

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

***BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS EN COSTA RICA,
UN HONGO QUE ATACA ANFIBIOS***

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

ROBERT PUSCHENDORF FAHRENKRUG

**Ciudad Universitaria “Rodrigo Facio”,
Costa Rica
2004**

Dedicatoria

A mis padres, Beatriz y Roland, a mi hermano Axel, a mi abuela Peti, gracias por todo su apoyo, amor y cariño, gracias por haber respetado mis diferencias y darme el espacio necesario para crecer.

A Cata, cuyo amor, paciencia y consejo fueron fundamentales en todo este proceso.

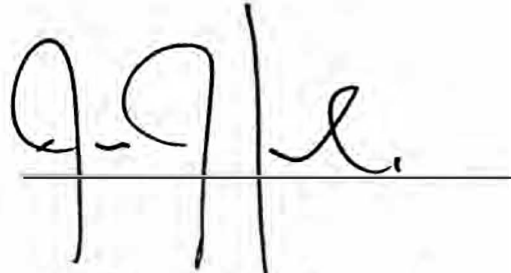
A Adelaida Chaverri y Peter Siegfried, cuyo apoyo y cariño me animaron a continuar, siempre serán recordados.

Agradecimientos

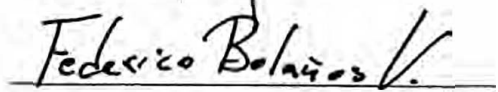
- A mi comité de tesis: Federico Bolaños y Bert Kohlmann fueron claves en mi paso de la agricultura a la biología, sin su amistad, apoyo y consejo no hubiera descubierto mi vocación real. William Eberhard, quien con mucha paciencia y ejemplo me inculcó una y otra vez que la objetividad, la reflexión y el trabajo duro son básicos para hacer ciencia. Ana Victoria Lizano, por su gran apoyo, iniciándome en el mundo de la micología y abriéndome puertas, sin las cuales nunca podría haber seguido esta línea de investigación.
- Al Dr. Alfonso Carranza y todo el personal del Laboratorio de Patología del Hospital Nacional de Niños por permitirme convivir por largo tiempo en su laboratorio. Un agradecimiento muy especial a María del Carmen Obando y Martín Sánchez por todas las horas de trabajo y apoyo, ellos fueron fundamentales para que se cumpliera este proceso.
- Lee Berger, por ayudarme a dar los primeros pasos en este campo.
- Karen Lips, por su constante apoyo como científica y una gran amistad.
- Brian Kubicki, por compartir su contagiosa pasión hacia los anfibios, por dejarme aprender de su vasta experiencia en el bosque y por su constante apoyo en el trabajo de campo.
- David Wake y el Museo de Zoología de la Universidad de Berkeley en California, por permitirme tomar muestras de tejidos de su colección.
- A los herpetólogos Andres Vaughan, Guido Saborío, Marco Barquero, Branko Hilje y Mason Ryan por todas las experiencias compartidas en estos años. Especialmente Gerardo Chaves, Alan Pounds, Andrew Crawford, Mahmood Sasa y Eduardo Toral por todos sus consejos y amistad.
- Calixto Moraga, Petrona Ríos, Elda Araya, María Marta y Felipe Chavarría, Roger Blanco, Daniel Brooks, Daniel Janzen, Winnie Hallwachs y Espinita, por todo su apoyo y tiempo durante mis estadias en el ACG.
- David Green y el National Wildlife Health Center, en Madison, Wisconsin, por la oportunidad de una pasantía claves para este proyecto.
- Christopher y Catalina Vaughan, por todo el apoyo y las muchas veces que leyeron este trabajo.
- A Idea Wild y Karen Lips por el financiamiento.
- A Javier Guevara y al Ministerio del Ambiente y Energía (MINAE), por los permisos de investigación

“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”

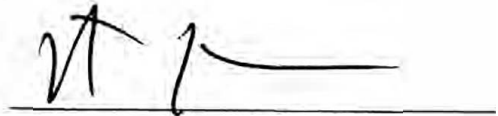
Dr. Jorge Lobo Segura
REPRESENTANTE DEL DECANO
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO



M.Sc. Federico Bolaños Vives
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Bert Kohlmann Cuesta
ASESOR



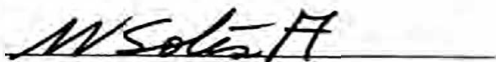
Dr. William Eberhard Crabtree
ASESOR



Dra. Ana Victoria Lizano Umaña
ASESORA



Dra. Virginia Solís Alvarado
DIRECTORA
PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOLOGIA



Índice

	Pág.
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Resumen general	vi
Lista de figuras	vii
Lista de cuadros	viii
Introducción	
Metodología	6
Resultados	11
Conclusión	13
Bibliografía	14
“Historical, taxonomic and geographic patterns of chytrid fungus presence in the integument of Costa Rican anurans: lack of correlation with subsequent declines.”	28
“Detection of <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> infections in <i>Eleutherodactylus fitzingeri</i> : effects of stain and body parts used.”	50

Resumen General

Puschendorf Fahrenkrug, Robert

Batrachochytrium dendrobatidis en Costa Rica,
un hongo que ataca anfibios.

Maestría en Biología. –San José, C.R.

R.Puschendorf F., 2004.

67h.: 5il.- 34refs.

Se propone examinar los patrones de infección de *Batrachochytrium dendrobatidis*, un hongo que crece sobre la piel de los anfibios, en especímenes colectados en el Parque Nacional Braulio Carrillo, en el año de 1986, fecha anterior a la desaparición del sapo dorado (*Bufo periglenes*) en Monteverde. Además, se propone revisar 12 partes distintas del cuerpo de 24 especímenes infectados de *B. dendrobatidis* en la rana *Eleutherodactylus fitzingeri*, utilizando dos técnicas histológicas distintas, buscando la mejor combinación (tinción x parte del cuerpo) para detectar la enfermedad.

En la primera parte se utilizó la tinción histológica Hematoxilina y Eosina. Los tejidos cutáneos se tomaron de la zona de la ingle. En la segunda parte se tomó piel de la ingle, el abdomen, la zona gular, pie y mano. Se alternó la tinción utilizando Hematoxilina y Eosina, con la tinción de PAS (Ácido Periódico de Schiff). Se hicieron varios subcortes en cada sección para poder evaluar con mayor precisión, el poder de detección de la infección en las diferentes partes del cuerpo.

La enfermedad estuvo presente en casi todas las familias de anuros, modos reproductivos y alturas categorizadas representadas en la colecta del Braulio Carrillo de 1986. No se presenta una correlación clara con las disminuciones de poblaciones de anfibios subsecuentes, las cuales están relacionadas con modos reproductivos acuáticos y con especies que se encuentran en alturas por encima de los 500 m.s.n.m. En cuanto a la evaluación de la técnica, se detectó la enfermedad con mayor frecuencia utilizando la tinción de PAS, la cual es más específica a los hongos que la de Hematoxilina y Eosina. Además la zona de la ingle fue la mejor zona para detectar la enfermedad, siendo probablemente la primera zona del cuerpo en ser infectada, por su contacto con el sustrato y por ser una zona de mucha humedad, por su importancia en la osmoregulación de los anuros.

ANFIBIOS, QUITRIDOMICETOS, EXTINCIONES, PODER DE DETECCION

Director de investigación: Federico Bolaños

Escuela de Biología

Lista de figuras

	Pág.
Fig. 1. Presencia del hongo quitridiomycete por familia en especímenes del transecto La Selva-Barva (1986). (Número en las barras son los números de animales revisados)	20
Fig. 2. Presencia del hongo quitridiomycete por altura en especímenes del transecto La Selva-Barva (1986). (Número en las barras son los números de animales revisados)	21
Fig. 3. Presencia del hongo quitridiomycete por modo reproductivo en especímenes del transecto La Selva-Barva (1986). (Número en las barras son los números de animales revisados)	22
Fig. 4. Partes del cuerpo de especímenes de <i>Eleutherodactylus fitzingeri</i> examinados	25
Fig. 5. Promedio y error estándar de infección, en las diferentes partes del cuerpo con las tinciones de H&E y PAS.	26

Lista de cuadros

	Pág.
Cuadro 1. Especies examinadas para el transecto La Selva-Barva, presencia de <i>B. dendrobatidis</i> , elevación encontrada, modo reproductivo y estado poblacional en Costa Rica.	23
Cuadro 2. Promedio de infección de quitridiomycosis en especies encontradas en Guayacán de Siquirres y en la Reserva Forestal Escalera de Mono, en la Universidad EARTH, en el año 2002.	24
Cuadro 3. Número de cortes necesarios para alcanzar el límite superior de confianza. El promedio de infección de los 24 animales infectados en la combinación de factores más poderosa en detección (PPXPAS), más los seis casos con las infecciones más leves se muestran aquí.	27

Introducción

La disminución y la extinción de varias especies de anfibios en zonas inalteradas han sido comunicadas desde la década de los ochenta (Blaustein y Wake, 1990). Durante años se ha discutido si este fenómeno es producto de una fluctuación normal en las poblaciones naturales (Pechmann *et al.*, 1991; Pechmann y Wilbur, 1994) o si realmente se trata de una extinción masiva. Pounds y colaboradores (1997), argumentaron que en Costa Rica la reducción fue demasiado drástica y masiva como para poderse considerar un fenómeno natural. Ellos utilizaron estudios basados en datos poblacionales de varios años, con lo que estimaron la probabilidad de que ocurriera la extinción en especies de anfibios por medios naturales; posteriormente compararon estos datos con el número de especies desaparecidas en Monteverde, con lo que se obtuvo como resultado que la reducción en esta zona fue mucho más pronunciada de lo que el modelo predecía como normal.

Se han realizado numerosos trabajos en los que los diferentes autores buscan un común denominador para todas las disminuciones alrededor del mundo, sin que hasta el momento se pueda encontrar uno satisfactorio. Estos estudios comprenden desde el cambio en los patrones climáticos mundiales hasta el efecto causado por el aumento de los rayos ultravioleta (Pounds y Crump, 1994; Pounds *et al.* 1999; Blaustein *et al.*, 1994; Blaustein y Wake, 1995; Pechmann y Wake, 1997; Nyman, 1986; Lips, 1998; Lips, 1999; Berger *et al.* 1998). Es posible que varios factores entren en juego a la vez, ya que cambios en el ambiente pueden producir estrés en las diferentes poblaciones naturales, y hacerlas más propensas a ataques de parásitos y patógenos (Crump y Pounds, 1985; Pounds y Crump, 1987; Carey, 1993, Pounds *et al.*, 1999).

A principios de 1999 se describe un nuevo hongo Quitridiomycete aparente patógeno de ranas, clasificado en un nuevo género, *Batrachochytrium dendrobatidis* (Longcore *et al.*, 1999). Los Quitridiomycetes están conformados por cerca de 100 géneros y más de 1000 especies, la mayoría de éstas saprófitas (Barr, 1990). Entre sus hospederos se encuentran plantas vasculares, fitoplancton, musgos, nemátodos, mosquitos, escarabajos y otros hongos (Powell, 1993). Barr (1990), opina que la importancia real de estos microorganismos radica en su papel de invasores y descomponedores de materia orgánica, incluyendo quitina, queratina, celulosa y hemicelulosa. Además algunas especies han sido descritas como vectores de virus, que causan enfermedades de importancia económica (Teakle, 1983). La mayoría de las especies cumplen con su ciclo de vida en unos pocos días y por lo general no son difíciles de aislar en un medio de cultivo si se utiliza el medio correcto (Alexopoulos *et al.*, 1996). *B. dendrobatidis* es la primera especie que se conoce como parásita de algún vertebrado (Longcore *et al.*, 1999; Powell, 1993).

B. dendrobatidis ha sido comunicado en especies de anfibios de Ecuador (Ron y Merino, 2000) Panamá, Australia (Berger *et al.*, 1998) Estados Unidos (Nichols *et al.*, 1998), España (Bosch *et al.*, 2001) , Nueva Zelandia (Richard y Waldman, sin publicar), y recientemente de Costa Rica (Lips *et al.*, 2003; Puschendorf, 2003). Berger *et al.*, (1998) sugieren que la misma especie del hongo es la encontrada en anfibios, tanto en Australia como en Panamá. Morehouse *et al.* (2003) utilizaron marcadores moleculares para confirmar parcialmente esta hipótesis. La presencia de este hongo ha sido relacionada con la disminución de al menos dos poblaciones de anfibios en el oeste de Panamá (Lips, 1999) y Costa Rica (Lips *et al.*, 2003) y se ha determinado una asociación con la muerte en anuros mantenidos en cautiverio y silvestres (Longcore, *et al.* 1999; Pessier *et al.*, 1999; Berger *et al.* 1998; Berger *et al.* 1999; Laurence *et al.*, 1996).

Longcore *et al.* (1999), afirman que *B. dendrobatidis* crece sobre la queratina de la epidermis de los anfibios, sin embargo, en los renacuajos el efecto parece ser menor, ya que aun no han desarrollado la queratina postmetamórfica. Aún así, Lips (1999) comunica haber encontrado un 12 % de larvas de hílidos con las estructuras bucales deformadas en el occidente de Panamá. Se supone que el efecto drástico de la quitridiomycosis ocurre unas pocas semanas después de la metamorfosis, cuando se inicia la formación de la queratina epidermal (Warburg *et al.*, 1994; Berger *et al.*, 1999). En Australia se comunicó una alta mortalidad en adultos de *Bufo marinus* y *Mixophyes fasciolatus* en cautiverio, los cuales pasaron por el estado larval con una tasa de mortalidad baja, pero entre la 2a y 3a semana, luego de haber salido de la metamorfosis disminuyeron en número, y alcanzaron una mortalidad superior al 90% (Berger *et al.*, 1998). Una debilidad de la mayoría de estos trabajos es que no presentan en detalle algunas observaciones clave, por ejemplo, no plantean el diseño experimental de forma clara, ni presentan datos de animales sanos e infectados (Berger *et al.*, 1998), información básica para comprender el efecto real de este patógeno. En Longcore y colaboradores (1999) donde se describe el patógeno aparece un diseño experimental débil, pues se infectan dos animales y se utilizan solo tres individuos como testigos, uno de los cuales muere por “problemas metabólicos”, sin que se describa de que forma se llegó a esta conclusión.

