

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA
EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL UNIDAD OAXACA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS
NATURALES**

(PATRONES Y PROCESOS PARA LA BIODIVERSIDAD DEL NEOTRÓPICO)

**IDENTIFICACIÓN DE MICOSIS DERMATOLÓGICAS EN
MURCIÉLAGOS DE OAXACA**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Héctor David Tamayo Martínez

DIRECTOR DE TESIS:

M en C. Graciela Eugenia González Pérez

DICIEMBRE, 2018



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca siendo las 13:00 horas del día 29 del mes de octubre del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR OAXACA para examinar la tesis titulada:
Identificación de micosis dermatológicas en murciélagos de Oaxaca

Presentada por el alumno:

Tamayo
Apellido paterno
Nombre(s) Héctor David

Martínez
Apellido materno

Con registro:

A	1	7	0	4	8	0
---	---	---	---	---	---	---

Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis

M. en C. Graciela Eugenia González Pérez

Dr. Miguel Ángel Briones Salas

Dr. John Newhall Williams

M. en C. Gladys Isabel Manzanero Medina

Dr. Miguel Ángel Domínguez Martínez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE
PROFESORES

Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO REGIONAL
CIIDIR
UNIDAD OAXACA



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca el día 10 del mes de diciembre el año 2018, el (la) que suscribe **Héctor David Tamayo Martínez** alumno(a) del Programa de Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales con número de registro A170480, adscrito a Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la M. en C. Graciela Eugenia González Pérez y cede los derechos del trabajo intitulado **Identificación de micosis dermatológicas en murciélagos de Oaxaca**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección mvztamay0@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Héctor David Tamayo Martínez

Nombre y firma

Índice

Abstract	1
Resumen.....	2
Agradecimientos	3
Dedicatoria	4
Introducción General	5
Capítulo uno:	7
Infección por <i>Debaryomyces sp</i> (Fungi) en un murciélago <i>Myotis velifer</i>	7
Introducción	7
Metodología	8
<i>Sitio de estudio</i>	8
<i>Captura de murciélagos.</i>	8
<i>Examen clínico, y pruebas complementarias.</i>	8
<i>Eutanasia y toma de muestras.</i>	8
<i>Histopatología.</i>	8
<i>Secuenciación del microbioma.</i>	8
Resultados	9
<i>Examen clínico</i>	9
Histología.....	10
Microbioma fúngico.	10
Discusión.	13
Referencias documentales:	14
Capítulo Dos:	16
Identificación de Debaryomicosis (<i>Debaryomyces sp</i>) y síndrome de nariz blanca (<i>Pseudogeomys destructans</i>) en murciélagos de cuatro localidades de Oaxaca.	16
Introducción	16
Metodología	17
<i>Sitios de estudio</i>	17
<i>Captura de murciélagos.</i>	18
<i>Índice de daño a las alas.</i>	18
<i>Lámpara de Wood.</i>	18
<i>Eutanasia.</i>	18

<i>Histopatología</i>	18
<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final Debaryomyces sp.</i>	19
<i>Secuenciación Sanger</i>	19
Diseño de árbol filogenético para el género <i>Debaryomyces sp.</i>	20
<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detección de Pseudogymnoascus destructans</i>	20
Resultados	21
<i>Captura de murciélagos con lesiones en alas</i>	21
Índice de Daño en alas (IDA) y lesiones dermatológicas	21
Histopatología	26
PCR de punto final para detección de <i>Debaryomyces sp.</i>	28
Resultados Secuenciación Sanger	28
Análisis filogenético de la secuencia obtenida mediante secuenciación Sanger	29
PCR de punto final para la detección de <i>Pseudogymnoascus destructans</i>	30
Discusión	32
Conclusiones	34
Referencias documentales	35
Anexo 1: Contigs obtenidos por medio de la secuenciación masiva.	38

Índice de Figuras

Figura 1: Presencia de lesiones ulcerativas de forma irregular (Flecha roja) y redondas (Flecha azul). La lesión representa un 50% de la superficie del plagiopatagio y se extiende hasta el uropatagio.	9
Figura 2: Presencia intrafolicular de hifas anfofililicas de forma ovalada (Flecha blanca).	10
Figura 3: Sturnira Ludivoci con presencia de lesiones ulcerativas redondas focales.	23
Figura 4: Myotis velifer con presencia de lesiones ulcerativas irregulares (Flechas rosas).	24
Figura 5: Sturnira ludovici con presencia de lesión ulcerativa involucrando los tejidos de labio y hoja nasal.	24
Figura 6: Myotis velifer con necrosis en las orejas (Flecha roja).	25
Figura 7: Myotis velifer con alopecia en hombro derecho y necrosis en orejas.	25
Figura 8: Se observa la presencia de conidios intralesionales (flecha roja) y abundante infiltrado inflamatorio (Flecha negra).	26
Figura 9: Presencia de hifas en forma de racimo (Flecha roja), láminas paralelas de queratina anucleada (Flecha negra).	27
Figura 10: Presencia de infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos, células plasmáticas entremezcladas con restos celulares.	27
Figura 11: Visualización de productos de PCR para la detección de Debaryomyces sp. En la imagen se observa el control negativo, y 5 reacciones positivas utilizando ADN genómico extraído de las alas lesionadas de los murciélagos previamente descritos, el fragmento amplificado corresponde al tamaño esperado de 380 pares de bases (pb).	28
Figura 12: Árbol filogenético generado mediante el método Neighbor- Joining (Bootstrap = 1000 réplicas).	29
Figura 13: Visualización de productos de PCR para la detección de P. destructans. En la imagen se observa el control negativo (-), y 3 reacciones positivas utilizando el ADN genómico extraído de las alas lesionadas de los murciélagos previamente mencionados, el tamaño del fragmento corresponde a un producto esperado de 624pb.	30

Índice de Tablas

Tabla 1: Microbioma fúngico (Diversidad fúngica): En la tabla observamos 5 columnas, la primera corresponde a la especie identificada para cada secuencia, la segunda corresponde al porcentaje de identidad con relación al banco de datos de NCBI, la tercera columna corresponde al número de lecturas que se obtuvieron por medio de la secuenciación masiva, la cuarta corresponde a la clave con la secuencia comparada del NCBI y la final corresponde al % de las lecturas totales de la secuenciación masiva.	11
Tabla 2: Índice de daño alar en murciélagos con presencia de lesiones en alas.	21
Tabla 3: Lista de murciélagos incluidos en el estudio y resultado comparativo de PCR.	30

Abstract

Bats are the only group of mammals with the ability to develop the flight. This displacement system is more effective, however needs large amount of energy to be used, for this bat have developed morphological and physiological adaptations as the lengthening of the phalanges, the development of patagio and the gas exchange through in the patagio.

Mexico has 144 bat species 96 of these are present in the Oaxaca state, several studies of ecology have been developed in this state, however the dermatology health of this group has not yet been evaluated.

The objective of the following work was to identify the presence of mycotic pathogens in four points of the state, where bats are reported with dermatological lesions on the wings. For them the work is divided into two chapters. The first chapter approaches the pathological and molecular identification of the pathogenic fungus *Debaryomyces maramus* infecting a *Myotis velifer* bat, in the San Pedro Yolox community, Sierra Norte of Oaxaca. The chapter two approaches the design of a endpoint PCR test for the identification of *Debaryomyces sp.* and the application of the endpoint PCR test for *Pseudogymnoascus destructans* agents that causes White nose syndrome as well as the histopathology of the injuries show on bats of San Pedro Yolox, San Sebastian de las Grutas, San Pedro Molinos y Santa Cruz Xoxocotlan, Oaxaca.

The following work presents the first evidence of the presence of *Debaryomyces sp.* y *P. destructans* affecting bats in Mexico, as well the first time these diseases are detected in the Neotropical region and affecting a species no reported as susceptible to them (*Sturnira ludovici*).

Resumen

Los murciélagos han sido el único grupo de mamíferos con la capacidad de desarrollar el vuelo. Este sistema de desplazamiento es bastante efectivo sin embargo necesita de grandes cantidades de energía para ser utilizado, es por esto que los murciélagos han desarrollado adaptaciones morfológicas y fisiológicas como el alargamiento de las falanges, el desarrollo del patagio y el intercambio gaseoso a través del patagio.

México posee 144 especies de murciélagos, de las cuales 96 se encuentran en el estado de Oaxaca. En el estado se han realizado diversos estudios sobre ecología, sin embargo, aún no se ha evaluado la salud dermatológica de este grupo.

El objetivo del siguiente trabajo fue identificar la presencia de patógenos micóticos en cuatro localidades del Estado donde se reportaron murciélagos con lesiones dermatológicas en las alas. El trabajo está dividido en dos capítulos; el primer capítulo aborda la identificación histopatológica y molecular del hongo *Debaryomyces sp.* infectando un murciélago *Myotis velifer*, en la comunidad San Pedro Yolox, en la Sierra Norte de Oaxaca. El capítulo dos aborda el diseño de una prueba de PCR de punto final para la identificación de *Debaryomyces sp.* y la aplicación de una prueba de PCR de punto final previamente reportada para la detección de *Pseudogymnoascus destructans* agente causante del síndrome de nariz blanca, así como el análisis histopatológico de las lesiones mostradas en murciélagos de San Pedro Yolox, en San Sebastián de las Grutas, San Pedro Molinos y Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.

El trabajo presenta el primer reporte sobre la presencia de *Debaryomyces sp.* y *P. destructans* afectando murciélagos en México, así como la primera vez que estas enfermedades son detectadas en la región neo-tropical afectando una especie no reportada como susceptible a éstas (*Sturnira ludovici*).

Agradecimientos

Agradezco al Doctor Miguel Ángel Briones Salas por haber confiado en mi persona, así mismo por sus consejos y apoyos antes y durante mis estudios de maestría.

A la Maestra Graciela Eugenia González Pérez por aceptarme como su estudiante y asesorado en mis estudios de maestría, así como el apoyo y la confianza brindada a mi proyecto de investigación.

Al Doctor Miguel Ángel Domínguez Martínez, por haberme apoyado con las asesoría e instalaciones de su laboratorio, para poner a punto las pruebas moleculares que hicieron posible los resultados solidos de este trabajo.

A la Doctora Margarita García, por haber notado la presencia de poblaciones de murciélagos afectadas y confiar en mi criterio para abordar el diagnostico de estas enfermedades.

A los docentes del posgrado que con sus enseñanzas han sembrado el conocimiento para acometer esta ardua labor de investigación.

A las comunidades que me permitieron y apoyaron en desarrollar mis actividades de investigación dentro de sus territorios.

Al CONACYT por haberme otorgado una Beca con la cual desarrolle de tiempo completo mis estudios de posgrado.

Finalmente, a mis compañeros de laboratorio: Mario, Magaly, Roció, las Gabys, Teresa y Carlos, por haber contribuido con mi desarrollo profesional, por apoyarme en mi trabajo de campo, escritorio y sobre todo por brindarme su apoyo incondicional y amistad.

Dedicatoria

Este trabajo de investigación está dedicado a esa persona que siempre confía en que llevaré a cabo los planes que elaboro, que está para escucharme y darme ánimo cada que decaigo, y que está para extender su mano cada que necesito apoyo. Mely este escrito es para ti.

A este grupo de mamíferos que a lo largo de 2 años me ha asombrado, llenado de satisfacciones, desarrollado mis sentidos y mejorado mi conocimiento acerca de poblaciones silvestres. Esta investigación es la primera dedicada a estos seres que se encargan de mantener la delgada línea del equilibrio en nuestro mundo, para ustedes murciélagos, guardianes de la noche.

Introducción General

Los quirópteros han sido el único grupo de mamíferos que han desarrollado la capacidad para volar, si bien algunas ardillas como las del género *Glaucomys* o marsupiales como los Petauros del azúcar (*Petauros breviceps*) tienen la capacidad de planear debido al desarrollo de su patagio, distan mucho de poder volar *per se* (Grzimeck's, 2004). La capacidad de vuelo ha llevado a este grupo a desarrollar características anatómicas y fisiológicas especiales que no se han visto en otro mamífero.

El esqueleto de los quirópteros tiene un tamaño reducido presentando siete vértebras cervicales, 11 torácicas y hasta 10 caudales, en algunas familias la última vértebra cervical y la primera torácica se encuentran fusionadas. El esternón tiene forma de "T" y se compone de 2 segmentos, las quillas ventrales se proyectan desde el manubrio y el cuerpo esternal en algunas especies, en otras, la musculatura pectoral se encuentra unida a una lámina de tendón en la línea media, los largos procesos del manubrio articulan con las clavículas que son muy desarrolladas (Gatesy, 2007). Los miembros anteriores presentan un humero reducido en tamaño, un radio del doble de tamaño en comparación con su humero, que se encuentra fusionado con la ulna, la mano está formada por seis huesos carpales, cinco metacarpales y cinco falanges. Entre el primer dígito (homólogo al pulgar) y el segundo, se encuentra el dactilopatagio brevis; entre el 2º, 3º y 4º dígito se encuentra el dactilopatagio y finalmente, entre el 5º dígito y el borde lateral del cuerpo se proyecta el plagiopatagio (Barnard, 2009).

