva, A.P., Valls, J.A.O., Piña, S., García, G., Rosa, G.A., Cunningham, A.A., Hole, S. & Griffiths, R. 2008. Invasive pathogens threaten species recovery programs. *Current Biology*, 18: R853-R854.
- Walker, S.F., Bosch, J., Gomez, V., Garner, T.W.J., Cunningham, A.A., Schmeller, D.S., Ninyerola, M., Henk, D.A., Ginestet, C., Arthur, C.-P. & Fisher, M.C. 2010. Factors driving pathogenicity vs. prevalence of amphibian panzootic chytridiomycosis in Iberia. *Ecology Letters*, 13: 372-382.
- Woodhams, D.C., Alford, R.A. & Marantelli, G. 2003. Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55: 65-67.
- Woodhams, D.C., Bosch, J., Briggs, C.J., Cashins, S., Davis, L.R., Lauer, A., Muths, E., Puschendorf, R., Schmidt, B.R., Sheafor, B. & Voyles, J. 2011. Mitigating amphibian disease: strategies to maintain wild populations and control chytridiomycosis. *Frontiers in Zoology*, 8: 1.