No se descarta que *B. dendrobatidis* pueda tener una fase saprófítica (Longcore *et al.*, 1999). Las zoósporas pueden vivir un poco más de un día en el agua (Berger *et al.* 1999), por lo que el contagio en ríos o lagunas infectadas es factible.

Los síntomas de la infección consisten en un engrosamiento del estrato córneo, dos a tres veces más de lo normal. Berger *et al.* (1998), sugieren que el quitridio causa la muerte por la

hiperplasia epidermal que afecta la respiración cutánea y la osmoregulación. El efecto podría explicarse con el hecho de que se tienda a encontrar la infección en la zona pélvica (Berger *et al.*, 1998), una zona de gran importancia fisiológica para anuros, ya que en este sitio se absorbe una gran parte del agua que requiere el organismo (Parson, 1994). Sin embargo hasta el momento no se ha hecho un trabajo en el que se examine esta supuesta relación entre la infección y problemas en la osmoregulación de los animales.

Berger *et al.* (1999) examinaron 147 casos de anfibios silvestres y en cautiverio con quitridiomycosis y encontraron enfermedades concurrentes en un 11% de los casos. No se utilizaron testigos en estos trabajos. Se encontraron otra serie de patógenos en los individuos infectados con el hongo, como septicemia (cuatro ranas), hepatitis microsporidial (una rana) dermatitis micótica hifal (dos ranas). Además se comunicó acerca de un animal con una infección de mucormycosis muy localizada, seis individuos con hiperplasia o fibrosis en la bilis, y un individuo con miositis de cuerpo extraño, factores considerados como crónicos y de poca importancia por los autores. Aún no existe ninguna publicación que presente una revisión de las infecciones tisulares, ya sea por bacterias u otros patógenos, tanto en testigos como en animales infectados por *B. dendrobatidis*.

Si es que el hongo ha contribuido a las extinciones, el hecho de que no todas las especies fueron eliminadas por igual indica que el efecto de este patógeno puede ser distinto en diferentes especies, además de que pueda haber un efecto ambiental en la relación hospedero-patógeno (Pounds y Puschendorf, 2004).

La tesis presentada consta de dos artículos científicos. “Patrones históricos, taxonómicos y geográficos de la infección de un hongo quitridiomycete en anuros de Costa Rica: poca

correlación con las disminuciones subsecuentes” escrito en el formato de la revista *Conservation Biology*, y el segundo capítulo, “La detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Eleutherodactylus fitzingeri*: efectos de tinción y partes del cuerpo utilizadas en los análisis”, el segundo capítulo de este trabajo se escribió en el formato de la revista *Journal of Herpetology*.

Con este trabajo se pretendió explorar la relación que existe en Costa Rica entre este patógeno y las disminuciones de las poblaciones de anfibios.

En cuanto al primer capítulo, existe la posibilidad de que este quitridio haya sido un factor que contribuyó, al menos en parte, en las extinciones costarricenses registradas entre 1986 y 1994, las cuales se dieron en zonas arriba de los 500 m.s.n.m. (Bolaños, 2002). Se han encontrado tres individuos de *Atelopus varius* infectados entre 1986 y 1991, (Puschendorf, 2003), por lo que históricamente el patógeno ya se encontraba en el sistema durante esas fechas. Probar esta hipótesis de forma contundente no es factible por la falta de colectas sistematizadas en las zonas sensibles durante la época. En el primer capítulo de esta investigación, se revisó una colecta de 1986, en el Parque Nacional Braulio Carrillo, en una época en donde especies claves como *Atelopus varius*, *Rana vibicaria* y *Eleutherodactylus* del grupo *rugulosus* todavía podían ser encontrados. Se planteó la hipótesis de que las especies que subsecuentemente declinaron y las especies colectadas a alturas intermedias y altas serían las que presentarían infección en su piel.

El objetivo del segundo capítulo fue el mejorar la precisión de la detección del hongo al tomar muestras que se analizarían por medio de técnicas histológicas. Es necesario saber cual es la zona idónea del cuerpo para obtener muestras de tejido. Esto podría resultar en subestimados significativos en las conclusiones que se puedan obtener sobre la tasa de infección.

Recolecta de los tejidos de la Zona Protectora en el año 1986 y de la EARTH, Guayacán en el 2001

Las muestras se obtuvieron del Museo de Zoología de la Universidad de Costa Rica y del Museo de Zoología de la Universidad de Berkeley. En total se revisaron 202 especímenes de 30 especies. Los tejidos que se tomaron de la zona de la Ingle, obteniendo al menos 3 mm² de piel de cada individuo. Juveniles con un tamaño boca-año menor a 1.5 cm o menor, no fueron considerados para el estudio, porque el daño al espécimen hubiera sido muy grande. De la misma forma se revisaron 18 especímenes de 5 especies colectados en la Reserva Forestal Escalera de Mono en la Universidad EARTH (10°14'142 N, 83°34'039 W, 40 m.s.n.m.), en Guácimo, Limón, y en Guayacán de Siquirres (10°02'597 N, 83°32'918 W, 650 m.s.n.m.).

Procesamiento de las muestras

Se colocó cada muestra en una cápsula porosa, debidamente identificada. Se lavó por 12 hr. en un flujo de agua constante, para eliminar cualquier rastro de etanol o de formalina residual. Seguidamente se colocaron las muestras en un buffer de fosfatos (Buffer de Serensen) durante 8 hr.

La fijación, deshidratación y emparafinada se realizó en un procesador Miles Scientific (Tissue Tek, VIP 3000) con ciclo programado. A lo largo del proceso de fijación y deshidratación las muestras se mantuvieron al vacío y a una temperatura constante de 40°C. Para la inclusión en parafina, se mantuvo el vacío, pero la temperatura se aumentó a 60 °C.

La fijación consta de dos ciclos de formalina de 2 hr. cada uno. La deshidratación se realizó en ciclos de 0.5 hr., primero con etanol al 70%, seguido por 2 etanoles al 95% y

finalmente con 4 etanoles al 100%. El proceso en la máquina se finalizó con 2 períodos de xilol de 0.5 hr. y de tres tratamientos en parafinas (Paraplast) de 1 hr. cada uno.

Se liberó el tejido de la cápsula para iniciar la inclusión, colocándolo en un molde con parafina líquida. Se posicionó de tal forma que se pudieran hacer los cortes transversales. Los bloques se dejaron enfriar, sobre una plataforma congelada y se liberaron después de unos 15 min, con lo que se obtuvo un bloque de parafina sólido.

Se utilizó como referencia para el tratamiento el libro de Luna (1986). Los cortes se hicieron de 3 micras de espesor. En aquellos bloques en que el tejido estuvo muy duro, se le aplicó crema humectante durante 15 min., se volvió a enfriar y se cortó nuevamente. Las tiras de parafina con el tejido se colocaron en baño María para que se estiraran y se montaran en un portaobjetos, que se colocó en un horno a 50 °C, para adherir las muestras al portaobjetos.

Tinción de Hematoxilina y Eosina

La tinción de Hematoxilina y Eosina se realizó según la metodología de Luna (1986), con ciertas modificaciones recomendadas por el personal técnico del Hospital Nacional de Niños. En la tinción de rutina, la Hematoxilina tiñe el núcleo de morado, y la Eosina colorea el resto de la célula de rosado. Para realizar la tinción, primero se desparafinó e hidrató las muestras. Este proceso consta de ciclos de 2 min. cada uno comenzando por dos períodos en xilol, seguido de etanol al 100% y último etanol al 95%. Para finalizar con la hidratación se lavó el material durante algunos minutos en un flujo de agua constante.

Una vez realizada la tinción en Hematoxilina, en la que se expuso a las muestras durante 1.5 min. al reactivo seguido de un lavado en el que se perdió el exceso de tinte; se pasó a alcohol ácido (1 parte de ácido clorhídrico 1 N, 99 partes de etanol al 100%) durante unos 10 segundos y se lavó, para que la Hematoxilina en el tejido perdiera un poco de intensidad; se contratiñó con Eosina. Antes de realizar la tinción con la Eosina se trataron los tejidos durante 10 segundos en una solución saturada de Carbonato de Litio y posteriormente se lavaron. El Carbonato de Litio se aplicó para que el morado de la Hematoxilina virara, es decir pasara de un morado intenso, casi negro, a un morado más claro para diferenciar mejor las estructuras celulares. La tinción con Eosina tardó dos minutos, y se concluyó con un último lavado en agua.

Para la deshidratación final se pasaron los tejidos, en períodos de 30 segundos, por dos baños de etanol de 95%, 2 al 100% y dos baños en xilol. Se montaron las muestras utilizando Cytoseal como medio de montaje y se dejó secar durante 20 min.

La tinción del Ácido Periódico de Schiff

La tinción del Ácido Periódico de Schiff se realizó según la metodología de Luna (1986), con ciertas modificaciones recomendadas por el personal técnico del Hospital Nacional de Niños. Se desparafina y se hidrata igual que con la tinción de H&E, pero después del lavado se ponen las muestras en ácido periódico al 2% durante 15 min. Posteriormente se lava y se expone al reactivo de Schiff por 15 min., se lava se deshidrata y se monta como en la tinción de H&E.

Revisión de los especímenes de la colecta de 1986, y de la colecta del 2001

Los especímenes utilizados para el primer capítulo de la tesis, fueron examinados utilizando únicamente cortes teñidos con la tinción de H&E. Se preparó únicamente una lámina con 6 cortes por animal.

Infecciones de *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Eleutherodactylus fitzingeri*: efecto de partes del cuerpo y tinción utilizada

En el segundo capítulo se evaluaron las técnicas histológicas que se utilizan en la mayoría de las publicaciones recientes sobre el tema. Para ello comparamos la tinción de la Hematoxilina y Eosina (H&E), con la del Acido Periódico de Schiff (PAS). Además se compararon 12 diferentes partes del cuerpo, los cinco dedos del pie, cuatro de la mano, la ingle, el abdomen y piel de la zona gular.

Se escogió a *Eleutherodactylus fitzingeri*, por ser una especie de amplia distribución, aún en las zonas secas del país como Puntarenas o Guanacaste (Savage, 2002). Además, en observaciones previas fue común detectar *B.dendrobatidis* en esta especie.

Durante 2002 y 2003, 99 especímenes de *E. fitzingeri* fueron capturados y preservados en formalina. Además los 237 especímenes del Museo de Zoología de la Universidad de Costa Rica fueron revisados. Se buscó la enfermedad en 336 especímenes, removiendo al menos 3 mm² de piel de la zona de la ingle. Las muestras se procesaron, de la manera descrita en el punto anterior,

preparando una lámina con 6 cortes, teñida en H&E y otra lámina teñida en PAS. Se evaluaron las muestras y se encontraron 24 individuos infectados.

De la zona gular (GU), el abdomen (AB) y la ingle (PP) se hicieron 6 láminas, alternando, una teñida con H&E, otra con PAS (Figura 4). Se evaluó la infección por corte (positivos o negativos).

También se hicieron cortes en la pata (T 1-5) y mano izquierda (F1-4) (Figura 4). Se descalcificaron en EDTA por 24 horas y se procesaron con el método anteriormente descrito. Tres secciones por lámina, con seis láminas alternando, H&E y PAS, fueron preparadas. Se evaluó la infección (positivo o negativo) por dedo. No se tomó en cuenta si la infección ocurría entre los dedos o en una membrana, porque se quiso simular lo que ocurriría si se estuviera realizando un estudio de marca y recaptura en el que solamente se cortan los dedos.

RESULTADOS

Distribución de las infección en las especies colectadas en el transecto La Selva-Volcán Barva en el año 1986

Se encontró *B. dendrobatidis* en 5.94% de las especies colectadas (Cuadro 1). Todas las familias, excepto la Centrolenidae presentaron individuos infectados. Treinta y tres por ciento de las 13 especies que han declinado, como *Atelopus varius* y *Rana vibicaria* tuvieron especímenes infectados, mientras que el 42% de las 18 especies que no han declinado como *Dendrobates pumilio* o *Eleutherodactylus fitzingeri* también presentaron infección. Dos especies, que subsisten

en las zonas altas, *Hyla pseudopuma* y *Eleutherodactylus podiciferus* tuvieron especímenes infectados. La infección estuvo homogéneamente distribuida entre los grupos taxonómicos ($G = 30.33$, 29 GL, $P = 0.398$), lo cual demuestra que este patógeno está adaptado a una gran cantidad de hospederos y zonas de vida (Fig. 1).

Infecciones de quitridios se encontraron en casi todas las alturas revisadas (Fig. 2). La frecuencia más alta (17.6%) ocurrió entre los 100 y los 399 m.s.n.m. También se encontró una tasa de infección moderada entre los 100-1299 m.s.n.m. y los 1900 y 2200 m.s.n.m (14.3%).

Ranas con casi todos los modos reproductivos (desarrollo directo, vegetación, lóxico, léntico) fueron encontradas infectadas ($G = 2.739$, 4 GL, $P = 0.602$). Solamente las de desarrollo directo asociadas con quebradas no, pero esto se debe probablemente al bajo número de muestras revisadas (Fig. 3).

Infecciones en Guayacán y EARTH en el año 2002

Veinticuatro por ciento de los especímenes de *Eleutherodactylus* colectados en el año 2002 en estas dos localidades estaban infectados por el patógeno (Cuadro 2). Todas las infecciones eran muy leves, con apenas algunos esporangios presentes. Esto demuestra que la enfermedad sigue ocurriendo hoy en día en ecosistemas naturales.

Poder de detección de quitridiomycosis, utilizando diferentes partes del cuerpo y dos tinciones distintas

Se encontraron más muestras infectadas utilizando la tinción de PAS que la de H&E, pero después de una prueba *a posteriori* de tukey ($F= 25.506$, $1/23$ GL, $P= <0.0001$), solamente en la zona de la ingle encontramos diferencias significativas.

Las diferencias entre las 12 diferentes partes del cuerpo también fueron significativas. La ingle y el dedo uno de la mano fueron el mejor lugar para encontrar la enfermedad ($F=8.032$, $11/253$ GL, $P= <0.0001$).