Las membranas alares y caudales (plagiopatagio, dactilopatagio y uropatagio), están soportadas por una combinación de elementos musculares y conectivos, la estructura primaria del tejido conectivo del ala es un sistema de haces de fibras de colágeno y elastina organizados en un andamio regular de malla. Se ha sugerido que la red fibrosa permite flexibilidad, al mismo tiempo que proporciona resistencia a la tracción y limitación de la extensibilidad del ala (Swartz- Groves, 1996).

El vuelo es un sistema de locomoción muy eficiente, sin embargo, es bastante costoso energéticamente, esta actividad genera grandes cantidades de calor que deben ser disipadas, los vasos sanguíneos presentes en las membranas alares cumplen la función de regular la temperatura del cuerpo liberando o conservando el calor generado por la actividad del vuelo a manera de un radiador (Barnard, 2009). Así mismo, el vuelo es una actividad que consume grandes cantidades de oxígeno, para compensar esta necesidad extra de oxígeno, las membranas alares ocupan el 85% de la superficie corporal de un murciélago, lo que permite cubrir del 6% al 10% de la demanda de oxígeno necesaria para este (Makanya, 2007).

La diversidad mundial de murciélagos está representada por 1411 especies divididas en dos sub-órdenes, Megaquiropteros (167 especies) y Microquiropteros (1244 especies). México destaca por ser el cuarto lugar de los países con mayor número de especies endémicas de murciélagos (13 especies) (Mickleburgh, et al, 2002; Mammal Diversity Database. 2018), además de albergar un considerable número de especies (144 especies) (Ramírez-Pulido, 2014). Dentro de México, el estado Oaxaca presenta una gran diversidad en este estado pueden ser encontradas 96 especies de quirópteros de las 144 que habitan en México (Briones salas, 2015).

Los murciélagos desempeñan un papel importante para el equilibrio ecológico a través de los servicios ecosistémicos que brindan, de estos destaca el control natural de poblaciones de insectos, la dispersión de semillas por parte de las especies frugívoras y la polinización de varias plantas de importancia económica por parte de las especies nectarívoras (García-Morales et al, 2014). En contraste a su importancia ecológica, se ha identificado que estos mamíferos juegan un papel determinante en la diseminación de algunas enfermedades potencialmente peligrosas para el humano, como el virus de la rabia o el virus Nipah (Chua et al, 2000). Diversos estudios se han enfocado en identificar el papel que juegan los quirópteros en la presentación de enfermedades, sin embargo, pocos han estudiado como tal, el impacto que las enfermedades ocasionan a este grupo creando un vacío en las investigaciones epidemiológicas.

El presente documento tiene como objetivo identificar el agente causal de lesiones observadas en las alas de murciélagos en diferentes localidades del estado de Oaxaca, el documento está dividido en dos capítulos, en el primero se aborda la identificación de una micosis dermatológica en un murciélago *Myotis velifer* en la Sierra Norte del Estado de Oaxaca. En el capítulo dos se desarrolla un estudio de identificación de dos enfermedades micóticas (*Debaryomyces sp*, *Pseudogimnoascus destructans*), determinando las especies que se encuentran afectadas en cuatro localidades del estado de Oaxaca. La identificación de las enfermedades se realizó mediante métodos clínico-patológicos y moleculares y se describen las lesiones macroscópicas e histológicas presentes en las alas de murciélagos.

Capítulo uno:

Infección por *Debaryomyces sp* (Fungi) en un murciélago *Myotis velifer*

Introducción

A partir del primer brote de síndrome de la nariz blanca (SDNB) provocada por el hongo psicrófilo *Pseudogymnascus destructans* detectado en los Estados Unidos en el año 2006, se ha documentado la muerte de más de 5 millones de murciélagos por esta enfermedad en Estados Unidos y Canadá, llegando al punto de provocar extinciones locales (Meteyer et al., 2012). Los murciélagos afectados son infectados en la época de hibernación, debido al declive natural que sufre el sistema inmune durante este periodo. El SDNB se caracteriza por causar el crecimiento de hifas sobre las orejas, nariz y metatarsos de los murciélagos. La infección coloniza los tejidos (hocico, antebrazo y alas) ocasionando la destrucción de las glándulas apocrinas, glándulas sebáceas y folículos pilosos (Cryan et al., 2010). Debido a que las alas juegan un papel fundamental en el intercambio gaseoso (contribuyen con el 10% del intercambio gaseoso total) (Makanya and Mortola, 2007) las lesiones provocadas por el SDNB impactan en dicho proceso, así como en la movilidad y la hidratación de los murciélagos infectados.

Las lesiones cutáneas han sido descritas como el hallazgo más común de enfermedad en murciélagos (Fountain et al., 2017). Además de *P. destructans*, se ha puesto de manifiesto la presencia de otros hongos patógenos como: *Trichophyton redellii* y *Debaryomyces sp.* *T. redellii* se caracteriza por desarrollar lesiones en las alas similares al SDNB, con las diferencias que no presenta fluorescencia al ser expuesto a lámpara UV (Prueba de Wood) y no se encuentra el crecimiento característico de estructuras fúngicas en el hocico y orejas. Por otra parte, *Debaryomyces sp.* ha sido reportado en un caso con lesiones similares al SDNB sin abordar detalladamente el estado del ejemplar infectado (Lorch et al., 2015).

En febrero de 2017, realizando estudios sobre la comunidad de murciélagos en un bosque templado de la comunidad de San Pedro Yolox, distrito de Ixtlán en la Sierra Madre de Oaxaca, fue colectado con la técnica de redes de niebla un murciélago de la especie *Myotis velifer* con lesiones dermatológicas en las alas. En este capítulo se presentan los resultados de detección del hongo *Debaryomyces sp.* en este ejemplar de murciélago, utilizando histopatología para describir las lesiones microscópicas y secuenciación masiva del microbioma fúngico para evaluar a las especies micóticas presentes en el tejido, sentando las bases para la detección de este patógeno en otras poblaciones de murciélagos.

Metodología

Sitio de estudio

San Pedro Yolox, distrito de Ixtlán, Sierra Norte Oaxaca, ubicado en las coordenadas geográficas 17°35'18.8"N 96°33'04.9"W. El clima predominante es cálido húmedo con lluvias todo el año, la temperatura media anual varía de 22-26°C y la precipitación anual de 2,500-4,000 mm. Los tipos de vegetación que se distribuyen en el área son: bosque de pino, bosque mesófilo de montaña, bosque de encino y selva mediana perennifolia (INEGI 2009).

Captura de murciélagos.

La captura se realizó mediante una red de niebla (12 x 3 m) que fue colocada en una salida de una casa inhabitada, utilizada como refugio temporal por murciélagos (Casa inhabitada).

Examen clínico, y pruebas complementarias.

Se utilizó la metodología propuesta por Barnard (2009) para realizar el examen clínico en quiropteros, este examen fue complementado utilizando el índice de daño alar en una escala de 0-5 tal como lo propone Reichard y Kunz (2009) las pruebas de lámpara de Wood (Turner et al, 2014) y tricografía (Miller et al, 2013).

Eutanasia y toma de muestras.

La eutanasia se llevó a cabo por el método de dislocación cervical siguiendo el protocolo de la American Veterinary Medical Association "Guidelines for the eutanasia of animals" (Underwood et al, 2013). Fueron colectadas 2 muestras del plagiopatagio de 3 cm², una fue incluida en formol al 10% y la segunda fue mantenida en congelación a -20°C.

Histopatología.

La muestra obtenida del murciélago almacenada en formol, fue colocada en un cassette para histología e incluida en parafina, se cortaron secciones de 5 micras las cuales fueron teñidas con la técnica de hematoxilina y eosina para muestras histológicas.

Secuenciación del microbioma.

El ADN genómico del tejido colectado fue aislado utilizando el kit comercial DNeasyR Blood & Tissue (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La región ITS fúngica fue amplificada con los cebadores ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) y 5.8S_fungi (CAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT) (Young et al., 2014) y secuenciada utilizando un pirosecuenciador 454 (454 Life Science, Roche diagnostics). Los contig's obtenidos fueron ensamblados usando los programas bioinformáticos Newbler v. 2.5.3 (Roche diagnostics, Brandford, CT) y Consed v.23 (<http://www.phrap.org/consed/consed.html>). Las secuencias fueron ordenadas de acuerdo con el número de lecturas obtenidas y comparadas con la información contenida en la base de datos del NCBI mediante la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Resultados.

Examen clínico

Se examinó un ejemplar de murciélago de la especie *Myotis velifer* macho adulto, el cual presentaba un índice de daño alar de 4, con lesiones ulcerativas, algunas de forma redonda y otras de forma irregular en dactilopatagio, plagiopatagio y uropatagio (Figura 1).; El ejemplar obtuvo fluorescencia negativa con la prueba de lámpara de Wood, y fue negativo a cambios en la conformación del pelo así como invasiones micóticas en los mismos por medio de la tricografía.



Figura 1: Presencia de lesiones ulcerativas de forma irregular (Flecha roja) y redondas (Flecha azul). La lesión representa un 50% de la superficie del plagiopatagio y se extiende hasta el uropatagio.

Histología.

Mediante la revisión microscópica, el estrato corneo se observó aumentado de tamaño por laminas paralelas de queratina anucleada (hiperqueratosis), dentro de algunos folículos pilosos se observaron hifas anfófilicas ovaladas de una medida entre 6 y 9 nm (Figura 2).

Microbioma fúngico.

Se obtuvieron un total de 19840 lecturas (anexo 1) de las cuales 17738 (89%) correspondieron a una secuencia con una similitud del 98% con la región ITS de *Debaryomyces maramus* reportada en la base de datos del NCBI (KM091320.1) (Tabla 1). Del resto de lecturas obtenidas, únicamente dos secuencias correspondientes a los hongos no patógenos *Beauveria bassiana* (KY806126.1) y *Pleurotus dryinus* (KY962461.1) mostraron un número de lecturas superior a ~350, esto nos indica que estas especies se encuentran en menor medida formando parte de la microbiota normal de este murciélago. el resto de especies fúngicas que conforman el microbioma son expresadas en la Tabla 1.

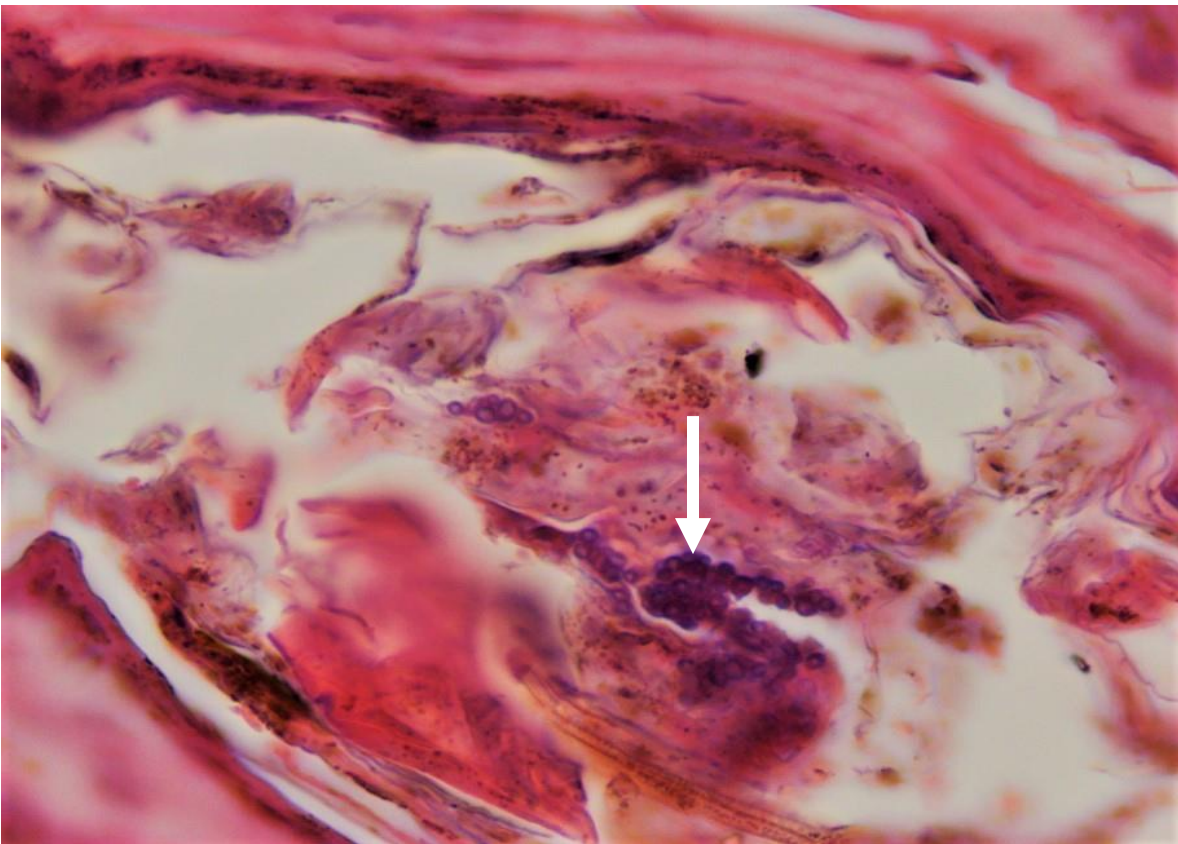


Figura 2: Presencia intrafolicular de hifas anfófilicas de forma ovalada (Flecha blanca).