Se comparó el efecto de ambos factores con una prueba *a posteriori* de tukey, en la que se logró determinar que la mejor combinación se presentaba en la ingle y el dedo uno de la mano, utilizando PAS. La zona gular y del abdomen, fueron los lugares menos apropiados para encontrar la enfermedad (Fig. 5).

Debido a que la combinación PAS X INGLE fue la mejor, se quiso poner a prueba en los casos con las infecciones más leves. En el caso más extremo, se necesita entre 16 y 17 cortes para llegar al límite superior del 95% de confianza (Cuadro 3).

CONCLUSIONES

- Los quitridios se detectaron en el año de 1986 en una época en la que todavía se encontraban especies que posteriormente declinaron (ej. *Atelopus varius*, *Rana vibicaria* y grupo *rugulosus* de los *Eleutherodactylus*).
- Se hallaron individuos infectados, tanto en especies que posteriormente declinaron, como en especies que persisten en zonas altas, y en especies comunes en zonas bajas.
- A excepción de la familia Centrolenidae, todas las familias representadas en el estudio estuvieron infectadas.
- Casi todos los modos reproductivos tuvieron especímenes infectados.
- La enfermedad sigue siendo común hoy en día en animales de zonas bajas, queda la interrogante de que si ocurre lo mismo con las zonas altas del país.
- Las técnicas histológicas producen un gran número de negativos falsos en los análisis.
- Se encontraron más cortes infectados utilizando la tinción de PAS, que la de H&E.
- La mejor combinación de lugares para detectar infecciones fue la ingle y el dedo uno de la mano utilizando la tinción de PAS, los peores lugares fueron la zona gular y el abdomen.
- Si se utiliza la mejor combinación, con los individuos con infección más débil, se necesita más de 16 cortes, para llegar al límite superior de confianza.

Bibliografía

Alexopoulos, C.J. Mims, C.W.; Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. 4ta edición. Wiley and Sons, New York , USA. 869 p.

Barr, D.J.S.1990. Phylum Chytridiomycota. En: *Handbook of Proctista*. P 130-131. Editores Margulis, L; Corliss, J.O.; Melkonian, M. y Chapman, D.J. Jones and Bartlett, Boston, EEUU.

Berger, L.; Speare, R.; Daszak, P.; Green, D.E.; Cunningham, A.A; Goggins, C.L.; Slocombe, R.; Ragan, M.A.; Hyatt, A.D.; Mcdonald, K.R.; Hines, H.B.; Lips, K.R.; Marantelli, G. Parkes, H. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 9031-9036.

Berger, L.; Speare, R.; Hyatt, A. 1999. Chytrid fungi and amphibian declines: Overview, implications and future directions, en *Declines and Disappearances of Australian frogs*. Editado por Alastair Campbell. 54 p.

Blaustein, A.R.; Wake, D.B. 1990. Declining amphibian populations: A global phenomenon? *Trends in Ecology and Evolution*. 5: 203-204.

Blaustein, A.R.; Wake, D.B. Sousa, W.P. 1994. Amphibian declines: judging stability , persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Cons. Biol.* 8: 60-71.

Blaustein, A. R.; Wake, D. B. 1995. The Puzzle of Declining Amphibian Populations. *Scientific American*. Abril, 52-57.

Bosch J. I. Martínez-Solano, and M. García-París. 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.

Carey, C.L. 1993. Hypothesis concerning the cause of the disappearance of boreal toads from the mountains of Colorado. *Cons. Biol.* 7: 355-362.

Crump, M.L.; Pounds, J.A. 1985. Lethal parasitism of an aposematic anura (*Atelopus varius*) by *Nocheta bufonivora* (Diptera: Sarcophagidae). *J. Parasit.* 71: 588-591.

Laurence, W.F.; McDonald, K.R.; Speare, R. 1996. Epidemic disease and the catastrophic decline of Australian rainforest frogs. *Cons. Biol.* 7: 203-212.

Lips, K. 1998. Decline of a tropical montane amphibian fauna. *Cons. Biol.* 12: 106-117

Lips, K. 1999. Mass mortality and population declines of anurans at an upland site in western Panama. *Cons. Biol.* 13: 117-125.

Lips, K.R., Green, D.E., Papendick, R. 2003. Chytridiomycosis in Wild Frogs from Southern Costa Rica. *Journal of Herpetology* 37: 215-218.

Longcore, J.E.; Pessier, A.P.; Nichols, D.K. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*. 91(2): 219-227.

Luna, G. 1986. *Manual of Histologic Methods of the Armed Forces, Institute of Pathology. Third Edition*. McGraw-Hill Book Company. Washington, EEUU. 321 p.

Morehouse, E.A.; T.Y. James; A.R.D. Ganley; R. Vilgalys; . Berger; P.J. Murphy and J. Longcore. 2003. Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone. *Molecular Ecology* 12: 395-403.

Nichols, D.K.; Pessier, A.P.; Longcore, J.E. 1998. Cutaneous chytridiomycosis: an emerging disease? *Proc. Sm. Sddov. Zoo. Vet.* 269-271.

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

Parson, R.H. 1994. en *Amphibian Biology, The Integument*. Editores: Heatwhole, H. y Barthalamus, G.T. Surrey Beatty & Sons, Chipping, Australia. Vol. 1: 132-146.

Pechmann, J.H.K.; Scott, D.E.; Semlitsch, R.D.; Cladwell, J.P.; Vitt, L.J.; Bibsons, J.W. 1991. Declining amphibian populations: The problem of separating human impacts from natural fluctuations. *Science* 253: 892-895.

Pechmann, J.H.K.; Wilbur, H.M. 1994. Putting declining amphibian populations in perspective: Natural fluctuations and human impacts. *Herpetologica*. 50: 65-84.

Pechmann, J.H.K.; Wake, D.B. 1997. Declining and disappearance of amphibian populations. En: *Principles of Conservation Biology*, ed. GK Meffe, CR. Carroll. 2^ª edición. MA, EEUU. p 135-137

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 frog (*Litoria caerulea*). *J. Vet. Diagn Invest* 11: 194-199.

Pounds, J.A.; Crump, M.L. 1987. Harlequin frogs along a mountain stream: aggregation and the risk of predation by frog-eating flies. *Biotrópica* 19: 306-309.

Pounds, J.A.; Crump, M.L. 1994. Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Cons. Biol.* 8: 72-85

Pounds, J.A.; Fodgen, M.P.L.; Savage, J.M.; Gorman, G.C. 1997. Test of null models for amphibian declines on a tropical mountain. *Cons Biol.* 11: 1307-1322.

Pounds, J.A.; Fodgen, M.P.L., Campell, J.H. 1999. Biological response to climate change on a tropical mountain. *Nature.* 398: 611-615.

Pounds, J.A.; Puschendorf, R. 2004. Clouded futures. *Nature* 427: 107-109.

Powell, M.J. 1993. Looking at mycology with a Janus face: a glimpse at chitridiomycetes active in the environment. *Mycologia* 85: 1-20.

Puschendorf, R. 2003. *Atelopus varius* (Harlequin frog) fungal infection. *Herp Review.* 34(2): 355.

Ron S.R., and A. Merino. 2000. Declinación de anfibios del Ecuador: Información general y primer reporte de chytridiomycosis para Sudamérica. *Frolog* 42: 2.

Teakle, D.S. 1983. Zoosporic Fungi and Viruses, Double Trouble. P. 233-248. En: Zoosporic Plant Pathogens, A Modern Perspective. Editor: Buczacki, S.T. Academic, Londres, Inglaterra.

Warburg, M.R. ; Lewinson, D.; Rosenberg, M. 1994 en *Amphibian Biology, The Integument*.
Editores Heatwole, H. Y Barthalamus, G.T. Surrey Beatty & Sons, Chipping Norton, Australia.
Vol 1: 33-63.

FIGURAS Y CUADROS

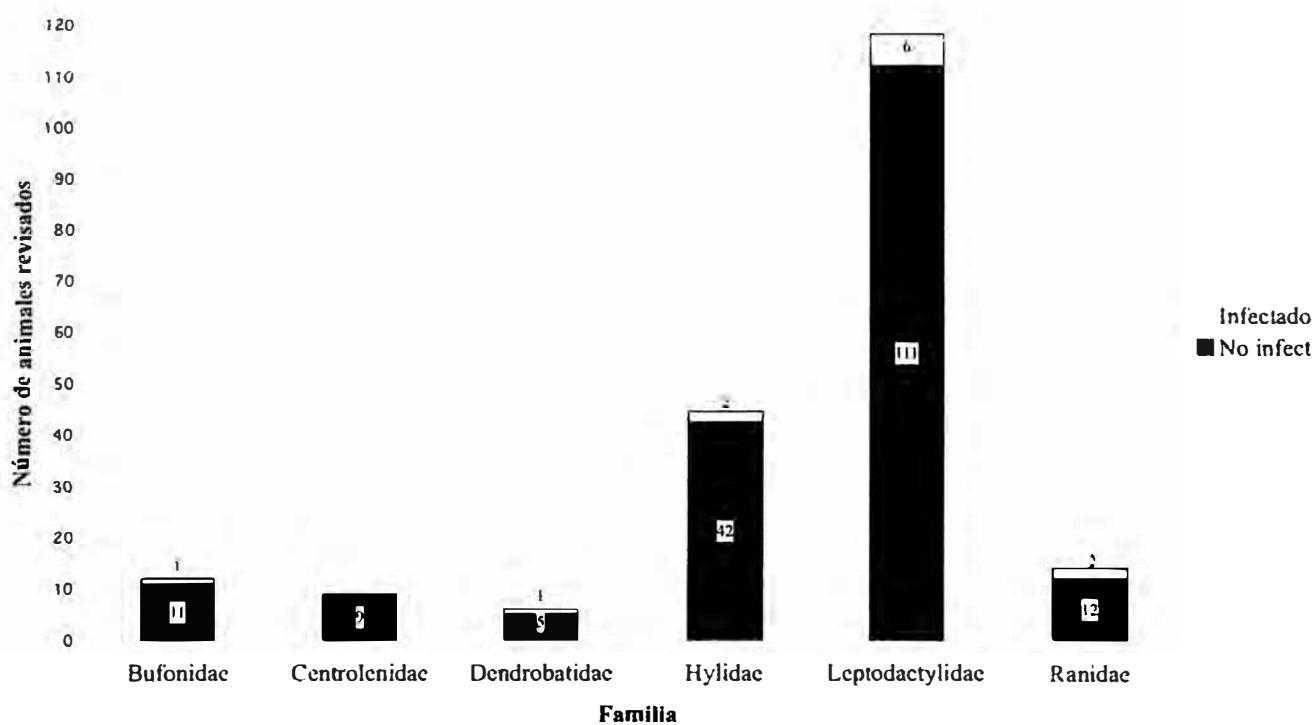


Fig. 1. Presencia del hongo quitridiomycete por familia en especímenes del transecto La Selva-Barva (1986). (Número en las barras son los números de animales revisados)

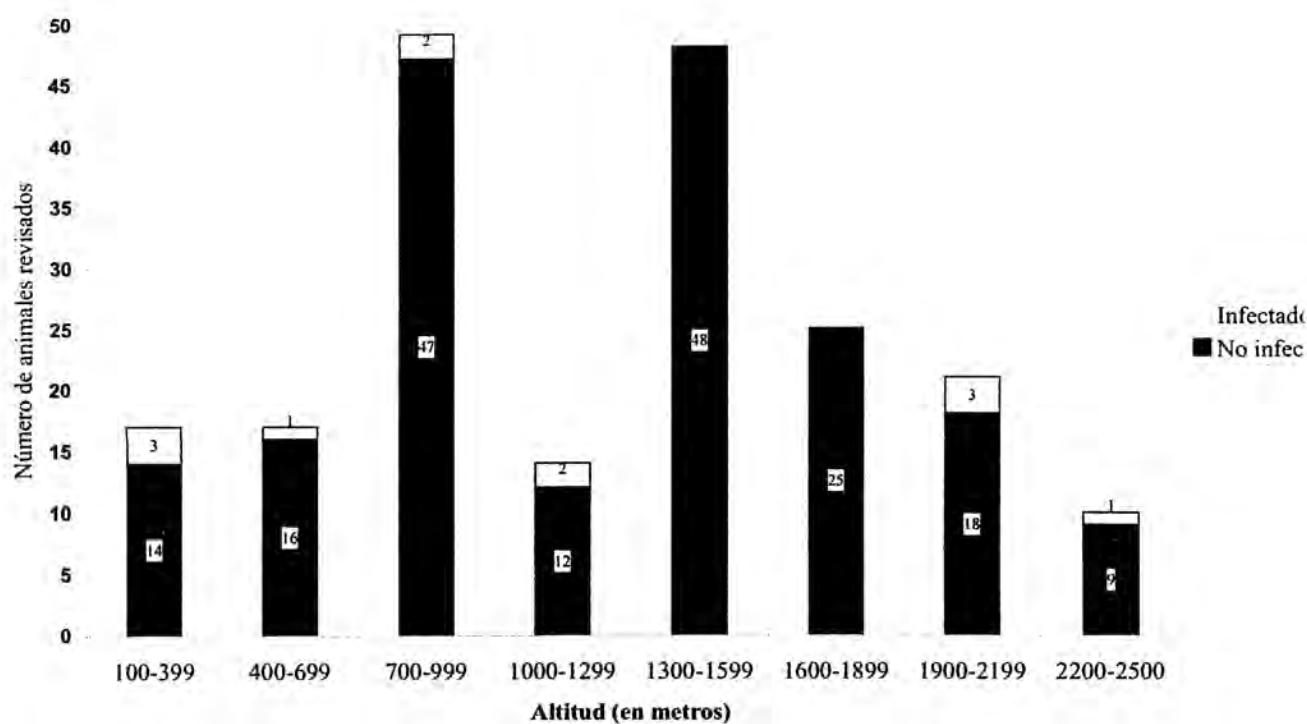


Fig. 2. Presencia del hongo quitridiomycete por altura en especímenes del transecto La Selva-Barva (1986). (Número en las barras son los números de animales revisados)