Tabla 1: Microbioma fúngico obtenido a partir de la técnica de secuenciación masiva (Diversidad fúngica): En la tabla observamos 5 columnas, la primera corresponde a la especie identificada para cada secuencia, la segunda corresponde al porcentaje de identidad con relación al banco de datos de NCBI, la tercera columna corresponde al número de lecturas que se obtuvieron por medio de la secuenciación masiva, la cuarta corresponde a la clave con la secuencia comparada del NCBI y la final corresponde al % de las lecturas totales de la secuenciación masiva.

Especie	% de identidad	Lecturas	clave	% de lecturas
<i>Debaryomyces maramus</i>	98	17738	KM091320.1	89.40524194
<i>Beauveria bassiana</i>	100	364	KY806126.1	1.834677419
<i>Pleurotus dryinus</i>	99	342	KY962461.1	1.723790323
<i>Malassezia dermatis</i>	92	287	KY104083.1	1.446572581
<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	100	108	KM979510.1	0.544354839
<i>Curvularia aerea</i>	98	84	MF101868.1	0.423387097
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	100	75	KY781763.1	0.378024194
<i>Alternaria solani</i>	99	71	KT384228.1	0.357862903
<i>Nigrospora sphaerica</i>	100	52	KX688172.1	0.262096774
L042880-122	99	45	GU053988.1	0.226814516
<i>Cora leslactuca</i>	100	41	KY772646.1	0.206653226
<i>Oxyporus populinus</i>	99	36	KJ140633.1	0.181451613
<i>Ganoderma sp.</i>	99	35	KF605667.1	0.17641129
<i>Pyrigemmula aurantiaca</i>	89	35	HM241692.1	0.17641129
<i>Microascus hollandicus</i>	99	32	KX923869.1	0.161290323
Hongo endofito 6303	100	32	KR016373.1	0.161290323
<i>Trichurus spiralis</i>	93	29	LN850977.1	0.146169355
<i>Phialemonium inflatum</i>	99	24	KY305080.1	0.120967742
<i>Camarosporula personiae</i>	93	24	JF770449.1	0.120967742
109A77714	95	22	JX389420.1	0.110887097
<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	97	19	KM100720.1	0.095766129
<i>Phialophora intermedia-</i>	96	18	JQ766431.1	0.090725806
<i>Acalium albonigrescens</i>	97	18	NR146258.1	0.090725806
<i>Microascus hyalinus</i>	97	18	KX923871.1	0.090725806
<i>Marasmiceae sp.</i>	96	17	JF691144.1	0.085685484
<i>Punctularia subhepatica</i>	99	17	KP814559.1	0.085685484
<i>Aspergillus jensenii</i>	100	17	LN898704.1	0.085685484
<i>Ganoderma australe</i>	99	16	KU569545.1	0.080645161

44- 2966	95	16	FJ60971.1	0.080645161
<i>Hypomyces aurantius</i>	100	15	AB591044.1	0.075604839
<i>Filobasidium chernovii</i>	99	14	KY514746.1	0.070564516
<i>Cephalotrichiella penicillata</i>	83	13	KJ869166.1	0.065524194
<i>Microascus cirrosus</i>	97	13	LN850782.1	0.065524194
<i>Ilyonectria sp.</i>	100	12	KT270187.1	0.060483871
<i>Penicilium citreosulfuratum</i>	98	11	KY786079.1	0.055443548
<i>Hortaea werneckii</i>	100	11	KU882134.1	0.055443548
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	93	9	JX669447.1	0.045362903
<i>Microascus senegalensis</i>	98	9	KX923932.1	0.045362903
<i>Walleimia muriae</i>	97	9	KX911860.1	0.045362903
<i>Coprinopsis narcotica</i>	91	8	FM163180.1	0.040322581
<i>Neogymnomyces demonbreunii</i>	97	8	JN038187.1	0.040322581
<i>Phlebiopsis sp.</i>	84	7	KJ832027.1	0.035282258
<i>Coprinellus radians</i>	97	6	KU761146.1	0.030241935
<i>Rhodontura bacarum</i>	99	6	KY104725.1	0.030241935
<i>Steccherinum</i>	96	5	KM279619.1	0.025201613
<i>Hyphodontia apacheriensis</i>	98	5	KX857797.1	0.025201613
<i>Passalora pseudotithoniae</i>	100	4	NR137608.1	0.02016129
<i>Penicilium angulare</i>	98	4	NR121272.1	0.02016129
<i>Aspergillus caninus</i>	97	4	LC230093.1	0.02016129
<i>Chaetosphaeria myriocarpa</i>	94	4	JF340253.1	0.02016129
<i>Cladophialophora chaetospira</i>	93	3	EU137333.1	0.015120968
<i>Oidiodendron sp.</i>	94	3	JX270625.1	0.015120968
<i>Exophiala angulospora</i>	86	3	KR909169.1	0.015120968
<i>Didymosphaeria sp.</i>	92	2	KX965731.1	0.010080645
<i>Phialocephala dimorphospora</i>	99	2	KX881592.1	0.010080645
<i>Steccherinum albofibrillosum</i>	95	2	KP401770.1	0.010080645
<i>Chaetosphaeria sp.</i>	100	2	AY618225.1	0.010080645
<i>Hymenochaete sp.</i>	100	2	KU975490.1	0.010080645
<i>Chaetomium globosum</i>	96	2	MF682409.1	0.010080645
<i>Exophiala halophila</i>	100	1	NR111628.1	0.005040323

Discusión.

Los resultados del análisis molecular sumados a aquellos obtenidos en el estudio histopatológico señalan que el agente causal de las lesiones observadas en el ejemplar de *Myotis velifer* fue el hongo patógeno *Debaryomyces* sp.

El estudio histopatológico permitió la identificación del agente causal de las lesiones, mientras que la secuenciación masiva fue una herramienta clave a la hora de ensamblar el microbioma fúngico y poder evaluar el género que afectaba al murciélago.; La presencia de *Beauveria bassiana* también tuvo un resultado >300 lecturas, su presencia se puede explicar por los hábitos alimenticios insectívoros de la especie.; *B.bassiana* es un hongo entomopatógeno de distribución cosmopolita (Zimmerman, 2007), los insectos infectados por esta micosis podrían ser presas más fáciles para los murciélagos.; *Pleurotus dryinus* es una especie de basidiomiceto que puede desarrollarse sobre madera y algunas veces sobre los suelos (Baldrian, 2008), por lo que su detección no es extraña debido al tipo de ecosistema donde fue encontrado el espécimen (bosque de pino-encino).

Las lesiones presentes en el ejemplar descrito son muy similares a las observadas en alas de los murciélagos infectados por el SDNB con la excepción de que no muestran el crecimiento característico de las hifas sobre el hocico, orejas y antebrazo, por lo que *Debaryomyces* sp. debería de formar parte en los diagnósticos diferenciales del SDNB. Este patógeno solo había sido reportado en otro espécimen de *Myotis velifer* para Texas- Estados Unidos (Lorch et al., 2015) y esta es la primera vez que se encuentra en un murciélago en la región neotropical.

El género *Debaryomyces* se caracteriza por estar presente en gran variedad de suelos, algunas especies de esta familia ya han sido identificados como patógenos del humano. *D. hansenii* ha sido el más estudiado de estos, este patógeno está relacionado con la contaminación de catéteres intravenosos (Desnos- Ollivier et al, 2008), provocando infecciones oseas.; *D. Kloeckeri* ha sido aislado en abscesos, infecciones urinarias y dermatológicas, y finalmente *D. emphysematosis* ha sido aislado de pacientes con bronquitis (Wong et al, 1982).

Las implicaciones de este hallazgo pueden tener graves consecuencias en la conservación de los quirópteros. Aunque en México no se han reportado muertes masivas por infecciones micóticas, las lesiones mostradas en las membranas alares podrían tener un impacto severo en la movilidad, hidratación, termorregulación e intercambio gaseoso de los individuos afectados, es por ello que se recomienda seguir desarrollando líneas de investigación enfocadas hacia todos los posibles patógenos cutáneos encontrados en murciélagos y así contribuir en la conservación de los mismos.

Referencias documentales:

Baldrian, P. (2008). Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal Ecology*, 1(1), 4-12.

Bardnard, S.M., 2009. Bats in captivity- Volumen 1: Biological and medical aspects, 1st. ed. Logo Press.

Bello-Gutiérrez, J., Suzán, G., Hidalgo-Mihart, M. G., & Salas, G. (2010). Alopecia in bats from Tabasco, Mexico. *Journal of wildlife diseases*, 46(3), 1000-1004.

Briones-Salas, M., Cortés-Marcial, M., Lavariega, M.C., 2015. Diversidad y distribución geográfica de los mamíferos terrestres del estado de Oaxaca, México. *Rev. Mex. Biodivers.* 86, 685–710.

Chua, K. B., Bellini, W. J., Rota, P. A., Harcourt, B. H., Tamin, A., Lam, S. K., & Goldsmith, C. S. (2000). Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science*, 288(5470), 1432-1435.

Cryan, P.M., Meteyer, C.U., Boyles, J.G., Blehert, D.S., 2010. Wing pathology of white-nose syndrome in bats suggests life-threatening disruption of physiology. *BMC Biol.* 8:135, 1–8.

Desnos-Ollivier, M., Ragon, M., Robert, V., Raoux, D., Gantier, J. C., & Dromer, F. (2008). *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). *Journal of clinical microbiology*, 46(10), 3237-3242.

Fountain, K.I., Stevens, K.B., Lloyd, D.H., Loeffler, A., 2017. Skin disease in captive bats: results of an online survey of zoos and rehabilitators in Europe, North America and Australasia. *Vet. Dermatol.* 28, 219-e52.

García-Morales, R., Gordillo-Chávez, E. J., Valdez-Leal, J. D. D., & Pacheco-Figueroa, C. (2014). Las áreas naturales protegidas y su papel en la conservación de los murciélagos del estado de Tabasco, México. *Therya*, 5(3), 725-736.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos: San Pedro Yólox, Oaxaca. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Ciudad de México, México.

Lorch, J.M., Minnis, A.M., Meteyer, C.U., Redell, J.A., Paul, J., Kaarakka, H.M., Muller, L.K., Lindner, D.L., Verant, M.L., Blehert, D.S., 2015. The fungus *Trichophyton redellii* sp . nov . causes skin infections that resemble white-nose syndrome of hibernating bats infections that resemble white-nose syndrome of. *J. Wildl. Dis.* 51, 36–47.

Makanya, A.N., Mortola, J.P., 2007. The structural design of the bat wing web and its possible role in gas exchange. *J. Anat.* 211, 687–697.

Mammal Diversity Database. 2018. www.mammaldiversity.org. American Society of Mammalogists. Accessed 2018-11-28.

Meteyer, C.U., Barber, D., Mandl, J.N., 2012. Pathology in euthermic bats with white nose syndrome suggests a natural manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome. *Virulence*.

Miller, W. H., Griffin, C. E., Campbell, K. L., & Muller, G. H. (2013). *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology*: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. Elsevier Health Sciences.

Ramirez-Pulido, J., Gonzalez-Ruiz, N., Gardner, A.L., Arroyo-Cabrales, J., 2014. List of recent land mammals from Mexico, 2014. Texas Tech University Natural Science Research Laboratory.

Reichard, J. D., & Kunz, T. H. (2009). White-Nose syndrome inflicts lasting injuries to the wings of Little Brown Myotis (*Myotis lucifugus*). *Acta Chiropterologica*, 11(2), 457–464.

Turner, G. G., Meteyer, C. U., Barton, H., Gumbs, J. F., Reeder, D. M., Overton, B., & Zukal, J. (2014). Nonlethal screening of bat-wing skin with the use of ultraviolet fluorescence to detect lesions indicative of white-nose syndrome. *Journal of Wildlife Diseases*, 50(3), 566-573.

Underwood, W., Anthony, R., Gwaltney-Brant, S., Poison, A. S. P. C. A., & Meyer, R. (2013). *AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition*. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association.

Wong, B., Kiehn, T. E., Edwards, F., Bernard, E. M., Marcove, R. C., De Harven, E., & Armstrong, D. (1982). Bone infection caused by *Debaryomyces hansenii* in a normal host: a case report. *Journal of clinical microbiology*, 16(3), 545-548.

Young, J.M., Weyrich, L.S., Cooper, A., 2014. Forensic soil DNA analysis using high-throughput sequencing: A comparison of four molecular markers. *Forensic Sci. Int. Genet.* 13, 176–184.

Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(6), 553-596.

Capítulo Dos:

Identificación de Debaryomicosis (*Debaryomyces sp*) y síndrome de nariz blanca (*Pseudogeomys destructans*) en murciélagos de cuatro localidades de Oaxaca.

Introducción

Los agentes patógenos han coexistido y evolucionado por millones de años con los organismos que infectan, esta coexistencia ha propiciado la aparición de mecanismos de defensa por parte de las especies infectadas, así como una gran cantidad de métodos de infección para los agentes patógenos. Se define a un patógeno como aquel que causa una interacción negativa con un huésped, donde el patógeno es beneficiado y el huésped es perjudicado, son considerados agentes patógenos las bacterias, hongos, virus y priones (Krebs, 2008).

El reino Fungi contiene alrededor de 167 órdenes, 40 de estos (24%) han sido ampliamente citados en la literatura médica, debido a que dentro de ellos se han identificado 625 especies de hongos causando enfermedad en vertebrados (Seyedmousavi, 2018). Tres grupos de vertebrados se encuentran seriamente amenazados por enfermedades micóticas; 700 especies de anfibios en todo el mundo han sufrido serias declinaciones en su población a causa de la infección por el hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (Gervasi et al, 2017). Otro ejemplo es el síndrome de enfermedad fúngica de la serpiente, identificada en el norte de Estados Unidos en el año 2006, ocasionada por el hongo patógeno *Ophidiomyces ophiodiicola* causante de un decline de poblaciones de viperidos (Last et al, 2016).

La translocación y aparición de enfermedades emergentes y reemergentes está considerada dentro de las 11 amenazas a la biodiversidad (Salafsky, 2008). El impacto puede llegar a ser tan grave que algunas poblaciones bajo brotes de enfermedades pueden llegar a extinciones locales, tal es el caso del síndrome de nariz blanca presente en murciélagos de Estados Unidos de América y Canadá, que ha llegado a tener cifras cercanas a los 5 millones de murciélagos muertos por esta enfermedad identificada en el año 2006 (Meteyer et al., 2012).

De acuerdo con el mapa de ocurrencias por condado en los Estados Unidos de América y Canadá para el síndrome de nariz blanca en este año 2018, el reporte más cercano a nuestro país fue en la localidad de San Antonio Texas, por lo que se han tomado medidas precautorias en el México y se ha iniciado la vigilancia epidemiológica a cargo de investigadores del Instituto de Biología de la UNAM (Rodríguez-Moreno, 2018). El objetivo de este capítulo fue identificar los agentes causales de lesiones en alas reportadas en

diferentes puntos del estado de Oaxaca, aplicando técnicas clínico-patológicas y moleculares.

Metodología

Sitios de estudio

Todos los sitios de estudio fueron elegidos por haber manifestado la presencia de murciélagos capturados con lesiones en las alas.

San Pedro Yolox, Ixtlán, Oaxaca

Se encuentra entre los paralelos 17°34' y 17°42' de latitud norte, los meridianos 96°21' y 96°38' de longitud oeste, la altitud varía entre 300 y 3100 m. El rango de temperatura anual varía entre 10 a 24°C, el rango de precipitación es de 800- 3500 mm, el clima predominante de la región es templado húmedo con abundantes lluvias en verano, aunque también están presentes el semicálido húmedo con lluvias todo el año, templado subhúmedo con lluvias en verano, semicálido subhúmedo con lluvias en verano y cálido húmedo con lluvias todo el año (INEGI, 2009).

San Sebastián de las Grutas, Villa Sola de Vega, Oaxaca.

Se encuentra entre los paralelos 16°16' y 16° 52' de latitud norte, los meridianos 96°51' y 97°17' de longitud oeste, la altitud varía entre 700 y 3000 m. El rango de temperatura anual es de 12 a 26°C, el rango de precipitación oscila entre 600 y 2500 mm, el clima predominante de la región es templado subhúmedo con lluvias en verano, otros climas presentes en la región son el semicálido subhúmedo con lluvias en verano, templado húmedo con abundantes lluvias en verano y cálido subhúmedo con lluvias en verano (INEGI, 2009).

Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.

Se encuentra entre los paralelos 16°57' y 17°04' de latitud norte, los meridianos 96°42' y 96°49' de longitud oeste, la altitud varía entre 1500 y 2000 m, el rango de temperatura varía entre 18 a 20° C, con un rango de precipitación de 700 a 1000 mm, presenta un clima semiseco-semicálido (INEGI, 2009).

San Pedro Molinos, Oaxaca.

Se encuentra entre los paralelos 17°04' y 17°08' latitud norte, los meridianos 97°31' y 97°36' de longitud oeste, la altitud varía entre 1900- 2800m, el rango de temperatura es de 14 a 20°C, con un rango de precipitación de 1000- 1200 mm, el clima predominante es templado subhúmedo con lluvias en verano, otro clima presente en la región es el semicálido subhúmedo con lluvias en verano (INGEI, 209).

Captura de murciélagos.

La captura se realizó mediante el uso de redes de niebla que fueron colocadas cercanas a cuerpos de agua, en el caso de los refugios fueron colocadas a la salida los mismos. Las redes permanecieron abiertas de 6 de la tarde a 2 de la mañana, en los sitios donde el éxito de captura fue bajo los muestreos fueron repetidos por varios días

Índice de daño a las alas.

A cada murciélago identificado con lesiones se le asignó un número del 0-5 para indicar la gravedad de las lesiones en las alas de acuerdo con la escala propuesta por Richard y Kunz (2009). Cero fue considerado para murciélagos sin lesiones macroscópicas aparentes, 1 cuando había presencia de puntos, manchas o membranas despigmentadas, 2 para descamación y despigmentación de antebrazo, 3 para tejido con necrosis, 4 para perforación de alas y 5 para pérdida de la membrana. Sólo los ejemplares que presentaron un índice de daño de alas de 2 o mayor fueron incluidos en el estudio.

Lámpara de Wood.

Se utilizó una lámpara de Wood led 665 nm (Maaxtool[®]) para examinar a cada animal fue; Para obtener los mejores resultados. Para obtener mejores resultados, la lámpara se mantuvo a 20 cm de la piel. Las alas fueron expuestas durante 3 minutos debido a que algunas cepas son lentas para mostrar el evidente color verde manzana / amarillo-verde (Miller et al., 2013).

Eutanasia.

Los ejemplares elegidos para incluirse en el estudio fueron sacrificados por el método de dislocación cervical, siguiendo el procedimiento indicado por la Asociación Americana de Médicos Veterinarios (Underwood et al, 2013). Una vez registrados los datos se tomaron dos muestras de las membranas afectadas (uropatagio, plagiopatagio, dactilopatagio, propatagio), una muestra fue incluida en formol al 10% para su posterior estudio histopatológico (Meteyer et al., 2009), la segunda muestra fue almacenada en congelación a -20°C para la aplicación de técnicas moleculares de diagnóstico.

Histopatología.

Las muestras fijadas en formol fueron incluidas en parafina, cortadas en secciones de tejido de 5 micras y teñidas con la técnica de hematoxilina y eosina, las lesiones histopatológicas fueron descritas y relacionadas con las lesiones macroscópicas de las alas.

*Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final *Debaryomyces sp.**

Se diseñó una pareja de cebadores específicos utilizando el programa bioinformático Oligo 7 v.7.56 (Rychlik W., 2007) a partir de secuencias de la región ITS de *Debaryomyces* previamente reportadas en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias KM091320.1, NR_152493.1, JN942650.1, KY103276.1, HG421423.1, LC317568.1 y KX859780.1 fueron alineadas con el programa bioinformático MegAlign (Lasergene) para localizar regiones altamente conservadas dentro del genoma y definir los siguientes cebadores que amplifican un fragmento de 384 pares de base (pb) de la región ITS de *Debaryomyces sp.*

DEBAROMYCES SP.

DEB-18S-FW 5'-CAAGAACTTTTGCTTTGGTCT-3'

DEB-18S-RW 5'-GCACTATCCAGTACCACTCAT-3'

Para realizar las reacciones en cadena de la polimerasa se utilizó el kit Accuzyme DNA polimerase (Bioline) siguiendo las instrucciones del fabricante, las reacciones incluían 1 µl de ADN genómico extraído (50 ng/µl), 1 µl (concentración 10µMol) del cebador DEB-18S-FW, 1 µl (concentración 10 µMol) del cebador DEB-18-RW, 5µl de la mezcla de reacción Accuzyme (1U de ADN polimerasa, MgCl₂, desoxinucleótidos), y agua libre de nucleasas para completar una reacción de 10 µl. Se utilizó un termociclador T100 (BioRad) el cual fue programado conforme las siguientes condiciones de amplificación: Desnaturalización inicial 5 minutos a 95°C seguía de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 53°C por 1 min, 72°C por un minuto y finalmente una extensión de 72°C por 10 minutos. Los productos obtenidos fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al1% teñidos de bromuro de etidio (geminis scientific), incluyendo un marcador de peso molecular de 100 pb Hyperladder (Bioline) y visualizados en un transiluminador (Benchtop UVP) para determinar la existencia de amplificación (presencia de *Debaryomyces sp.*).

Secuenciación Sanger.

Se realizó la amplificación mediante PCR en un volumen de 100 µl de uno de los casos positivos, el producto de PCR fue verificado en un gel de agarosa al 1%, y purificado en gel utilizando el kit Wizzrd genomic DNA purification kit (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante, el producto purificado fue cuantificado en un nanospectrofotómetro Nabodrop (Thermo) y enviado a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México de acuerdo con las condiciones establecidas por el laboratorio.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas empleando el programa bioinformático Chromas Lite v. 2.6.5 (www.technelysium.com.au), y convertidas a Formato FASTA para

confirmar su identidad con ayuda de la herramienta bioinformática BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Diseño de árbol filogenético para el género *Debaryomyces* sp.

Se generó un árbol filogenético a partir de la secuencia obtenida previamente mediante secuenciación Sanger, a partir de la amplificación de la región ITS de *Debaryomyces* sp. La secuencia fue alineada con secuencias ITS previamente reportadas para el género *Debaryomyces*, así como otros géneros de micosis reportadas como patógenos de murciélagos. Fueron utilizadas las secuencias de las siguientes especies: *Debaryomyces hansenii* (KY103235.1), *Debaryomyces fabryi* (NR_138186.1), *Debaryomyces maramus* (KY103271.1), *Debaryomyces vindobonensis* (NR_138218.1), *Debaryomyces coudertii* (NR_138161.1), *Debaryomyces nepalensis* (NR_130651.1), *Debaryomyces psychrosporus* (HM769277.1), *Debaryomyces renaii* (NR_111609.1), *Debaryomyces castellii* (NR_111306.1), *Debaryomyces udenii* (NR_077068.1), *Debaryomyces prosopidis* (NR_077067.1), *Debaryomyces vietnamensis* (KY103297.1), *Debaryomyces singareniensis* (KY103290.1), *Aspergillus* sp. (KT221871.1), *Trichophyton* sp. (MH021152.1), *Candida* sp. (KX944465.1), *Malassezia vespertilionis* (NR_157486.1), *Pseudogymnoascus destructans* (NR_111838.1), fueron alineadas mediante el método Neighbor-joining, con 1000 réplicas, empleando el programa bioinformático Mega v5.05 (Tamura et al, 2011)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detección de Pseudogymnoascus destructans.

Para el diagnóstico por PCR de Síndrome de Nariz Blanca (*P. destructans*) se utilizaron los cebadores reportados previamente por Lorch y cols.(2010) que amplifican un fragmento de 624 pb de la región ITS2 de *P. destructans*, las reacciones de amplificación se realizaron de forma similar a lo establecido para *Debaryomyces* sp.con la única modificación del empleo de los cebadores nu-SSI(1506)-184-59-Gd FW y nu-5.8S-144-39-Gd RW, las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial 2 minutos a 98°C, seguido de 40 ciclos de 98°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 1 minutos y una extensión final de 72° por 10 minutos. De igual forma, los productos obtenidos fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al1% teñidos de bromuro de etidio (Gemini scientific), incluyendo un marcador de peso molecular de 100 pb Hyperladder (Bioline) y visualizados en un transiluminador (Benchtop UVP) para determinar la existencia de amplificación (presencia de *P. destructans*).

Resultados

Captura de murciélagos con lesiones en alas

El esfuerzo de muestreo abarcó un total de 144 horas red, donde fueron capturados un total de 36 murciélagos con presencia de lesiones mayores a puntuación 2 en las alas, de acuerdo con el índice de daño alar; de estos murciélagos 22 (61.1%) fueron machos y 14 (38.89%) hembras. El sitio con mayor número de capturas fue San Pedro YoloX representado por 15 murciélagos de la especie *Myotis velifer* (41.66%), seguido de San Pedro Molinos con ocho capturas (cinco ejemplares de *Myotis velifer* y dos ejemplares de *Dermanura azteca*), en San Sebastián de las Grutas se obtuvieron siete capturas (dos *Tadarida brasiliensis*, dos *Dermanura azteca*, dos *Pteronotus parneli* y un *Desmodus rotundus*) y finalmente en valles centrales fueron capturados seis murciélagos (tres *Sturnira ludovicii* y tres *Artibeus jamaicensis*).

Índice de Daño en alas (IDA) y lesiones dermatológicas.

El índice de daño alar para cada ejemplar, así como los resultados de lámpara de Wood son expresados en la Tabla 2.

Para el sitio San Pedro YoloX el 46.67% (siete murciélagos) presentaron un IDA de 3, un 40% (seis murciélagos) presentaron un IDA de 2 y solo un 13.33% (dos murciélagos) presentaron un IDA de 4. Para el sitio San Sebastián de las Grutas el 71.43 % (siete murciélagos) presentaron un IDA de 2 y el 28.57% (dos murciélagos) presentaron un IDA de 3. Para el sitio San Pedro Molinos el 50% de los murciélagos (cuatro) presentó un IDA de 2, el 25% (dos murciélagos), el 12.5% (un murciélago) presentó un IDA de 4 y 12.5% (un murciélago) presentó un IDA de 5. Finalmente, en Santa Cruz Xoxocotlán el 100 % (seis murciélagos) presentaron un IDA de 3.

Tabla 2: Índice de daño alar en murciélagos.