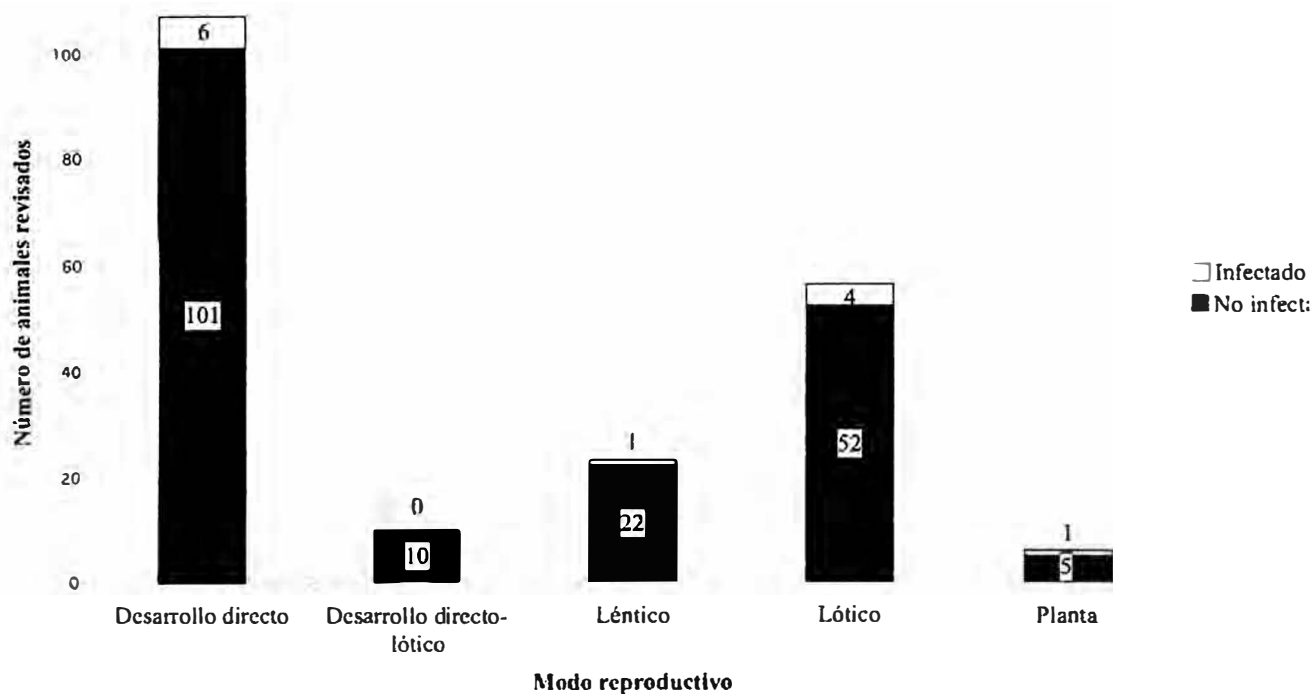


Fig. 3. Presencia del hongo quitridiomycete por modo reproductivo en especímenes del transecto La Selva-Barva (1986). (Número en las barras son los números de animales revisados)

Cuadro 1. Especies examinadas para el transecto La Selva-Barva, presencia de *B. dendrobatidis*, elevación encontrada, modo reproductivo y estado poblacional en Costa Rica.

Especie	% infectado	N	Elevación (m)	UICN categorías listas rojas	Estado poblacional en Costa Rica	Modo reproductivo
Bufonidae						
<i>Atelopus varius</i>	11.1	9	920	En peligro crítico	Declinó	Lótico
<i>Atelopus senex</i>	0.0	3	-	En peligro crítico	Probable extinción	Lótico
Dendrobatidae						
<i>Dendrobates pumilio</i>	16.7	6	620	Casi amenazado	No declinó	Plantas
Hylidae						
<i>Smilisca sordida</i>	0.0	5	-	Fuera de peligro	No declinó	Lótico
<i>Smilisca phaeota</i>	0.0	1	-	Fuera de peligro	No declinó	Lótico
<i>Hyla rivularis</i>	0.0	8	-	Amenazado	Declinó	Lótico
<i>Hyla angustilineata</i>	0.0	7	-	En peligro crítico	Declinó	Léntico
<i>Hyla pseudopuma</i>	7.1	14	2050	Fuera de peligro	Declinó, pero se recuperó	Léntico
<i>Duellmanohyla wranoctiroa</i>	16.7	6	1000	En peligro crítico	Declinó	Lótico
<i>Duellmanohyla rufioculis</i>	0.0	2	-	Fuera de peligro	No declinó	Lótico
<i>Phyllomedusa lemur</i>	0.0	1	-	Vulnerable	Declinó, todavía ocurre en sitios bajos	Léntico
Centrolenidae						
<i>Centrolene prosoblepon</i>	0.0	7	-	Fuera de peligro	No declinó	Lótico
<i>Hyalinobatrachium collymbiophylum</i>	0.0	2	-	Fuera de peligro	No declinó	Lótico
Leptodactylidae						
<i>Eleutherodactylus andi</i>	0.0	1	-	En peligro crítico	Declinó, posiblemente extinto	Desarrollo directo-rios
<i>Eleutherodactylus fitzingeri</i>	50.0	6	280(2), 1000	Fuera de peligro	No declinó	Desarrollo directo
<i>Eleutherodactylus diastema</i>	0.0	10	-	Fuera de peligro	No declinó	Desarrollo directo
<i>Eleutherodactylus bransfordii</i>	7.7	13	280	Fuera de peligro	No declinó	Desarrollo directo
<i>Eleutherodactylus talamancae</i>	50.0	2	800	Fuera de peligro	No declinó	Desarrollo directo
<i>Eleutherodactylus caryophyllaceus</i>	0.0	8	-	Fuera de peligro	Declinó	Desarrollo directo
<i>Eleutherodactylus megacephallus</i>	0.0	5	-	Fuera de peligro	No declinó	Desarrollo directo
<i>Eleutherodactylus cruentus</i>	0.0	15	-	Fuera de peligro	No declinó	Desarrollo directo
<i>Eleutherodactylus altae</i>	0.0	2	-	Datos deficientes	Datos deficientes	Desarrollo directo
<i>Eleutherodactylus crassidigitus</i>	0.0	10	-	Fuera de peligro	No declinó	Desarrollo directo
<i>Eleutherodactylus hylaeformis</i>	0.0	8	-	Fuera de peligro	No declinó	Desarrollo directo
<i>Eleutherodactylus escozcos</i>	0.0	9	-	En peligro crítico	Declinó, posiblemente extinto	Desarrollo directo-rios
<i>Eleutherodactylus melanostictus</i>	0.0	4	-	Datos deficientes	Datos deficientes	Desarrollo directo
<i>Eleutherodactylus podiciferus</i>	5.3	19	2300	Fuera de peligro	No declinó	Desarrollo directo
<i>Eleutherodactylus cerasinus</i>	0.0	5	-	Fuera de peligro	No declinó	Desarrollo directo
Ranidae						
<i>Rana vibicaria</i>	18.2	11	2050 (2)	En peligro crítico	Declinó	Lótico
<i>Rana warschewitschii</i>	0.0	3	-	Fuera de peligro	Declinó, todavía ocurre en zonas bajas	Léntico

Cuadro 2. Promedio de infección de quitridiomycosis en especies encontradas en Guayacán de Siquirres y en la Reserva Forestal Escalera de Mono, en la Universidad EARTH, en el año 2002.

Espece	% infección	N
<i>Eleutherodactylus talamancae</i>	33.3	3
<i>Eleutherodactylus bransfordii</i>	25.0	4
<i>Eleutherodactylus diastema</i>	0.0	2
<i>Eleutherodactylus crassidigitus</i>	16.7	6
<i>Eleutherodactylus ridens</i>	0.0	3

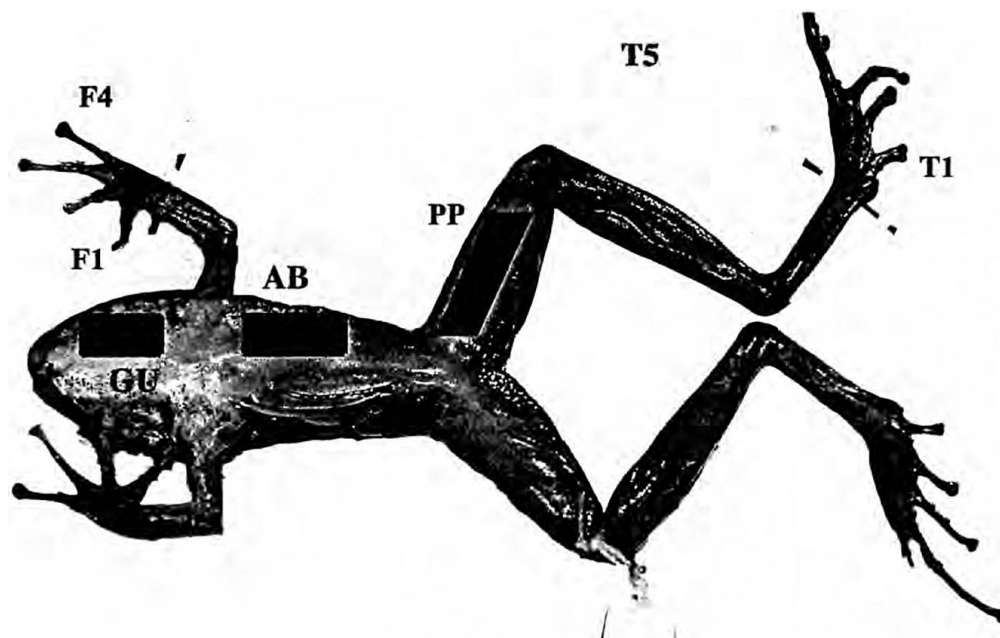


Fig. 4. Partes del cuerpo de especímenes de *Eleutherodactylus fitzingeri* examinados

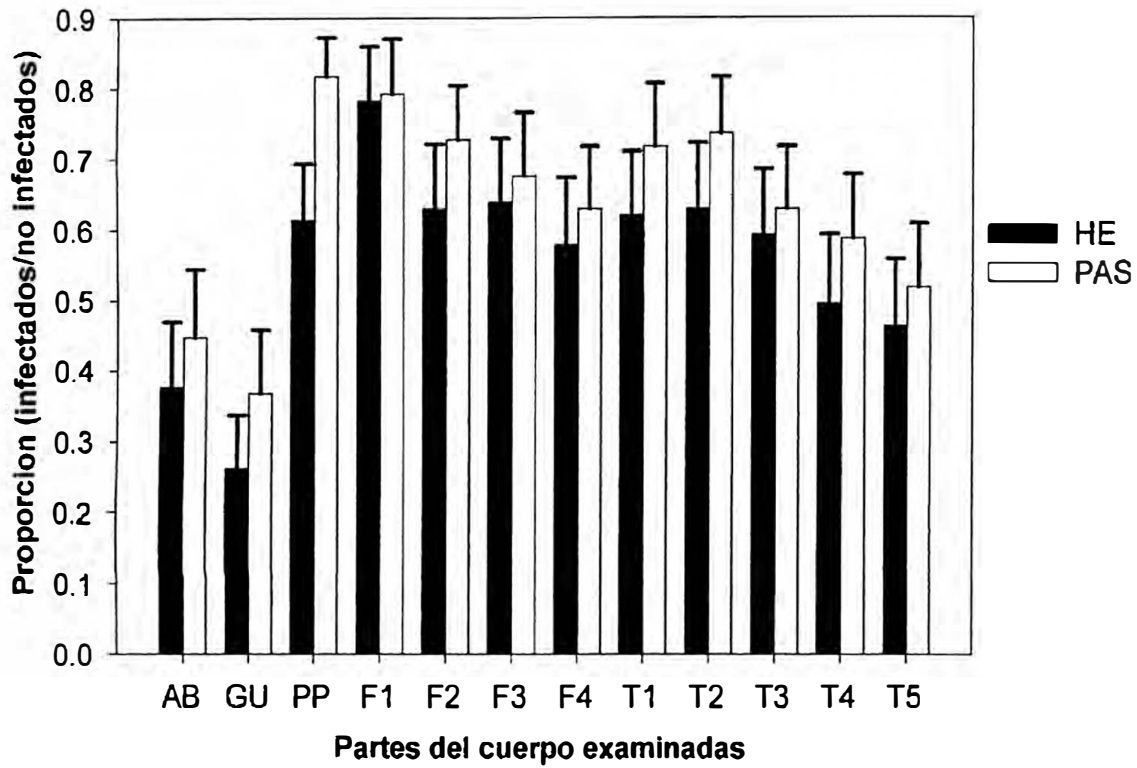


Fig. 5. Promedio y error estándar de infección, en las diferentes partes del cuerpo con las tinciones de H&E y PAS.

Cuadro 3. Número de cortes necesarios para alcanzar el límite superior de confianza. El promedio de infección de los 24 animales infectados en la combinación de factores más poderosa en detección (PPXPAS), más los seis casos con las infecciones más leves se muestran aquí.

Número de cortes examinados	# de positivos / total del # de cortes				
	(353/432) N= 24)	(9/18) (N=2)	(7/18) (N= 2)	(6/18) (N=1)	(3/18) (N=1)
1	0.1829	0.50000	0.61111	0.6667	0.833
2	0.0334	0.25000	0.37346	0.4444	0.6944
3		0.12500	0.22822	0.2963	0.5787
4		0.0625	0.13947	0.1975	0.4823
5		0.0313	0.08523	0.1317	0.4019
6			0.05209	0.0878	0.3349
7			0.03183	0.0585	0.2791
8				0.0390	0.2326
9					0.1938
10					0.1615
11					0.1346
12					0.1122
13					0.0935
14					0.0779
15					0.0649
16					0.0541
17					0.0451

Conservation Biology

Title of paper:

Historical, taxonomic and geographic patterns of chytrid fungus presence in the integument of Costa Rican anurans: lack of correlation with subsequent population declines

Running head: Chytrid distribution in Costa Rica anurans

Key Words: amphibian declines, chytrid fungus, Costa Rica, tropics, reproductive mode

Word Count: 3320

Authors: Robert Puschendorf ¹, Federico Bolaños ¹ and Gerardo Chaves ¹

1 Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica

Corresponding authors email address: rpuschen@biologia.ucr.ac.cr (R. Puschendorf),

fax: (506) 2221 189

Abstract

Amphibian populations have declined and disappeared in protected and apparently undisturbed areas around the world. In Costa Rica declines have occurred mostly in the highlands. A chytrid fungus has been linked to these declines. We examine an amphibian collection made in Parque Nacional Braulio Carrillo in 1986 for the chytrid fungus. This collection was taken in an altitudinal transect from 300 to 2600m just prior to the declines. Skin from the pelvic patch of 202 specimens of 30 species was examined histologically to check for the disease. We also test 18 specimens of 7 species of *Eleutherodactylus* from two other lowland Caribbean sites collected in 2001. Patterns of infection among species at different elevations in 1986 did not correlate well with subsequent declines. The chytrid fungus was present in almost all altitudes in 1986, including lower areas. The pathogen was also found in both species that later declined and in species that did not. Chytrid fungus was very abundant in the 2001 survey. More retrospective museum surveys are needed in order to determine whether it was found in the area before.

Resumen

Las poblaciones de anfibios han disminuido y en algunos casos hasta han desaparecido por completo en zonas aparentemente inalteradas alrededor de todo el mundo. En Costa Rica estas disminuciones han ocurrido en las zonas altas. Un hongo del grupo de los quitridiomicetes ha sido relacionado con estas desapariciones. Examinamos una colección de anfibios realizada en 1986, justo antes de que se observaran las primeras

disminuciones, en un transecto altitudinal desde los 300 hasta los 2600 mnsnm, en el Parque Nacional Braulio Carrillo. Piel de la zona de la ingle fue examinada en 202 especímenes de 30 especies, utilizando técnicas histológicas. También revisamos 18 especímenes de 7 especies de *Eleutherodactylus* de otros dos sitios en el Caribe de Costa Rica, colectados en el 2001. Los patrones de infección entre especies a diferentes elevaciones en 1986 no se correlacionaron bien con el patrón de las disminuciones. El hongo quitridiomycete estuvo presente en casi todas las alturas en 1986, incluyendo las zonas bajas. El patógeno también se encontró en especies que declinaron y en especies que no lo hicieron. Además pareciera ser una enfermedad común hoy en día. Más revisiones de especímenes de museo son necesarias para determinar si esta enfermedad estuvo presente antes de esta fecha en la zona.

Introduction

The decline and extinction of many amphibian populations in protected areas around the world is an alarming phenomenon with several possible causes (Alford & Richards, 1999). Authors have speculated on different possible causes, such as climate change (Pounds & Crump, 1994; Steward, 1995; Pounds *et al.* 1999), UV radiation (Blaustein *et al.*, 1994; Anzalone *et al.*, 1998; Lizana & Pedraza, 1998), pathogenic diseases (Nyman, 1986; Carey, 1993; Berger *et al.* 1998), Other authors have noted that combinations of these factors could be synergistic and catastrophic for amphibian populations (Blaustein *et al.*, 1994; Long *et al.*, 1995; Kiesecker & Blaustein, 1995; Kiesecker *et al.*, 2001; Pounds, 2001; Pounds & Puschendorf, 2003).

Most Central America declines have occurred at elevations above 500 m (Young *et al.*, 2001). The best documented cases in Central America are the golden toad (*Bufo periglenes*) and the harlequin frog (*Atelopus varius*), from Monteverde (Pounds and Crump, 1994; Pounds *et al.*, 1997) and the declines in Las Tablas (southwestern highlands) of *Atelopus chiriquiensis*, *Hyla calypsa* and *Bufo fastidiosus* (Lips, 1998). Sites in the approximately 260 km of mountainous terrain between these two areas have suffered similar declines (Bolaños and Chaves, unpublished data). The Reserva de San Ramón for example, has suffered strong declines with the apparent loss of many species (Bolaños and Ehmecke, 1996). *Bufo holdridgei*, which was endemic to Cerro Chompipe and *Atelopus senex*, also found at this site, may now be extinct (Savage, 2002). Fortuna, an area close to the Costa Rican border in the Panamanian Talamanca region, has also suffered significant amphibian declines (Lips, 1999). Costa Rican declines have been characterized by a general reduction of reduced abundance at almost all amphibian species at mid to high elevations (Pounds *et al.*, 1997). In total 23, species have been affected, 10 of these have not been seen for more than a decade (Bolaños, 2002).

Population declines in Costa Rica have been linked to climate change (Pounds & Crump, 1994; Pounds *et al.*, 1997), and to outbreaks of *Batrachochytrium dendrobatidis* (Lips *et al.*, 2003; Puschendorf, 2003) a recently discovered species of chytrid fungus that grows on the epidermis of amphibians (Longcore *et al.*, 1999). This pathogen occurs in Australia, (Berger *et al.*, 1998, 1999), Panama (Berger *et al.*, 1998; Lips, 1999), Spain (Bosch *et al.*, 2001), Costa Rica (Lips *et al.*, 2003; Puschendorf, 2003), Ecuador (Ron & Merino 2000), the United States (Pessier *et al.*, 1999; Green & Sherman, 2001; Gregory *et al.*, 2002) and South Africa (Weldon, 2002). It is reported to be non lethal for

amphibian larvae, since they only have keratin in their mouthparts and infection seems to be limited to this location (Berger *et al.*, 1998, Longcore *et al.*, 1999). In culture the fungus grows well at temperatures below 23° C but dies at temperatures greater than 29 °C (Longcore *et al.*, 1999). This suggests that in the tropics it could thrive only in the cooler highlands.

We analyzed anuran museum specimens collected in 1986 from Braulio Carrillo National Park on the Atlantic slope of the Cordillera Volcánica Central for the presence of chytrid fungus. We hypothesize that specimens of species that subsequently went extinct, and specimens collected from mid to high elevations (>500 m) would be most likely to show chytrid infections. In 2002, we also collected 18 specimens from 2 different sites to see if the chytrid fungus could be found in amphibian populations, which have not gone extinct.

Methods

Collection of specimens

The La Selva – Volcán Barva expedition of 1986

In March and April 1986, a team of biologists including botanists, mammalogists, entomologists, invertebrate zoologists and herpetologists participated in a month long expedition from La Selva (30-137m) to Volcán Barva (2906m) to collect museum specimens and to study various aspects of the biological richness of the area (Timm *et al.*, 1989). Life zones included in the transect are: tropical wet forest, premontane rain forest, lower montane rain forest and mountain rain forest (Hartshorn and Peralta, 1988;

Lieberman *et al.*, 1996). This collection was divided between three different museums; we examined all the anuran specimens available from the Museum of Vertebrate Zoology, University of California at Berkeley (MVZ) and the Museo de Zoología, Universidad de Costa Rica (UCR).

Braulio Carrillo National Park and La Selva Biological Station encompasses a 46000 ha reserve (Clark, 1990) on the Atlantic slope of Cordillera Volcánica Central in Costa Rica. The team of herpetologists worked out of 7 camps, situated roughly at 300 m, 700 m, 1000 m, 1500 m, 1800 m, 2050 m and 2600m. Thirty-five species of anurans were collected.

No dead or dying animals were encountered and there was no reason to believe that any of the animals were infected. However, declines were first noted in Monteverde (aprox. 75 km W of the transect) only two years later leading us to suppose that this collection could serve to test whether the chytrid was present in this area prior to the decline in Monteverde.

The Reserva Forestal Escalera de Mono (EARTH) and Guayacán surveys, 2002

Guayacán (10°02'597 N, 83°32'918 W, 650 m elevation) is one of the most diverse sites in Costa Rica (Savage, 2002). Reserva Forestal Escalera de Mono at EARTH University (10°14'142 N, 83°34'039 W, 40 m elevation) is in the Atlantic lowlands. We collected specimens of *Eleutherodactylus* by hand, euthanized with Orajel, and preserved in the field in formalin at two sites. We used this genus since the frogs are abundant at both sites throughout the year.

Histologic analysis for *Batrachochytrium dendrobatidis*

We tested 202 specimens of 30 species from the La Selva-Barva expedition and 18 specimens of 5 species from the EARTH and Guayacán locations. Six of the eight families of frogs in Costa Rica were represented. Samples were processed in the Laboratory of Pathology at the National Children's Hospital in San José, Costa Rica.

Specimens preserved in formalin were soaked in water for 48 hours and transferred to 70 % ethanol for final storage. At least 2 mm² of skin from the pelvic patch was extracted from each individual. Juveniles SVL 1.5 cm and smaller, were not used to avoid damaging the specimen.

Using routine procedures, the samples were run through a Miles Scientific processor (Tissue Tek, VIP 3000), in which they were dehydrated and embedded in paraffin. Four-micron thick sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E).

Skin sections were examined with a compound microscope for the presence of *B. dendrobatidis*. Three different morphs of the organism, probably representing different life stages were found in most samples: a uninucleated form containing homogenous basophilic cytoplasm; a form with multiple separated nuclei and a form with well defined 2-3 μm round to oval basophilic spores (Pessier *et al.*, 1999). Empty tally were also common. Ideally ultrastructural (Barr, 1990) and genetic studies are used to confirm species identification of chytrids. However, as *B. dendrobatidis* is the only chytrid reported to grow on the amphibian integument, and there are no other known frog parasites with a similar appearance, histological identification was considered adequate. Ultrastructural and genetic studies have shown that *B. dendrobatidis* occurs in this region

(Lips, 1998, 1999; Lips *et al.*, 2003; Berger *et al.*, 1998; Morehouse *et al.* 2003; Puschendorf, 2003).

Classification of Conservation Status and Reproductive Mode

The preliminary classification of the current status of the Costa Rican populations of the species used in this study based on the frequency those species that continue to be observed and collected by UCR students and deposited in the Zoology Museum and on previous experience (Bolaños and Chaves, unpublished). Also, the current IUCN classification for this species list is included (InfoNatura: Birds, mammals, and amphibians of Latin America [web application]. 2004. Version 3.1. Arlington, Virginia (USA): NatureServe. Available: <http://www.natureserve.org/infonatura>. Accessed: April 23, 2004).

Reproductive habitat and mode was assigned to each species: Lotic (species that breed in fast moving streams or rivers); Lentic (species that use swamps, ponds or slow moving bodies of water); plant-breeders; the direct development in forest dwellers and direct development in the stream dweller.

The taxonomy of the species and their reproductive mode was determined using Savage (2002). The altitudes were categorized by 300 m intervals. Likelihood ratio G tests were used for the analysis. Although specimens of *Eleutherodactylus altae* and *Eleutherodactylus melanostictus* were collected during this expedition we did not include them in the analysis. These are rather uncommon species, and it is not clear if they have declined or not.

Results

Of the specimens from the La Selva-Barva area in 1986, 5.94% had *B. dendrobatidis* present in their integument; 30% of the species had at least one infected individual. All families except Centrolenidae were infected (Fig. 1). Thirty three percent of the 13 species, which have since declined, such as *A. varius* and *Rana vibicaria*, were infected. But 42% of the 18 species that have not subsequently declined, such as *Eleutherodactylus fitzingeri* and *Dendrobates pumilio*, were also infected (Table 1). Both *Hyla pseudopuma* and *Eleutherodactylus podiciferus*, two of the few species that can be still found at high altitudes (Pounds *et al.*, 1997), were infected. The distribution of the fungus was spread homogeneously among the taxonomic groups ($G = 30.33$, 29 df, $P = 0.398$). This pathogen is apparently adapted to a wide variety of hosts.

Chytrid fungus infection occurred at almost all altitudes (Figure 2). The highest frequency (17.6%) occurred between 100 and 399 m, but high infection rates also occurred at 1000-1299 m and 1900-2200 m (14.3%). The difference among the altitudes was significant ($G=15.54$, 7 df, $P=0.030$). The main reason was the lack of infected animals between 1300 and 1900 m.

Frogs with all reproductive modes, except the direct developing species in streams, were infected (Figure 3). Plant breeders, represented by one species, had a prevalence of 20%, followed by lotic breeders (7.1%), direct developing species (5.6%) and lentic breeders (4.3%). The differences in infection rate among the reproductive categories were not significant ($G= 2.739$, 4 df, $P=0.602$).

Fungus infections were found in 24% of the *Eleutherodactylus* specimens collected in 2002 (Table 2). All of these five species are common at present in the

Caribbean lowlands. All the lowland infections were light, with just a few sporangia in the first layer of skin.

Discussion

Our results demonstrate that *B. dendrobatidis* was present in several frog species in 1986 in Costa Rica, prior to the first documented population decline in Monteverde. The pattern of infections in 1986 does not correlate well with subsequent declines. In the highlands, where declines occurred, we found infections not only in species such as *R. vibicaria* and *A. varius* which subsequently disappeared, but also in species such as *E. podiciferus* and *H. pseudopuma* which have persisted (Pounds *et al.*, 1997). In Monteverde the abundance of *H. pseudopuma* dropped sharply after the declines, and never returned to the levels seen in the beginning of the 80's (Pounds *et al.*, 1997).

Although most of the amphibian declines in Costa Rica have occurred at elevation greater than 500 m (Lips 1998, 1999; Young *et al.*, 2001), chytrid infections in 1986 were not restricted to the upland areas. The chytrid continues to exist today in lowland areas in species such as *D. pumilio* and several species of *Eleutherodactylus*.

Chytrid infections in 1986 were not limited by a strictly aquatic habitat. The fact that species such as *E. fitzingeri* or *D. pumilio* were infected (and continue to be infected) suggests that this pathogen can survive on the moist forest floor. Perhaps it lives there as a saprobe, as suggested by Longcore *et al.*, (1999).

There were no infected animals collected between 1300 and 1900 m in 1986. Our sample at this elevation is only 73 frogs, so it is possible that this chytrids free category

may be an artifact of our sample size. The same applies for the lack of observed infections in species in the direct developing river category, and the Centrolenids.

Our results do not support simple predictions derived from the hypothesis that chytrid infections caused the population declines. They do not, however, eliminate this hypothesis. Perhaps infections are for some reason less damaging in some species at some elevations.