Numero	Especie	Sexo	Edad	Índice de daño alar	Lámpara de Wood
San Pedro YoloX					
1	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	3	(-)
2	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	3	(-)
3	<i>Myotis velifer</i>	Macho	Adulto	3	(-)
4	<i>Myotis velifer</i>	Macho	Adulto	2	(-)
5	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	2	(-)

6	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	2	(-)
7	<i>Myotis velifer</i>	Macho	Adulto	4	(-)
8	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	3	(-)
9	<i>Myotis velifer</i>	Macho	Adulto	3	(-)
10	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	4	(-)
11	<i>Myotis velifer</i>	Macho	Adulto	3	(-)
12	<i>Myotis velifer</i>	Macho	Adulto	3	(-)
13	<i>Myotis velifer</i>	Macho	Adulto	2	(-)
14	<i>Myotis velifer</i>	Macho	Adulto	2	(-)
15	<i>Myotis velifer</i>	Macho	Adulto	2	(-)
San Sebastián de las Grutas					
16	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Macho	Adulto	2	(-)
17	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Macho	Adulto	2	(-)
18	<i>Dermanura azteca</i>	Macho	Adulto	2	(-)
19	<i>Dermanura azteca</i>	Hembra	Adulto	3	(-)
20	<i>Pteronotus parnelli</i>	Macho	Adulto	2	(-)
21	<i>Pteronotus parnelli</i>	Macho	Adulto	2	(-)
22	<i>Desmodus rotundus</i>	Macho	Juvenil	3	(-)
San Pedro Molinos					
23	<i>Myotis velifer</i>	Macho	Adulto	2	(-)
24	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	4	(-)
25	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	5	(-)
26	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	2	(-)
27	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	2	(-)
28	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	2	(-)
29	<i>Dermanura azteca</i>	Hembra	Adulto	3	(-)
30	<i>Dermanura azteca</i>	Macho	Adulto	3	(-)
Santa Cruz Xoxocotlán					
31	<i>Sturnira ludovici</i>	Macho	Adulto	3	(-)
32	<i>Sturnira ludovici</i>	Macho	Adulto	3	(-)

33	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Macho	Adulto	3	(-)
34	<i>Sturnira ludovici</i>	Hembra	Adulto	3	(-)
35	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Macho	Adulto	3	(-)
36	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Macho	Adulto	3	(-)

Las lesiones presentes en las alas de los murciélagos fueron en su mayoría de tipo ulcerativa reconociéndose 2 patrones, el primero de múltiples focos de lesión de forma redonda y separada (Figura 3), mientras que el segundo patrón presentó lesiones irregulares continuas (Figura 4). Algunos ejemplares también presentaron diferentes tipos de lesiones en otras partes del cuerpo, como la presencia de úlceras en el rostro incluyendo labios y hoja nasal, (Figura 5), amplia necrosis en las orejas (Figura 6). así como lesiones alopécicas en espalda o abdomen de algunos ejemplares (Figura 7).



Figura 3: *Sturnira Ludivoci* con presencia de lesiones ulcerativas redondas focales.

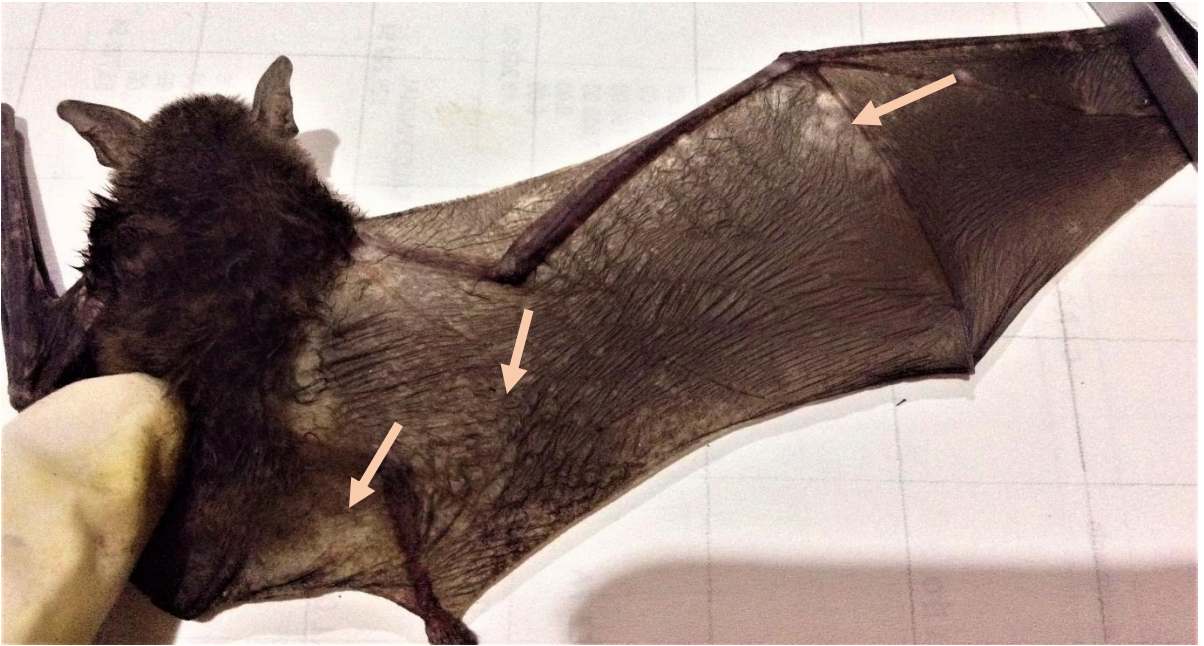


Figura 4: *Myotis velifer* con presencia de lesiones ulcerativas irregulares (Flechas rosas).

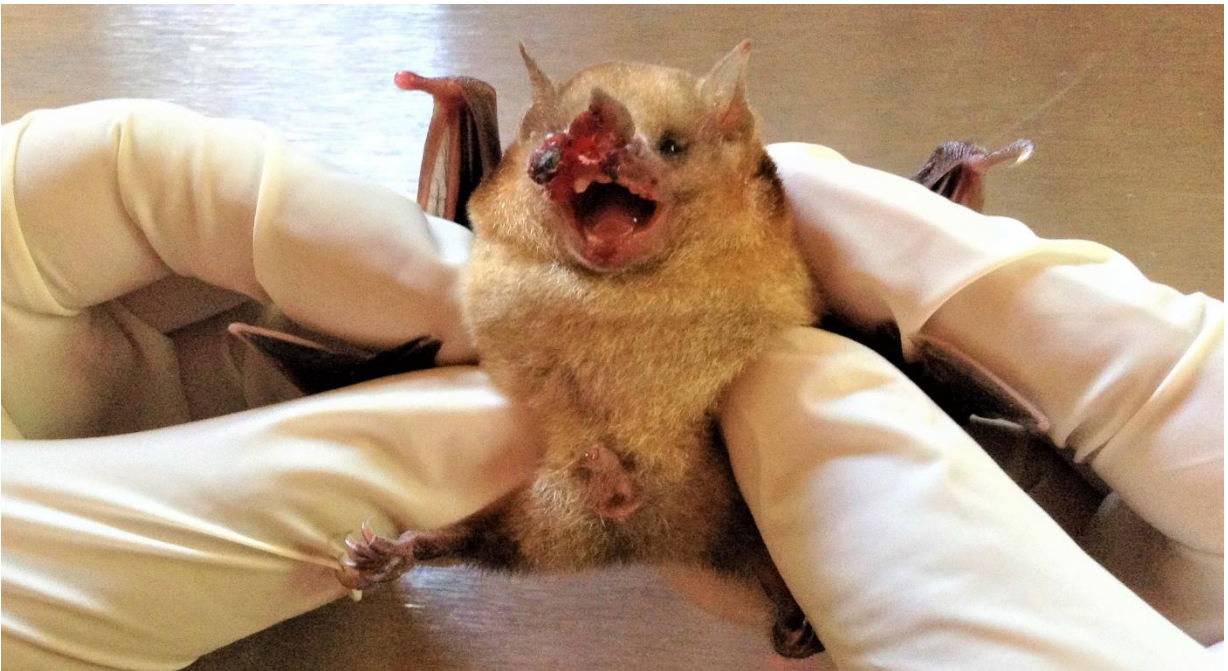


Figura 5: *Sturnira ludovici* con presencia de lesión ulcerativa involucrando los tejidos de labio y hoja nasal.



Figura 6: *Myotis velifer* con necrosis en las orejas (Flecha roja).



Figura 7: *Myotis velifer* con alopecia en hombro derecho y necrosis en orejas.

Histopatología

34 murciélagos fueron examinados con la técnica histopatológica de he, de los cuales 29 presentaron cambios anatomopatológicos, en cinco murciélagos (Tabla 1: ID 4, 10, 11, 23, 32). Se observaron lesiones severas como dermatitis perianexal piogranulomatosa, con la presencia de conidios intralesionales (figura 8), hiperqueratosis ortoqueratósica con presencia de hifas en forma de racimo (Figura 9), En la mayoría de los ejemplares (26) se observa por debajo de la dermis y alrededor de los anexos cutáneos infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos y células plasmáticas (Figura 10), mientras que solo un murciélago presentó pérdida de la continuidad (ulcera) en zonas del estrato corneo, reemplazadas por restos celulares, neutrófilos degenerados, linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, con folículos pilosos se distendidos por láminas concéntricas de queratina anucleada.

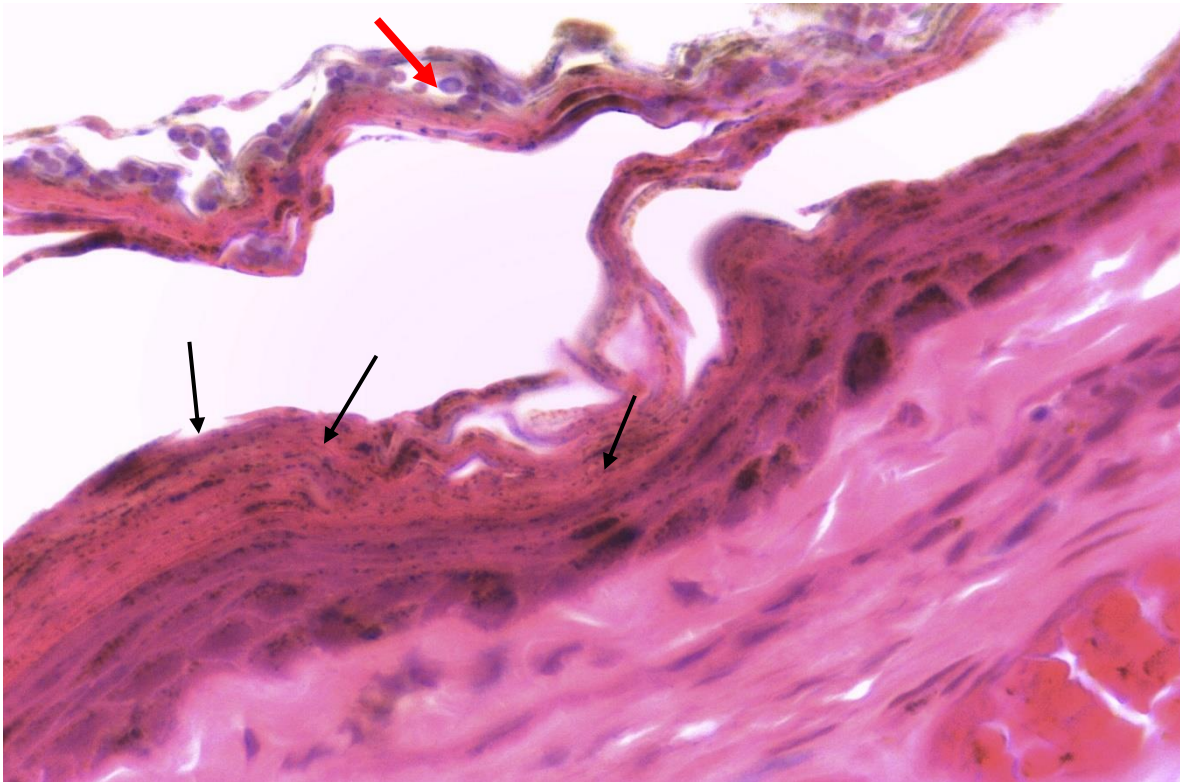


Figura 8: Se observa la presencia de conidios intralesionales (flecha roja) y abundante infiltrado inflamatorio (Flecha negra).