Daszak and collaborators (2003) state that chytridiomycosis shows the clearest link between disease and decline, but there is still too much basic biology and ecology of the pathogen in the wild that is unknown to make stronger conclusions.

We strongly support the conclusion of Collins & Storfer (2003) that only with an integrated team of multidisciplinary scientists will we eventually understand why highland anurans have disappeared.

Acknowledgments

We thank M. C. Obando and M. Sánchez for help with histological preparations and, A. Carranza and the National Childrens Hospital for permission to process samples in their facilities. We also acknowledge W. Eberhard, A. Lizano, B. Kohlmann, L. Berger, K. Lips, A. Crawford, C. Vaughan, M. Sasa, R. Alford for their helpful suggestions throughout this research and on earlier versions of the manuscript. We thank B. Kubicki for help in the field, and the Museum of Vertebrate Zoology of the University of California at Berkeley and D. Wake for access to their collection . This work was funded by Idea Wild and K. Lips and is a contribution of the Museum of Zoology of the University of Costa Rica

Literature cited

Alford, R. and S.J. Richards. 1999. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* **30**: 133-65.

Anzalone, C.R., L.B. Kats, and M.S. Gordon. 1998. Effects of solar UV-B radiation on embryonic development in *Hyla cadaverina*, *Hyla regilla* and *Taricha torosa*. *Conservation Biology* **12**: 646-653.

Barr, D.J.S. 1990. Phylum Chytridiomycota. In: Margulis, L., M. Melkonian, and D.J. Chapman edit. *Handbook of Protozoa*. Boston, Massachusetts: Jones and Bartlett. p 454-466.

Berger, L., R. Speare, P. Daszak, D.E. Green, A.A. Cunningham, C.L. Groggin, R. Slocumbe, M.A. Ragan, A.D. Hyatt, K.R. McDonald, H.B. Hines, K.R. Lips, G. Marantelli, and H. Parkes. 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., R. Speare, and A. Hyatt. 1999. Chytrid fungi and amphibian declines: Overview, implications and future directions. Pages 21-31 in A. Campbell, editor. *Declines and Disappearances of Australian frogs*. Environment Australia, Canberra.

Blaustein, A.R., D.G. Hokit, R.K. O'Hara, and R.A. Holt. 1994. Pathogenic fungus contributes to amphibian losses in the Pacific Northwest. *Biological Conservation* **67**:251-254.

Bosch J. I. Martínez-Solano, and M. García-París. 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.

Bolaños , F.; Ehmcke, J. 1996. Anfibios y reptiles de la Reserva Biológica de San Ramón, Costa Rica. *Revista Pensamiento Actual* **2**: 107-112.

Bolaños, F. 2002. Anfibios en Retirada. *Ambientico* **107**: 12-13

Carey, C.L. 1993. Hypothesis concerning the cause of the disappearance of boreal toads from the mountains of Colorado. *Conservation Biology* **7**: 355-362.

Clark, D. B. 1990. La Selva Biological Station: A Blueprint for Stimulating Tropical Research. Pages 9-27 in A. H. Gentry, Editor. *Four Neotropical Rainforests*. Yale University Press.

Collins, J.P. and A. Storfer. 2003. Global amphibian declines: Sorting the hypotheses. *Diversity and Distribution* **9**: 89-98.

Daszak, P, A.A. Cunningham; A.D. Hyatt. 2003. Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distribution* **9**: 141-150.

Green, D.E., and C.K. Sherman. 2001. Diagnostic Histological Findings in Yosemite toads (*Bufo canorus*) from a Die- Off in the 1970s. *Journal of Herpetology* **35**: 92-103.

Gregory A. B., P.C. Rosen, M.J. Sredi, T.R. Jones, and J.E. Longcore. 2002. Chytridiomycosis in Native Arizona frogs. *Journal of Wildlife Diseases*, **38**: 206-212.

Hartshorn, G. and R. Peralta. 1988. Preliminary description of primary forest along the La Selva-Volcán Barva altitudinal transect, Costa Rica. Pages 281-295 in F. Almeda and C. Pringle editors. *Tropical Rainforests Diversity and Conservation*. California Academy of Sciences, San Francisco.

Kiesecker, J.M., and A.R. Blaustein. 1995. Synergism between UV-B radiation and a pathogen magnifies amphibian embryo mortality in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**:11049-11052.

Kiesecker, J. M., A. R. Blaustein, and L.K. Belden. 2001. Complex causes of amphibian declines. *Nature* **410**:681-683.

Lieberman, D., M. Lieberman, R. Peralta and G. Hartshorn. 1996. Tropical forest structure and composition on a large-scale altitudinal gradient in Costa Rica. *Journal of Ecology* **84**: 137-152.

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., Green, D.E., Papendick, R. 2003. Chytridiomycosis in Wild Frogs from Southern Costa Rica. *Journal of Herpetology* **37**: 215-218.

Lizana, M., and E.M. Pedraza. 1998. The effects of UV-B radiation on toad mortality in mountainous areas of Central Spain. *Conservation Biology* **12**:703-707.

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

Long, L.E., L.E. Saylor, and M.E. Soulé. 1995. A pH-UV-B synergism in amphibians. *Conservation Biology* **9**:1301-1303.

Morehouse, E.A.; T.Y. James; A.R.D. Ganley; R. Vilgalys; . Berger; P.J. Murphy and J. Longcore. 2003. Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone. *Molecular Ecology* **12**: 395-403.

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

Pessier, A.P., D.K. Nichols, J.E. Longcore, M.S. Fuller. Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *J Vet Diagn Invest* **11**: 194-199.

Pounds, J.A., and M.L. Crump. 1994. Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Conservation Biology* **8**:72-85

Pounds, J.A., M.P.L. Fodgen, J.M. Savage, and G.C. Gorman. 1997. Test of null models for amphibian declines on a tropical mountain. *Conservation Biology* **11**:1307-1322.

Pounds, J.A., M.P.L Fodgen, and J.H. Campell. 1999. Biological response to climate change ona tropical mountain. *Nature* **398**:611-615.

Pounds, J.A. 2001. Climate and amphibian declines. *Nature* **410**:639-640.

Pounds, J.A. and Puschendorf, R. Clouded futures. *Nature* **427**: 107-109.

Puschendorf, R. 2003. *Atelopus varius* (Harlequin frog). Fungal infection. *Herp Review*. 34(2): 355.

Ron S.R., and A. Merino. 2000. Declinación de anfibios del Ecuador: Información general y primer reporte de chytridiomycosis para Sudamérica. *Frolog* 42: 2.

Savage, J.M. 2002. The amphibians and reptiles of Costa Rica: a herpetofauna between two continents, between two seas. The University Chicago Press. 934p.

Steward, M.M. 1995. Climate driven population fluctuations in rainforest frogs. *Journal of Herpetology* 29: 437-446.

Timm, R.M., D.E. Wilson, B.L. Clauson, R.K. LaVa and C.S. Vaughan. 1989. Mammals of the La Selva-Braulio Carrillo Complex, Costa Rica. United States Department of the Interior Fish and Wildlife Service. 162p.

Weldon, C. 2002. Chytridiomycosis survey in South Africa. *Froglog*. 51: 1-2.

Young, B.E., K.R. Lips, J.K. Reaser, R. Ibañez, A.W. Salas, J.R. Cedeño, L.A. Coloma, S. Ron, E. La Marca, J.R. Meyer, A. Muñoz, F. Bolaños, G. Chaves and D. Romo. 2001. Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conservation Biology* 15: 1213-1223.

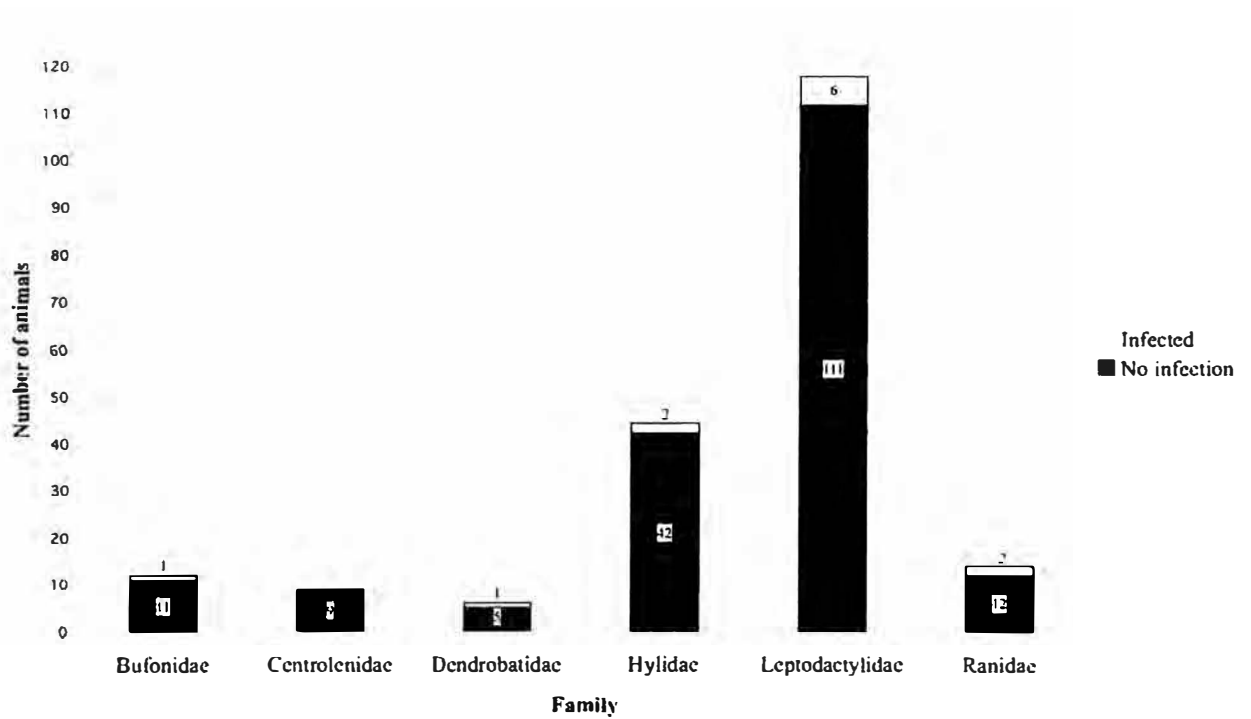


Figure 1. Occurrence of chytrid fungus infection by family in specimens from La Selva-Barva transects (1986). (Number associated with the bars are number of individuals)

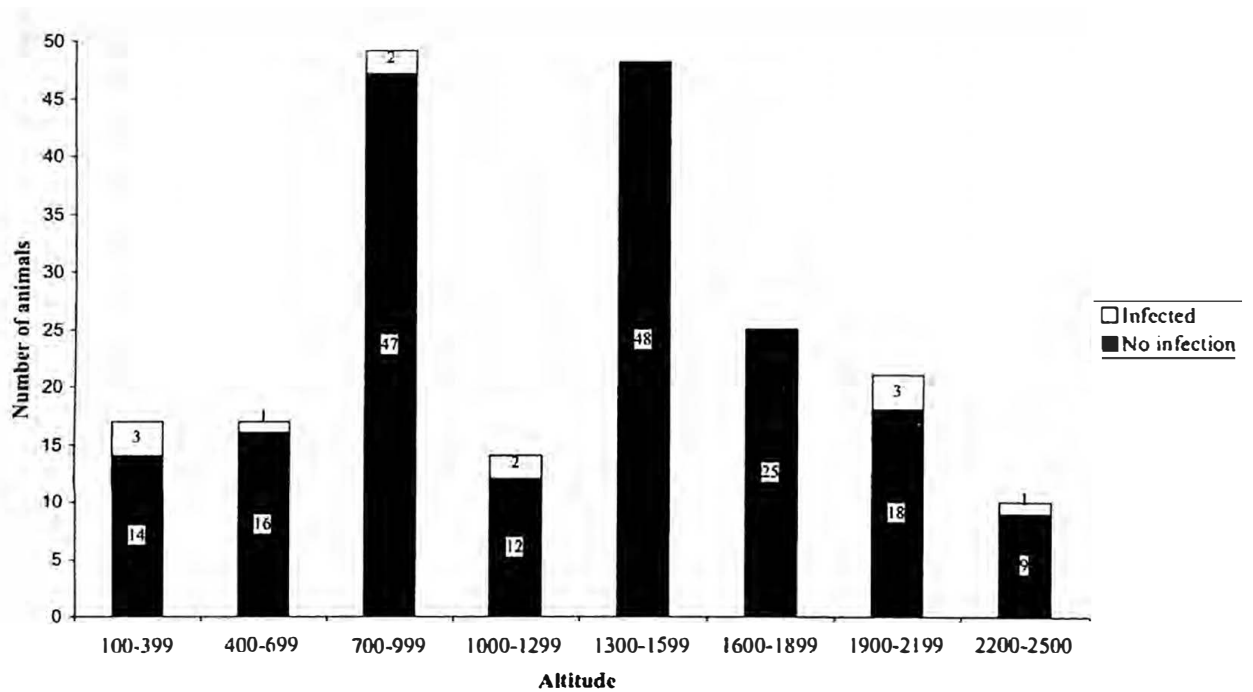


Figure 2. Occurrence of chytrid fungus infection by altitude in specimens from the La Selva-Barva transects (1986). (Number associated with the bars are numbers of individuals)

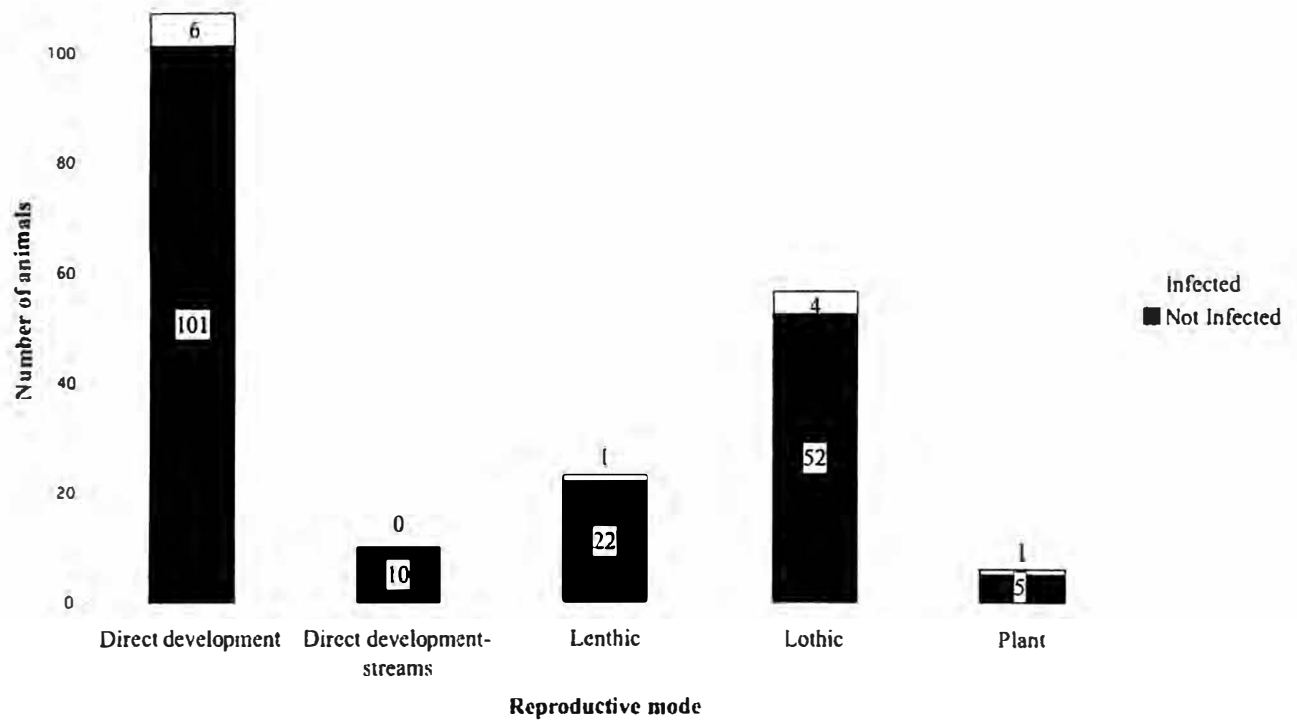


Figure 3. Occurrences of chytrid fungus infection by reproductive mode in specimens from La Selva-Barva transect (1986). (Numbers associated with the bars are number of individuals).

Table 1. Species examined from the La Selva – Barva, prevalence of *B. dendrobatidis*, elevation, current status in Costa Rica, and reproductive mode.

Species	% Infected	N	Elevation (m)	Status	Reproductive mode
Bufo					
<i>Atelopus varius</i>	11.1	9	920	Declined	Lothic
<i>Atelopus senex</i>	0.0	3	-	Declined, possibly extinct	Lothic
Dendrobatidae					
<i>Dendrobates pumillo</i>	16.7	6	620	No decline	Plant
Hylidae					
<i>Smilisca sordida</i>	0.0	5	-	No decline	Lothic
<i>Smilisca phaeota</i>	0.0	1	-	No decline	Lentic
<i>Hyla rivularis</i>	0.0	8	-	Declined	Lothic
<i>Hyla angustilineata</i>	0.0	7	-	Declined	Lentic
<i>Hyla pseudopuma</i>	7.1	14	2050	Declined, but recovered	Lentic
<i>Duellmanohyla uranochroa</i>	16.7	6	1000	Declined	Lothic
<i>Duellmanohyla rufoculis</i>	0.0	2	-	No decline	Lothic
<i>Phyllomedusa lemur</i>	0.0	1	-	Declined, still occurs in the lowlands	Lentic
Centrolenidae					
<i>Centrolene prosoblepon</i>	0.0	7	-	No decline	Lothic
<i>Hyalinobatrachium colymbiphylum</i>	0.0	2	-	Declined, still occurs in the lowlands	Lothic
Leptodactylidae					
<i>Eleutherodactylus andi</i>	0.0	1	-	Declined, possibly extinct	Direct develop. River
<i>Eleutherodactylus fitzingeri</i>	50.0	6	280(2), 1000	No decline	Direct develop.
<i>Eleutherodactylus atastema</i>	0.0	10	-	No decline	Direct develop.
<i>Eleutherodactylus bransfordii</i>	7.7	13	280	No decline	Direct develop.
<i>Eleutherodactylus talamancae</i>	50.0	2	800	No decline	Direct develop.
<i>Eleutherodactylus caryophyllaceus</i>	0.0	8	-	Declined	Direct develop.
<i>Eleutherodactylus megalophallus</i>	0.0	5	-	No decline	Direct develop.
<i>Eleutherodactylus cruentus</i>	0.0	15	-	No decline	Direct develop.
<i>Eleutherodactylus althae</i>	0.0	2	-	Lacking information	Direct develop.
<i>Eleutherodactylus crassidigitus</i>	0.0	10	-	No decline	Direct develop.
<i>Eleutherodactylus hylaeformis</i>	0.0	8	-	No decline	Direct develop.
<i>Eleutherodactylus ocoscos</i>	0.0	9	-	Declined, possibly extinct	Direct develop. River
<i>Eleutherodactylus melanostictus</i>	0.0	4	-	Lacking information	Direct develop.
<i>Eleutherodactylus podiciferus</i>	5.3	19	2300	No decline	Direct develop.
<i>Eleutherodactylus cerasinus</i>	0.0	5	-	No decline	Direct develop.
Ranidae					
<i>Rana vibicaria</i>	18.2	11	2050 (2)	Declined	Lentic
<i>Rana warschewitschii</i>	0.0	3	-	Declined, still occurs in the lowlands	Lothic

Table 2. Average of chytridiomycosis infection in species found in Alto de Guayacán and in the Reserva Forestal Escalera de Mono at EARTH University in 2002.

Species	% infected	N
<i>Eleutherodactylus talamancae</i>	33.3	3
<i>Eleutherodactylus bransfordii</i>	25.0	4
<i>Eleutherodactylus diastema</i>	0.0	2
<i>Eleutherodactylus crassidigitus</i>	16.7	6
<i>Eleutherodactylus ridens</i>	0.0	3

JOURNAL OF HERPETOLOGY

LRH: R. Puschendorf and F. Bolaños

RRH: Detection of *chytridiomycosis* : effects of stains and body parts

Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* infections in *Eleutherodactylus fitzingeri*:
effects of stains and body parts used

Robert Puschendorf ¹ and Federico Bolaños ¹

¹ *Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica*

Key Words: Amphibian declines, Costa Rica, *Batrachochytrium dendrobatidis*, histology, and false negatives

Corresponding authors email address: rpuschen@biologia.ucr.ac.cr (R. Puschendorf)

ABSTRACT

Batrachochytrium dendrobatidis is an integumentary pathogen that has been correlated with amphibian declines worldwide. Histopathological techniques can be used to diagnose the disease, but their sensitivity has not been determined. It is also unclear whether the power of detection varies using skin from different body parts. Light infections might produce false negatives. We examined 24 *Eleutherodactylus fitzingeri* infected with chytridiomycosis. This is a common frog species with a broad range and high abundance throughout most of Costa Rica. We sampled 12 different body parts in each animal, and alternated the staining between the routine stain, hematoxylin and eosin (H&E), and the more fungus specific stain periodic acid schiff (PAS). We found more samples infected using PAS than H&E in all body parts. Significant differences between body parts were also found. The pelvic patch and finger I were the best places to find the disease. Using the best combination of factors (stain and body part), and the animals with the lightest infections, we calculated that at least 16 sections are needed in order to reach 95% confidence that animal is or is not infected. If light infections are common, multiple sections with more accurate stains are recommended in order to avoid false negatives.

RESUMEN

Batrachochytrium dendrobatidis es un patógeno que crece sobre la piel de los anfibios, cuya presencia ha sido relacionada con las declinaciones de anfibios alrededor del mundo. Las técnicas histológicas sirven para diagnosticar la enfermedad, pero su sensibilidad no ha sido determinada. Tampoco se ha medido el poder de detección de la

misma, al utilizar diferentes tinciones y piel de diferentes partes del espécimen.

Infecciones leves podrían provocar un número alto de negativos falsos. Examinamos 24 individuos de *Eleutherodactylus fitzinger* infectados con quitridiomycosis. Esta es una especie abundante, con un rango amplio de distribución en casi toda Costa Rica. Se muestreo 12 partes del cuerpo, y alternamos la tinción entre Hematoxilina y Eosina (H&E) y Acido Periódico de Schiff (PAS). Encontramos más muestras infectadas usando PAS que H&E en todas las partes del cuerpo. Se encontró diferencias significativas también se dieron entre las diferentes partes del cuerpo. La zona de la ingle y el dedo pulgar de la mano fueron las mejores partes para encontrar la enfermedad. Utilizando la mayor combinación de factores (tinción y parte del cuerpo), y los animales con las infecciones más leves, calculamos que al menos 16 cortes son necesarios para llegar al 95 % del límite superior de confianza de que el animal está o no infectado. Si las infecciones leves son comunes, más secciones y el uso de tinciones más específicas son recomendadas para evitar un número alto de negativos falsos.

Introduction

The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* has been implicated in amphibian declines around the world (Berger *et al.*, 1998; Daszak *et al.*, 2003; Collins & Storfer 2003). Chytrids from several sites worldwide show low genetic variability (Morehouse *et al.*, 2003), supporting the hypothesis that it is an emerging infectious disease (Daszak *et al.*, 1999, Daszak *et al.*, 2003). In Costa Rica *B. dendrobatidis* has

been found on dead or dying anurans (Lips *et al.*, 2003) and on museum specimens collected (Puschendorf, 2003) prior to population crashes (Pounds & Crump, 1994; Pounds *et al.*, 1997; Lips 1998; Lips 1999).

Chytrid infections can be diagnosed by histopathological techniques (Pessier *et al.*, 1999; Berger & Hyatt, 2000), which work well on heavily infected specimens. However, if light infections are common, a significant number of false negatives can be expected. For example, Davidson and collaborators (2003) acknowledge the fact that this effect could have influenced their analysis of chytrid tiger salamander infections, but did not attempt to quantify it.

Herpetologists often cut amphibian fingers for mark-recapture studies to estimate population sizes (Donnelly & Guyer 1994), and recently this technique has been used to assess the presence of *B. dendrobatidis* in natural anuran populations (Berger *et al.*, 1999). No baseline study quantifies the possibility of false negatives using only fingers. In addition, histopathological techniques sometimes give results that are difficult to evaluate because chytrid zoospores can be confused with other cells, such as granulocytes. To improve histological detection, Berger and collaborators (2002) developed a chytrid-specific immunoperoxidase stain. However, the technique is time consuming, making it difficult to deal with large samples. Similar problems are encountered with silver stains (Arrington, 1992). The objective of this study was to develop baseline data on the detection power of two histological techniques on skin from twelve different body parts on natural infections of chytridiomycosis in a native Costa Rican anuran species, *Eleutherodactylus fitzingeri*.

MATERIALS AND METHODS

We compared the routine stain hematoxylin and eosin (H&E) (Allen, 1992) to the periodic acid Schiff (PAS), which stains fungus glucogen, mucin, and some basal membranes magenta (Gaffney, 1992). Both stains are easily performed in the laboratory and are time efficient when dealing with large sample sizes.

Eleutherodactylus fitzingeri was chosen because of its broad range and high abundance throughout Costa Rica, even including some dry areas such as the Guanacaste and Puntarenas provinces (Savage, 2002). Previous observations had shown that *E. fitzingeri* is infected with *B. dendrobatidis* (Puschendorf *et al*, unpublished).

During 2002 and 2003, 99 specimens of *E. fitzingeri* were collected, euthanized, and preserved in formalin. The 237 specimens deposited in the herpetological collection of the zoology museum of Universidad de Costa Rica (UCR) were also analyzed. Chytrid infections were sought in all of the 336 specimens by removing an approximate 3 mm² patch of skin from the pelvic patch, dehydrating it, and embedding it in paraffin. Two slides with six ribbons of sections 4 μm each were stained, one with H&E, the other with PAS. Between the two slides, 8 μm of the block were worn off, to avoid resampling sporangia. Twenty-four *E. fitzingeri* were found infected and used in the subsequent analysis. Tissue samples from twelve different body parts were obtained from these animals. At least 2 mm² of skin from the pelvic patch (PP), on the abdomen between the arms (AB), and the gular area (GU) were removed and processed (Fig. 1). Six slides of each of these three body parts were obtained each, with six ribbons of sections. The first, third, and fifth slides were stained with H&E. The second, fourth, and sixth were stained with PAS and examined for presence or absence of chytrid fungus.

The left foot and hand were processed and embedded in paraffin after being decalcified for 24 hours in a solution of EDTA. Three sections of the entire foot or hand were fixed on each slide, and six slides per hand and foot were obtained. Again, the first, third, and fifth slides were stained with H&E, the second, fourth, and sixth were stained with PAS. For the hand and foot, a positive or negative value was given for each finger or toe, with four fingers in the hand (F 1-4), and five toes in the foot (T 1-5) (Fig. 1). Only the digits were used to detect disease presence or absence. The remainder of the hand and foot were not considered, since we were simulating a study in which fingers were cut for a mark recapture study. Detecting one sporangium was sufficient to classify a sample as infected.

We performed heterogeneity tests to assess if the different data sets were comparable and could be pooled (Zar, 1999). Both H&E ($\chi^2 = 1314.7$, 253 df, $P < 0.0001$) and PAS ($\chi^2 = 1213.8$, 253 df, $P < 0.0001$) were heterogeneous. Because of this, we converted the data into an infection ratio (positives/totals) and applied the arcsine transformation before performing a repeated-measure analysis of variance to determine differences between the two stains, and the different body parts (Zar, 1999).

RESULTS

We found more samples infected with chytrid using PAS than H&E in all twelve body parts ($F = 25.506$, 1/23 df, $P = < 0.0001$). However, after a *post hoc* homogeneous groups tukey test ($\alpha = 0.05$), only the PP section was significantly different between stains (Fig. 1).