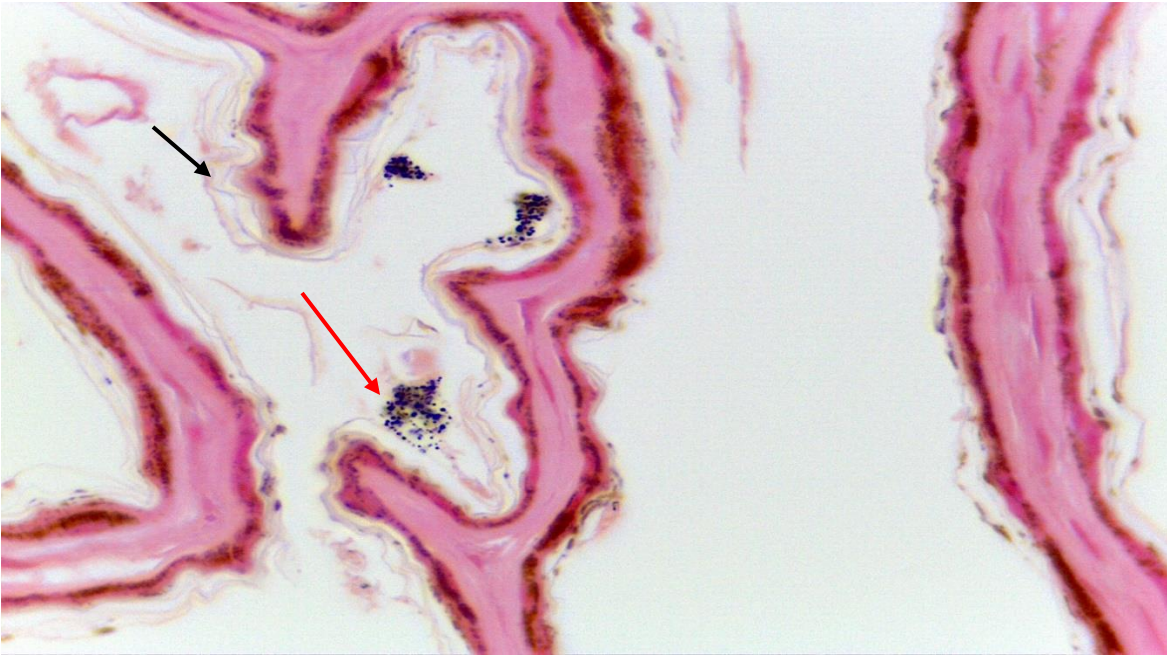


Figura 9: Presencia de hifas en forma de racimo (Flecha roja), láminas paralelas de queratina anucleada (Flecha negra).

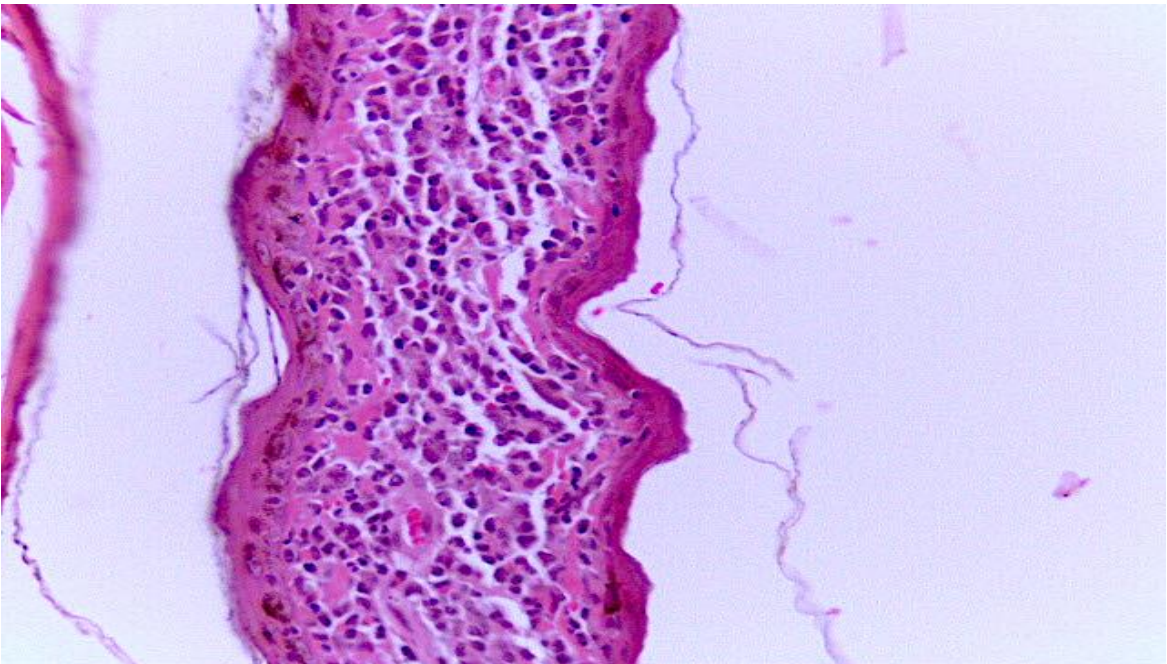


Figura 10: Presencia de infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos, células plasmáticas entremezcladas con restos celulares.

PCR de punto final para detección de *Debaryomyces sp.*

La prueba de PCR fue realizada a los 36 murciélagos capturados, detectándose un total de 15 ejemplares (41.6 %) positivos a la infección por *Debaryomyces sp* (Figura 11), de ellos el 53.3 % (ocho individuos) fueron machos y el 46.67 % (siete individuos) fueron hembras, todos los ejemplares infectados eran adultos (Tabla 2).

Resultados Secuenciación Sanger

Se obtuvieron 2 secuencias, las cuales fueron analizadas con la herramienta bioinformática BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias fueron convertidas a formato FASTA y posteriormente verificadas empleando la herramienta bioinformática BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). El análisis reveló una mayor similitud (100%) con la secuencia KM091320.1, correspondiente a *Debaryomyces sp.*

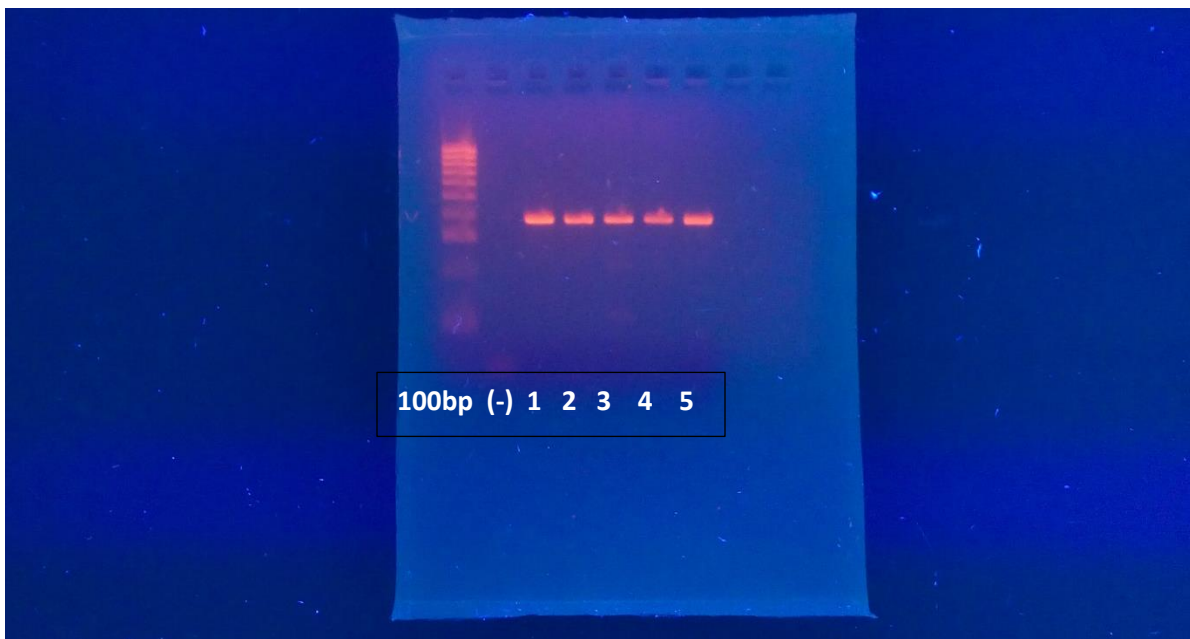


Figura 11: Visualización de productos de PCR para la detección de *Debaryomyces sp.* En la imagen se observa el control negativo, y 5 reacciones positivas utilizando ADN genómico extraído de las alas lesionadas de los murciélagos previamente descritos, el fragmento amplificado corresponde al tamaño esperado de 380 pares de bases (pb).

Análisis filogenético de la secuencia obtenida mediante secuenciación Sanger

El análisis filogenético reveló que la secuencia obtenida a partir de la amplificación con los cebadores DEB-18S-RW y DEB-18S-RW se agrupa en un cluster con todas las secuencias ITS de *Debaryomyces* reportadas en el NCBI, separándose claramente del resto de géneros de hongos patógenos que afectan a murciélagos. Además, la secuencia obtenida comparte un 100% de identidad con *D. Castelli*, *D. prosopidis*, *D. renaii*, *D. psychrosporus*, *D. vindobonensis*, *D. maramus*, *D. fabryi*, *D. hansenii* y *D. courdetii* (Figura 12)

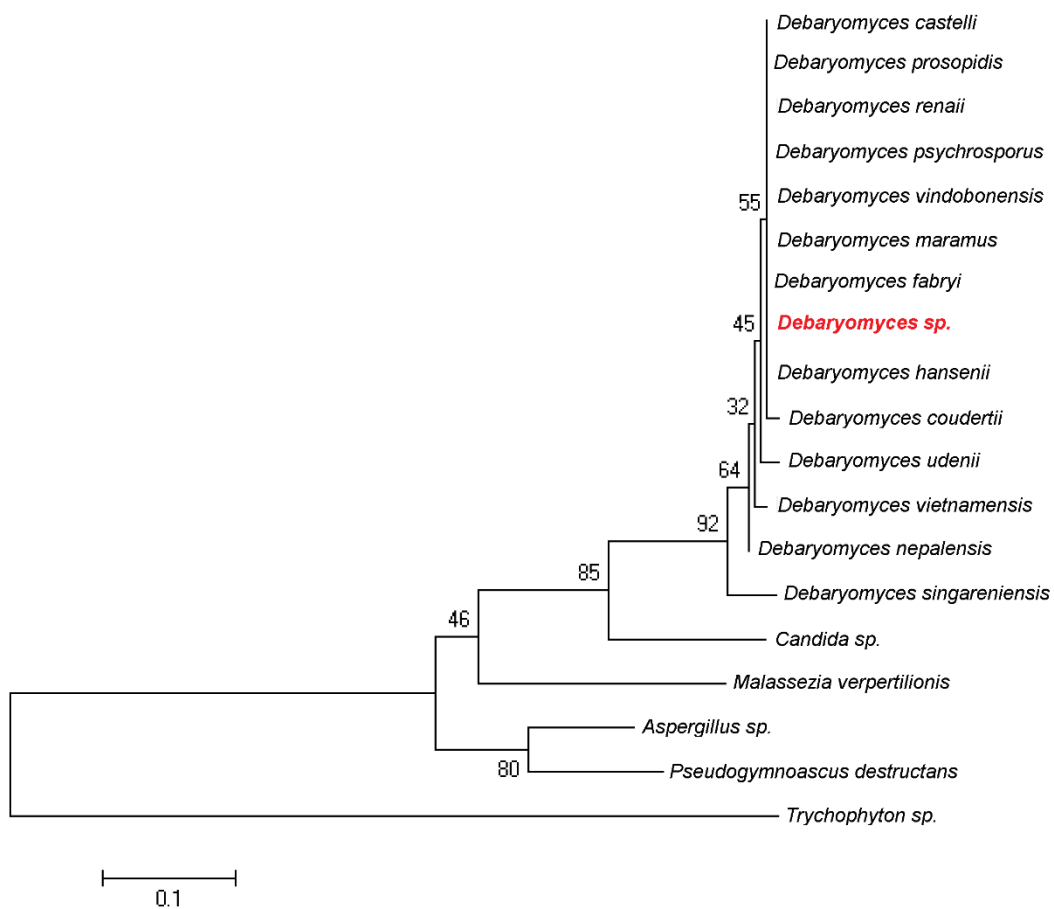


Figura 12: Árbol filogenético generado mediante el método Neighbor-Joining (Bootstrap = 1000 réplicas).

PCR de punto final para la detección de *Pseudogiuminascus destructans*.

La prueba de PCR fue realizada a los 36 murciélagos capturados, el 55.56% (20 murciélagos) resultaron positivos a la infección por infección por *P. destructans* (Figura 13). El 50% de los casos positivos (Diez murciélagos) fueron machos y el otro 50% fueron hembras. Todos los murciélagos infectados eran adultos (Tabla 3).