Differences among the twelve body parts were also significant ($F=8.032$, $11/253$ df, $P= <0.0001$). Pelvic patch and finger 1 were the best places to find chytrid (Fig. 2). We compared the effects of both body part and stain using a *post hoc* homogeneous groups tukey test ($\alpha = 0.05$) to determine which interactions would be the best and worst in detecting chytrid infections. Skin from PP and F1, both with the PAS stain, are the most effective in detecting infections. Samples from AB and GU were worst places to look for the disease, using either stain (Fig. 2).

Using the best combination of factors, we wanted to test how powerful this technique is when dealing with relatively light infections. To this end, we chose the six least infected animals, and calculated how many sections without sporangia would be needed to confidently conclude that there was no infection. We used the binomial 95% confidence limit to calculate this parameter (Table 1). If all the samples are pooled, only two sections are needed to be in the upper confidence limit. But if the data are checked individually, there are some individuals in which up to 17, sections are needed to reach the same confidence.

DISCUSSION

Although PAS was always slightly better at detecting chytrid infections, our results show that it was significantly better detecting the disease only in PP. Given the greater availability of H&E, we recommend its routine use in most samples, and use of special stains such as PAS when greater confidence is needed.

It is not surprising that skin from body sections in constant contact with the ground have a much higher chance of having chytridiomycosis than samples from other

areas, such as the GU and AB. However, no systematic sampling has been done with other species. A similar pattern of infection was found in one *Hyalinobatrachium fleischmanni* specimen that bred and died in captivity, indicating, that this could be a shared infection process across species (Puschendorf and Kubicki, unpublished).

Infections probably start in these areas. As the disease develops, they probably spread to sections of the GU and the AB. The PP is an extremely vascularized area in most anurans because of its mayor role in osmoregulation (Duellmann and Trueb, 1994). The skin here is constantly moistened and in contact with the ground. Removing skin in this area in live animals for disease surveys might not be feasible, but should be included in any scraping techniques using PCR to detect the disease.

In mark recapture studies, it is advised to spare the thumb from being cut, because that could limit sexual behavior in males during amplexus (Duellman and Trueb, 1994). Most projects that have used fingers for their analysis (Berger *et al.*, 1999) probably underestimate infection rates. For example, our data show that with the T5 X H&E combination and 432 sections, only an average of 46 % of the samples were found infected. It is clear that even if the best combinations of factors are used, a few ribbons are not enough to determine if a specimen is infected. A strong effort should be made before deciding that the fungus is absent.

Although new, and hopefully more accurate genetic assays for fungal infections have been developed (<http://www.open.ac.uk/daptf/declines/decl2.htm>), work on formalin fixed museum specimens will probably continue relying on histological techniques (Schander and Halanych, 2003). Finding old museum specimens infected could become an impossible task, because of the relatively small sample size of

amphibians found in collections per collection event. If the abundance of *B. dendrobatidis* were lower, even more samples would be needed.

Another way of improving the detection power would be achieved by cutting down the skin from the ventral side, and rolling it up, before taking a transversal sample of the roll of skin (Green, com. pers). This technique increases the sampled area greatly, but causes great damage to the specimen.

In conclusion, a large sample size, both in term of specimens and of sections per specimen are necessary in order to minimize false negatives. The data presented here show that it will especially hard to prove that *B. dendrobatidis* was not present at a site before the amphibians there disappeared. At least in the Neotropics, old and systematic collections of sites seem to be very scarce. Highland sites, which have presented no evident declines documented so far, might hold the key in proving if this pathogen is introduced or has always been around these sites, causing sporadic outbreaks in response to other triggering factors.

ACKNOWLEDGMENTS

This project would not have been possible without the help of the staff of the pathology lab, of the National Childrens Hospital, specially María del Carmen Obando, Martín Sánchez and Alfonso Carranza. William Eberhard was a key person in the development of this project, we greatly acknowledge and thank for his support throughout the process. Bert Kohlmann, Ana Victoria Lizano, Gerardo Chaves, Karen Lips, Ana Carolina Carnaval were kind enough to give comments on early versions of

the draft. Brian Kubicki was of great help with the fieldwork. This paper is a contribution of the Museum of Zoology, Universidad de Costa Rica.

LITERATURE CITED

ALLEN, T.C. 1992. Hematoxilin and eosin. *In* E.B.Prophet, B.Mills, J.B. Arrington and L.H. Sobin (eds.), Histotechnological methods, pp. 55-60. Institute of Pathology, of the Armed Forced of the United States of America.

ARRINGTON, J.B. 1992. Bacteria, fungi and other microorganisms. *In* E.B. Prophet, B.Mills, J.B. Arrington and L.H. Sobin (eds.) Histotechnological methods. pp. 209-238 of Pathology, Institute of the Armed Forced of the United States of America.

BERGER, L., R. SPEARE, P. DASZAK, D.E. GREEN, A.A. CUNNINGHAM, C.L. GOGGINS, R. SLOCOMBE, M.A. RAGAN, A.D. HYATT, K.R. MCDONALD, H.B. HINES, K.R. LIPS, G. MARANTELLI AND H PARKES. 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., R.SPEAR, AND A. HYATT. 1999. Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. *Overview, implications and future*

directions. *In* A. Campbell (ed.) *Declines and disappearances of Australian frogs*, pp. 21-31. Environmental Australia. Canberra. Australia.

BERGER, L. AND A.D. HYATT. 2000. Chytrid fungi and amphibian declines: Overview, implications and future directions. *In* A. Campbell (ed), *Declines and disappearances of Australian frogs*, pp. 21-31. Environmental Australia, Canberra. Australia.

BERGER, L., A.D. HYATT, V. OLSEN, S.G. HENGESBERGER, D. BOYLE, G. MARANTELLI, K. HUMPHREYS AND J.E. LONGCORE. 2002. Production of polyclonal antibodies to *Batrachochytrium dendrobatidis* and their use in an immunoperoxidase test for chytridiomycosis in amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms* 48: 212-213.

COLLINS, J.P., AND A. STORFER. 2003. Global amphibian declines: Sorting the hypotheses. *Diversity and Distribution* 9: 89-98.

DASZAK, P., L. BERGER, A.A. CUNNINGHAM, A.D. HYATT, D.E. GREEN, AND R. SPEARE. 1999. Emerging infectious disease and population declines. *Emerging infectious diseases* 5:735-748

DASZAK, P., A.A. CUNNINGHAM AND A.D. HYATT. 2003. Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions* 9: 141-150.

DAVIDSON, W.E., M.PARIS, J.P.COLLINS, J.E.LONGCORE, A.P.PESIER AND J. BRUNNER. 2003. Pathogenicity and transmission of chytridiomycosis in Tiger Salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Copeia* 3: 601-607.

GAFFNEY, E. 1992. Carbon hydrates. *In* . E.B.Prophet, B.Mills, J.B. Arrington and L.H. Sobin (eds.) *Histotechnological methods*, pp. 153. Institute of Pathology, of the Armed Forces of the United States of America.

DONNELLY, M.A., AND C. GUYER. 1994. Mark-Recapture. *In* W.R. Heyer, M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, L.C. Hayek and M.S. Foster (eds.), *Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Amphibians*, pp.183. Smithsonian Institution Press.

DUELLMAN, W.D. AND L. TRUEB. 1994. *Biology of Amphibians*. The John Hopkins University Press.

MOREHOUSE, E.A, T.Y. JAMES, A.R.D. GANLEY, R. VILGALYS, L. BERGER, P.J. MURPHY AND J. LONGCORE. 2003. Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone. *Molecular Ecology* 12: 395-403.

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., D.E. GREEN, R. PAPENDICK. 2003. Chytridiomycosis in wild frogs from southern Costa Rica. *Journal of Herpetology* 37: 215-218.

PESSIER, A.P., D.K. NICHOLS, J.E. LONGCORE AND M.S. FULLER.1999. Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11: 194-199.

POUNDS, J.A., AND M.L. CRUMP. 1994. Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Conservation Biology* 8:72-85

POUNDS, J.A., M.P.L. FODGEN, J.M. SAVAGE, G.C. GORMAN. 1997. Test of null models for amphibian declines on a tropical mountain. *Conservation Biology* 11:1307-1322.

PUSCHENDORF, R. 2003. *Atelopus varius* (Harlequin frog). Fungal infection. *Herpetological Review* 34(2): 355.

SAVAGE, J.M. 2002. The amphibians and reptiles of Costa Rica: a herpetofauna between two continents, between two seas. Society for the Study of Amphibians and Reptiles.

SCHANDER, C. AND HALANYCH, K.M. 2003. DNA, PCR and formalinized animal tissue-a short review and protocols. *Organisms Diversity and Evolution* 3: 195-205.

ZAR, J.H. 1999. Biostatistical analysis. Department of biological Science, Northern Illinois University.

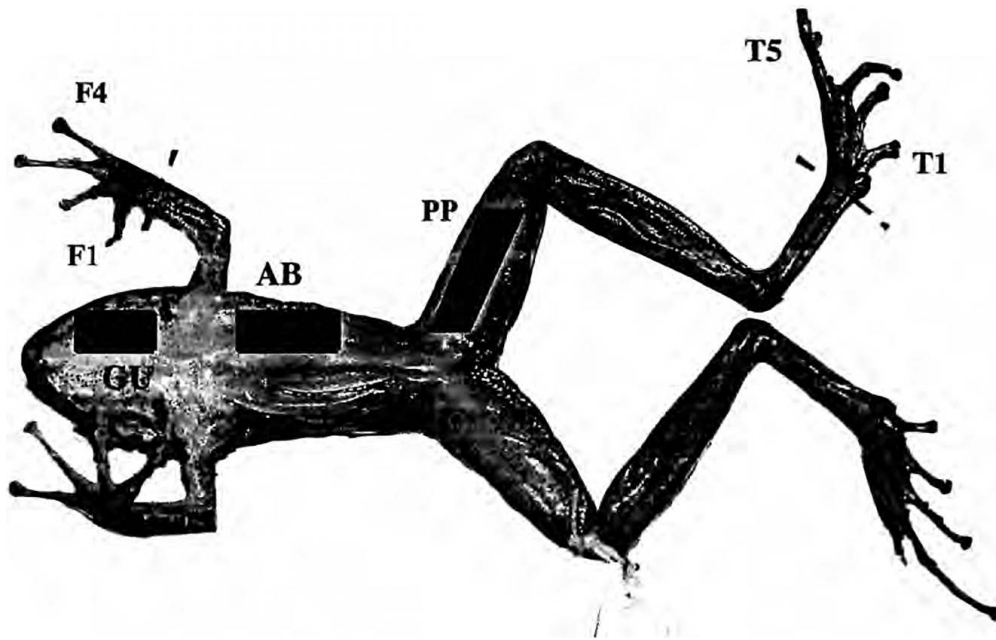


Figure 1. Body parts examined

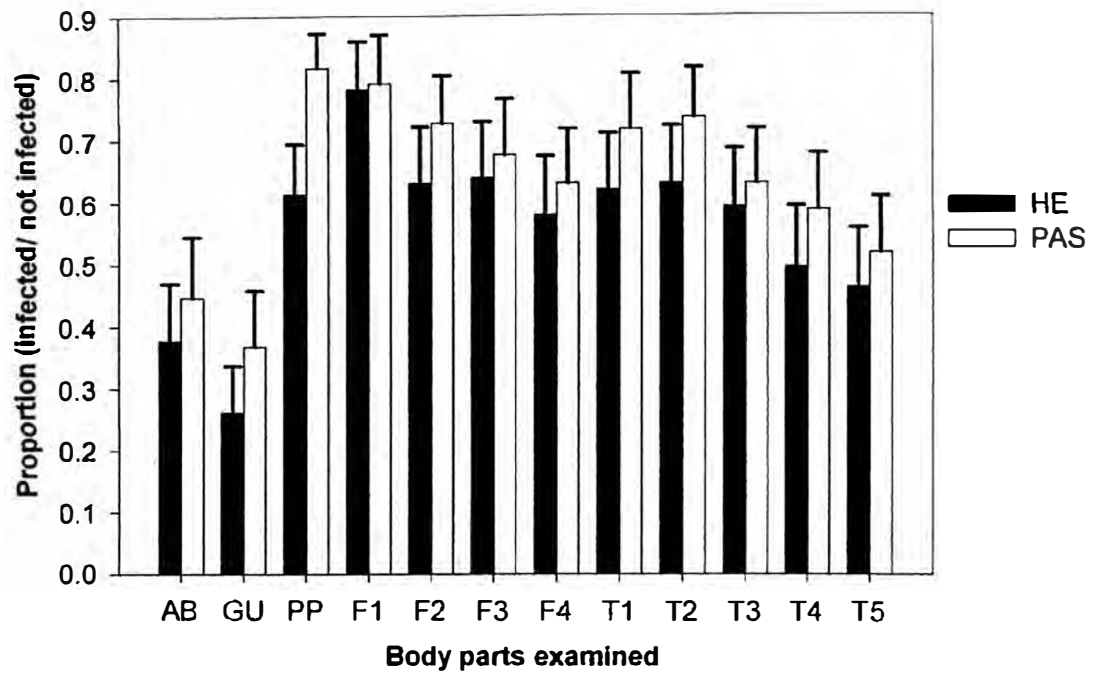


Figure 2. Average and standard error of infection in the different body parts using the H&E and PAS stains.

Table 1. Number of sections needed in order to achieve different confidence levels. The average infection of the twenty four animals on the most powerful detection combination (PP X PAS), plus the six animals with the lightest PP infection are shown here. The probability that none of the sections examined were positive is shown here. N equals the number of animals in the study with that infection rate.

Number of sections examined	# of positives/ total # of sections				
	(353/432) (N=24)	(9/18) (N=2)	(7/18) (N=2)	(6/18) (N=1)	(3/18) (N=1)
1	0.1829	0.50000	0.61111	0.6667	0.833
2	0.0334	0.25000	0.37346	0.4444	0.6944
3		0.12500	0.22822	0.2963	0.5787
4		0.0625	0.13947	0.1975	0.4823
5		0.0313	0.08523	0.1317	0.4019
6			0.05209	0.0878	0.3349
7			0.03183	0.0585	0.2791
8				0.0390	0.2326
9					0.1938
10					0.1615
11					0.1346
12					0.1122
13					0.0935
14					0.0779
15					0.0649
16					0.0541
17					0.0451