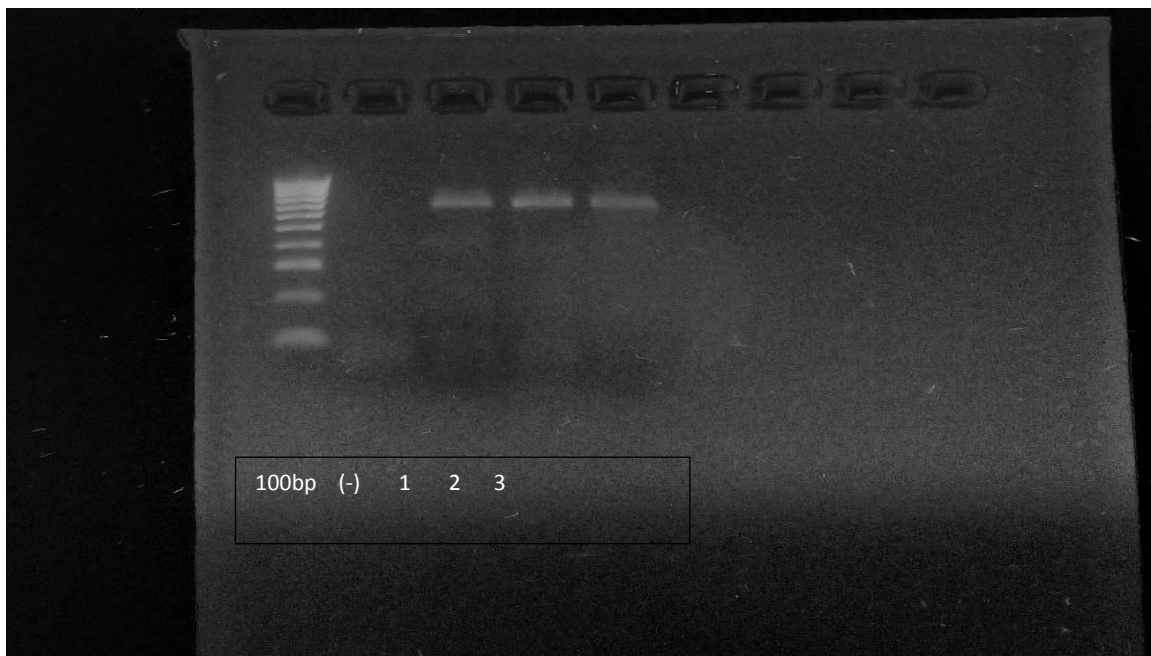


Figura 13: Visualización de productos de PCR para la detección de *P. destructans*. En la imagen se observa el control negativo (-), y 3 reacciones positivas utilizando el ADN genómico extraído de las alas lesionadas de los murciélagos previamente mencionados, el tamaño del fragmento corresponde a un producto esperado de 624pb.

Tabla 3. Lista de murciélagos incluidos en el estudio y resultado comparativo de PCR.

Numero	Especie	Sexo	Edad	<i>Debaryomyces</i>	
				<i>sp.</i>	<i>P. destructans</i>
Sn Pedro Yolox					
1	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	(+)	(-)
2	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	(+)	(-)
3	<i>Myotis velifer</i>	Macho	Adulto	(+)	(+)
4	<i>Myotis velifer</i>	Macho	Adulto	(+)	(+)
5	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	(+)	(+)
6	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	(+)	(+)
7	<i>Myotis velifer</i>	Macho	Adulto	(+)	(-)
8	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	(+)	(+)

9	<i>Myotis velifer</i>	Macho	Adulto	(+)	(+)
10	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	(+)	(+)
11	<i>Myotis velifer</i>	Macho	Adulto	(-)	(+)
12	<i>Myotis velifer</i>	Macho	Adulto	(+)	(+)
13	<i>Myotis velifer</i>	Macho	Adulto	(+)	(+)
14	<i>Myotis velifer</i>	Macho	Adulto	(-)	(+)
15	<i>Myotis velifer</i>	Macho	Adulto	(-)	(-)
San Sebastian de las Grutas					
16	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Macho	Adulto	(-)	(-)
17	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Macho	Adulto	(-)	(-)
18	<i>Dermanura azteca</i>	Macho	Adulto	(-)	(-)
19	<i>Dermanura azteca</i>	Hembra	Adulto	(-)	(-)
20	<i>Pteronotus parnelli</i>	Macho	Adulto	(-)	(-)
21	<i>Pteronotus parnelli</i>	Macho	Adulto	(-)	(-)
22	<i>Desmodus rotundus</i>	Macho	Juvenil	(-)	(-)
San Pedro Molinos					
23	<i>Myotis velifer</i>	Macho	Adulto	(+)	(+)
24	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	(+)	(+)
25	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	(-)	(+)
26	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	(-)	(+)
27	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	(-)	(+)
28	<i>Myotis velifer</i>	Hembra	Adulto	(-)	(+)
29	<i>Dermanura azteca</i>	Hembra	Adulto	(-)	(-)
30	<i>Dermanura azteca</i>	Macho	Adulto	(-)	(-)
Santa Cruz Xoxocotlán					
31	<i>Sturnira ludovici</i>	Macho	Adulto	(+)	(+)
32	<i>Sturnira ludovici</i>	Macho	Adulto	(-)	(+)
33	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Macho	Adulto	(-)	(-)
34	<i>Sturnira ludovici</i>	Hembra	Adulto	(-)	(+)
35	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Macho	Adulto	(-)	(-)
36	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Macho	Adulto	(-)	(-)

Discusión

El índice de daño alar fue un indicador exitoso en cuanto a la detección de lesiones en murciélagos, por lo que se recomienda ampliamente continuar utilizándolo en los estudios posteriores a este. En cambio, la prueba de lámpara de Wood no resultó de ayuda en la identificación de las infecciones micóticas ocasionadas por *Debaryomyces* sp. y *P. destructans*, contrario a la utilidad que han demostrado para su diagnóstico en otros trabajos como los de Turner y cols (2014) y los de Bandoucchoba y cols (2018), quienes la recomiendan por ser una prueba económica y eficiente en la identificación de *P. destructans*.

Los resultados mostrados por las pruebas anteriores (IDA, PCR, histopatología) son concluyentes, afirmando que en el estado de Oaxaca se encuentran presentes dos enfermedades micóticas que afectan las alas de los murciélagos. La primera de ellas es la Debaryomicosis (infección por *Debaryomyces* sp.), de la cual se reportan 15 casos (41.6% de los murciélagos incluidos en el trabajo) confirmados por medio de PCR e histopatología. El género *Debaryomyces* ha sido estudiado por causar enfermedades en diferentes vertebrados como: humanos, ratones, palomas y recientemente murciélagos (Wong et al, 1982; Mattsson et al, 1999; Lorch et al, 2015).

Actualmente se han identificado cuatro especies patógenas del género *Debaryomyces*: *D. hansenii*, causante de infecciones sistémicas y localizadas como osteomielitis, *D. kloeckeri*, causante de infecciones de piel y encontrado ocasionalmente en muestras de esputo, *D. emphysematosis*, encontrado en infecciones respiratorias y *Debaryomyces* sp. causando lesiones similares al SDNB en alas de murciélagos. (Wong et al, 1982; Desnos- Oliver et al, 2008 y Lorch et al, 2015).

Las lesiones presentes en los estudios histopatológicos de los murciélagos, positivos exclusivamente a *Debaryomyces* sp., fueron: hiperqueratosis ortoqueratósica con y sin presencia de hifas, y se presentó en *Myotis velifer* uno y dos de San Pedro Yolox (tabla 3), la misma lesión presentada por el ejemplar descrito en el capítulo uno, otra lesión presente fue la dermatitis linfoplasmocítica (*Myotis velifer* 7 de San Pedro Yolox, tabla 3), en el primer grupo de murciélagos afectados no se observó infiltrado inflamatorio en la zona de infección, lo que indica que los murciélagos no habían montado una respuesta inmune contra este patógeno, para el segundo grupo se observó una respuesta inflamatoria por escasos linfocitos, en este caso la respuesta inmune estaba presente aunque de una manera moderada.

Lo anterior nos indica que *Debaryomyces* sp. Tiene la capacidad de invadir el tejido cutáneo de los murciélagos sin desarrollar una respuesta inmune efectiva contra el mismo, por lo que la infección podría perpetuarse llevando a la muerte al espécimen infectado. El hallazgo de los estudios histopatológicos nos permite diferenciar la infección por *Debaryomyces* sp

debido a la morfología de sus hifas (ovaladas 1-2 μm) en comparación con *Pseudogymnoascus destructans* que presenta conidios curvos 2.5-7.5 μm .

Los murciélagos diagnosticados con el síndrome de nariz blanca fueron capturados utilizando redes de niebla en los periodos febrero- marzo de 2017 y febrero- abril de 2018, ninguno fue capturado en el periodo de hibernación. Histológicamente solo ocho presentaron las lesiones características del SNB descritas por Meteyer y cols (2009), sin embargo el resto de ejemplares positivos a SDNB diagnosticados por medio de PCR (20 individuos) presentaban abundante respuesta inflamatoria, presencia de macrófagos y linfocitos (Figura 10), lo que concuerda con el síndrome de reconstitución inflamatoria inmune propuesto por Meteyer et al,(2012) que es el mecanismo inmune por el cual se desarrollan las lesiones críticas en las alas de los murciélagos infectados.

Si bien, la prueba de oro para la determinación de SDNB es el estudio histopatológico, este tiene una alta especificidad con el inconveniente que requiere una colonización grande de tejidos para poder detectar la infección, como respuesta a esto la prueba de PCR tiene una sensibilidad de 96% y una especificidad de 100% para detectar la infección según los creadores de la técnica (Lorhc et al, 2010), ya sea en estados tempranos o tardíos (post-hibernación).

Las pruebas aplicadas a los murciélagos capturados (revisión clínica, histopatología y PCR), nos indican la presencia de los primeros 20 casos confirmados para SDNB en el sureste mexicano. Esta localización difiere con la última actualización del mapa de ocurrencias para el síndrome de nariz blanca (White-nose Syndrome occurrence map - by year, 2018) con fecha del 02 de octubre de 2018, nos indica que la ubicación más al Sur conocida para la especie *P. destructans* era San Antonio Texas.

12 murciélagos fueron positivos a la prueba de diagnóstico de PCR a ambas infecciones, histológicamente las lesiones presentes en estos murciélagos fueron las más severas presentando abundante infiltrado inflamatorio compuesto por neutrófilos degenerados, linfocitos y células plasmáticas mezcladas con restos celulares. Ocasionalmente en algunos de estos ejemplares se observaba la presencia de hifas compatibles con la morfología de *P. destructans* o *Debaryomyces sp.* Esta es la primera vez que se detectan evidencias de coinfección para murciélagos infectados con *P. destructans*.

El análisis filogenético de la secuencia generada nos revela que la secuencia es 100% idéntica con otras 9 especies de *Debaryomyces*, contrario al 98% de identidad que se obtuvo con *D.maramus* por medio de la herramienta Blast del IUCN, este análisis más detallado nos permite concluir que el patógeno identificado en murciélagos pertenece al género *Debaryomyces*, sin embargo no podemos definir claramente a cuál de estas 9 especies pertenece. Así mismo como podemos observar en la figura 13, el patógeno está claramente alejado de otros patógenos como *Candida sp.*, *Aspergillus sp.* O *P. destructans*.

Conclusiones

La presencia de *P.destructans* en el estado de Oaxaca es un hallazgo de vital importancia, debido al impacto que este patógeno puede causar en las poblaciones de murciélagos en conjunto con la alta diversidad de especies en el Estado. Se sugiere continuar una serie de trabajos interdisciplinarios (medicina, ecología, epidemiología, genética) que busquen una manera efectiva para combatir este patógeno ahora que ha sido identificado.

La variación en la presentación de las infecciones reportadas en este documento, nos llevan a la posible teoría que el agente *P. destructans* detectado en Oaxaca sea una cepa diferente a la reportada en Estados Unidos, lo que abre un nuevo campo a la investigación de esta enfermedad en la región neo-tropical, con la identificación de nuevas especies afectadas.

Oaxaca cuenta con una alta diversidad de especies de murciélagos (96 especies), en el presente trabajo fueron abordadas solo siete especies, por lo que aún se desconoce el estado de salud de 89 especies restantes en el Estado.

La prueba de PCR nos permite identificar la infección por *Debaryomyces* sp. Para una identificación a nivel de especie, sería conveniente cultivar el patógeno, y posteriormente aplicar un estudio genómico más detallado, como la amplificación y secuenciación del fragmento ITS completo, así como algún otro marcador molecular o pensando en un proyecto más ambicioso, el genotipado del patógeno.

Debaryomyces sp. No ha sido evaluado a nivel de comportamiento epidemiológico, es necesaria la evaluación de una población infectada con este patógeno para predecir el impacto que este pueda tener en las poblaciones de murciélagos neo-tropicales.

De los tres puntos donde fue identificado el Síndrome de nariz blanca y la Debaryomicosis, solo uno de ellos pertenece a una cueva, aún queda pendiente la identificación de refugios en los Valles Centrales y la Sierra Norte de Oaxaca, encontrar los refugios de murciélagos en estas zonas, nos garantizara llevar un monitoreo exitoso acerca de las especies que pueden ser vulnerables, o resistentes al patógeno, así como identificar los sitios con condiciones óptimas para el desarrollo de la infección y poder elaborar un mapa de distribución potencial, que nos permita desarrollar planes para la contención de estas enfermedades.

Así mismo, debido a las pruebas sobre la presencia del síndrome de nariz blanca, es de suma importancia que esta información sea difundida, en un foro con los especialistas en el tema de quirópteros, en primera parte para plantear una nueva metodología de trabajo en campo que disminuya la probabilidad de infección hacia otras poblaciones de quirópteros, esto por medio de un protocolo de trabajo en campo.

Referencias documentales

- Bandouchova, H., Bartonička, T., Berkova, H., Brichta, J., Kokurewicz, T., Kovacova, V. & Zukal, J. (2018). Alterations in the health of hibernating bats under pathogen pressure. *Scientific reports*, 8(1), 6067.
- Barnard, S. M. (2009). *Bats in captivity*. Logos Press.
- Briones-Salas, M. (2012). Mamíferos de Oaxaca. *Therya*, 3(3), 273-275.
- Briones-Salas, M., Cortés-Marcial, M., Lavariega, M.C., 2015. Diversidad y distribución geográfica de los mamíferos terrestres del estado de Oaxaca, México. *Rev. Mex. Biodivers.* 86, 685–710.
- Desnos-Ollivier, M., Ragon, M., Robert, V., Raoux, D., Gantier, J. C., & Dromer, F. (2008). *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). *Journal of clinical microbiology*, 46(10), 3237-3242.
- Gervasi, S. S., Stephens, P. R., Hua, J., Searle, C. L., Xie, G. Y., Urbina, J. & Relyea, R. A. (2017). Linking ecology and epidemiology to understand predictors of multi-host responses to an emerging pathogen, the amphibian chytrid fungus. *PloS one*, 12(1).
- Grzimek, B., Schlager, N., Olendorf, D., & McDade, M. C. (2004). *Grzimek's animal life encyclopedia* (Gale). MI, Gale.
- Hall, B. K. (Ed.). (2008). *Fins into limbs: evolution, development, and transformation*. University of Chicago Press.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2009). *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos*. Clave geoestadística 16059.
- Krebs, C., & Elwood, B. (2008). *The ecological world view*. Univ of California Press.
- Last, L. A., Fenton, H., Gonyor-McGuire, J., Moore, M., & Yabsley, M. J. (2016). Snake fungal disease caused by *Ophidiomyces ophidiicola* in a free-ranging mud snake (*Farancia abacura*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28(6), 709-713.
- Lorch, J. M., Gargas, A., Meteyer, C. U., Berlowski-Zier, B. M., Green, D. E., Shearn-Bochsler, V. & Blehert, D. S. (2010). Rapid polymerase chain reaction diagnosis of white-nose syndrome in bats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(2), 224-230.
- Mattsson, R., Haemig, P. D., & Olsen, B. (1999). Feral pigeons as carriers of *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus uniguttulatus* and *Debaryomyces hansenii*. *Medical Mycology*, 37(5), 367-369.

- Meteyer, C. U., Buckles, E. L., Blehert, D. S., Hicks, A. C., Green, D. E., Shearn-Bochsler, V., & Behr, M. J. (2009). Histopathologic criteria to confirm white-nose syndrome in bats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21(4), 411-414.
- Meteyer, C. U., Barber, D., & Mandl, J. N. (2012). Pathology in euthermic bats with white nose syndrome suggests a natural manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome. *Virulence*, 3(7), 583-588.
- Mickleburgh, S. P., Hutson, A. M., & Racey, P. A. (2002). A review of the global conservation status of bats. *Oryx*, 36(1), 18-34.
- Miller, W. H., Griffin, C. E., Campbell, K. L., & Muller, G. H. (2013). *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology*: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. Elsevier Health Sciences.
- Reichard, J. D., & Kunz, T. H. (2009). White-nose syndrome inflicts lasting injuries to the wings of little brown myotis (*Myotis lucifugus*). *Acta Chiropterologica*, 11(2), 457-464.
- Rodríguez Moreno Ángel. (2018). Expertos de la UNAM analizan posible presencia en México de enfermedad que afecta a murciélagos. 29/09/18, de Boletín UNAM- DGCS Sitio web: http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2018_202.html
- Swartz, S. M., Groves, M. S., Kim, H. D., & Walsh, W. R. (1996). Mechanical properties of bat wing membrane skin. *Journal of Zoology*, 239(2), 357-378.
- Underwood, W., Anthony, R., Gwaltney-Brant, S., Poison, A. S. P. C. A., & Meyer, R. (2013). *AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition*. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association.
- Ramirez-Pulido, J., Gonzalez-Ruiz, N., Gardner, A.L., Arroyo-Cabrales, J., 2014. List of recent land mammals from Mexico, 2014. Texas Tech University Natural Science Research Laboratory.
- Salafsky, N., Salzer, D., Stattersfield, A. J., HILTON-TAYLOR, C. R. A. I. G., Neugarten, R., Butchart, S. H., & Wilkie, D. (2008). A standard lexicon for biodiversity conservation: unified classifications of threats and actions. *Conservation Biology*, 22(4), 897-911.
- Seyedmousavi, S., Bosco, S. D. M., De Hoog, S., Ebel, F., Elad, D., Gomes, R. R. & Pasmans, F. (2018). Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. *Medical mycology*, 56(suppl_1), S165-S187.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731-9.
- Turner, G. G., Meteyer, C. U., Barton, H., Gumbs, J. F., Reeder, D. M., Overton, B., & Zukal, J. (2014). Nonlethal screening of bat-wing skin with the use of ultraviolet fluorescence to

detect lesions indicative of white-nose syndrome. *Journal of Wildlife Diseases*, 50(3), 566-573.

White-nose Syndrome occurrence map - by year (2018).
Data Last Updated: 9/5/2018.

Wong, B., Kiehn, T. E., Edwards, F., Bernard, E. M., Marcove, R. C., De Harven, E., & Armstrong, D. (1982). Bone infection caused by *debaryomyces hansenii* in a normal host: a case report. *Journal of clinical microbiology*, 16(3), 545-548.

Anexo 1: Contigs obtenidos por medio de la secuenciación masiva.

>contig00001 length=311 numreads=287

GTATTATGTTTtCTGGCCAGTTACGGTCCAGTATAGTTAAaCGTACATACAaCaTACGAGTTTGTATT
AAAAaGGGGGTTTGTCTGGGAAGGAGACGAGAGAATAATAAAACAGAGCAATTTCTTACTCG
CTTTCTTCTCTCGTTCTTTCCACAACATGTGTGCACACGGGTTTGGATATTGTGTAATAAAAAaT
GTGGCGCCAGAGAGTACTGTAAAAaGCGCTCCGtATGGCTGCCGCGTTTTCACTAATGATCCTTCT
GCAGGTtCACCTACAGAAACCTTGTACGACTTTtACTTccAGTCT

>contig00002 length=262 numreads=6

CAAGAGATCCGTTGTTGAAAaGTTGTATAGTGTtTATAGGCTTAtGAaGCCcATTGACTACATTCTA
CATCATaCTGTTGGGgTGTGTAAAAAGACGTAGAGCCTGGAAATTCGAGGGgAGCCCTTACGAGC
AACCTCGCATCCGCCcGTGAAGGGCGAGAGgtATCCAGACCTACAGTCGGTGCACAGGTGGAA
AGATAAAAaTGGCGGGCGTGCACATtGCTCCGAGGAGCCAGCTACAACCAAGACACCATAGTTA

>contig00003 length=258 numreads=12

gtagactcAAGAGATCCGTTGTTGAAAaGTTGTgATTTAaTtAAAaGGACCATCCGCTAGTCAACCCCAT
CGGGCcTTTCACTTCAAGAtCcGCTATATTTACATACAAATGACCTATAACGATTGATATAAAGGCG
GgAAGGGGTGAAGACCCcAACCTGAACAGTTCGACGCGTTCGAAGGAATAGCCGAGTTTTtAA
GTGGCCAGAGCCCAAGAACTAAAAaGTCTGTTACGACTCGGTAATGATCCTTCCGCA

>contig00004 length=252 numreads=8

ATCATTATtGAaTAAaTCTGACTtGTTGTGCTGGCTCTCCGGAGCATGTGCACGCTTGTACCTTTA
TCTTTCCACCTGTGAACACACTGTAGTCCCTGGATACCTCTCgCcGCAAGGCGGATGCGAAGTCTGC
TTCGGCTTACTTCGAATTTCCAGGTCTATGATTTtACAAaCCCAATGAATGTtATAGAATGTtATCA
TCAGGCCTCGTGCCTATAAaCTATACAACTtCAACAaCGGATCTCTTG

>contig00005 length=245 numreads=8

gcggaaggaTCATTAAGTGTACCAACATCCCTAATTcAaCcaAAAGGTtAGGGACTATGGTTA
AAGCCCCACCGTGAATACTGTACCTTTtAGTtGCTTTGGCGGGCCCGTcCaCctAGgTGACCGCCG
GGgTTTtAGTTAAtcccGGGCCCGTGTCCGCCAaTGGAaAaTTGAACTTCTAGAATATTATTGACTGT
CTGAGTGATTAAACAATCATTaaaactttcaacaacggatc

>contig00006 length=242 numreads=35

TGCGGAaGGATCATTATCGAGTTTACTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCT
GCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTGGGTATCAGATCGTGAAGCGGGCTCTTTAATTAG
GGCTTGTGAagTGTGTCTGTGCCTACGTTTATCACAACTCTATAAAaGTATCAGAATGTGtATCAC
GATGTAACGCATCTATATACAACTTTtCAACAaCGGATCTCTTG

>contig00007 length=237 numreads=2

TGGACAATTTTCCTTGC GACTAAGACGGGGGCGCTCGATTGCAGTGGCGGGTTGCGGGGGGGgC
CCTGCGGCGGCCggggggggAGaGACAACAGACCCTCCCCTTCCGCCGAGGCAACGAGACGTG
AAGACGGCATCGGGTGTAGGGGGGcCCCGAGGCCcTCCCCAGACCGTTCGAGCCCCGGGGAGAGG
GGCGAGCTCACGTGGGCAGCGGCCGGCACCagaggcggaccgc

>contig00008 length=234 numreads=17

aaggaTCATTGTCGGTtCTTTGCAATTGtcGGTTTTGTAAATCCCGCCCAGCGCGGCTCGAGGTCAAA
CTCGATAACCTTCGGTCCGACCACGCCGGTGGGACTTCTCCATGGGCCGCAGAGTGGGCTTtCGC
GTCCTTcGCGGCGAAAGTGGGgtGTCCCGAAATGAGGTTGTTACCAATGCCATTAGTCTCAGAA
TGTAATAGCAGGCAGCGATGCCAATGCAACCAATT

>contig00009 length=226 numreads=2

CTGTTTtCTTAAAAACAATTCAGACTTCAGCTTGCCTCAGAGTTGCAAAAAAAGGCCCGTCGCGG
GCACGTCACCTCCGCCCGGAATCGCTTCCcGAAACGGaCGGCGCGCACCACTCGACGGAAAT
GGACAACAGGTCGTGACGACCCACACGTGACATGAGGACGGGTAACCGGCCcGCGCTCTCGCG
CTCGGCCAATCACACTGGTAATGATCCTTCC

>contig00010 length=226 numreads=17

gacTCAAGAGATCCGTtGTTGAAaGTTATATTAATGaTGCGTTCTAAGACGCGATGTGTACATTCTG
CTACCAGGTGTATGTGTGTGAGACGCGGGCAAAGGGCTTTCGCCcTCCcGCCACAAAaGGT
GCACAGGTGTAGAGAgAGTGGATGAGCAGGGCGTGCACATGCCTCGGAAGGCCAGCTACAGCCC
cTTTCAGAACTCGATAATGATCCTtCCGCA

>contig00011 length=214 numreads=342

TGCGGAAGGATCATTAAATGAATCACTCTTGAAGCTGTTGCTGGCCTctaGGGGCATGTGCACGCT
TCATCAGTCCAATTCCCCcAACCACTGTGCACTTTTGTAGACTCACGTCTATATTATCACACACAC
TTTGTATGTCAATGAATGTTACATATGTGGGCCATGTGCCTATAAACCTAATACAACTTtCAACAAC
GGATCTCTTgAgT

>contig00012 length=213 numreads=84

cGcGTAGAcTCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAAAtGATTTACATTTGTTATACTGACGCTGAT
TGCAACTGCATAAAAaGGTTTATGGTGTGGTCTGGTGGCGGGCGAACCCGCCAGGAAACAACA
AGTGCGCAAAAaGACAAGGGTGATAAAAaTAATCCAGCCGAAAAGGCCTTCATATTTtAATTTGTGT
AATGATCCCTCCGCA

>contig00013 length=210 numreads=17738

GAAGATTTTTGAATTTAATCAACAAATTGACAATTAATAAAAaTAACAATTCAATATAAATATTGAA
GTTTAGTTAGTAAGTCTCTGGCCAAACTATTTCTAGTCCAGACCAAAGCAAAAAGTTCTTGTAATA

ACAAAAaACTGTGTGTAAGGTTTTTCGCCGCGCAATTAAGCGCTGGCAAAGAATACTGTAATG
ATCCTTCCGCA

>contig00014 length=208 numreads=18

TGCGGAaGgATCATTACCGAGTTAGGGtCgCCcgcGCGCCGACCTCCAACCCTTTGTCTACCTGAC
CTATATGTTGCTTCGGCAGGCCCGCcGCCCTCACCGGGTGGCCGCCGGGGgCCTTGCGCCcGG
GCCcGCGCCTGTGACGGCCCAACCACAAACTCTGTACCTAAACGTGTCTGCTGAGTTAACAAaC
AAAATAAAC

>contig00015 length=208 numreads=15

GaTTCATTtGCTTGCCCTTTCGGGGCCACTCAGACGTAGATGCCGCTGGGGTAGACACGAGAGTTT
GTTGGGGCCTCCGGCGGGCGCCTGTTCCGGGCGCGGGGgCCCGGGGCTGTCCCGCCGAAGCAA
CGTTTTGGTAAGGTTACAGTGGGTTTTGgAGTTTTGGAAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTT
CACCAACGGAGA

>contig00016 length=205 numreads=16

TGCGGAaGGATCATTaTCGAGTTTtGaCTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCgAGGCACGTGCACGCCCT
GCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTGGGTTTACCGGTCGCGAAACGGGCTCGTTtATTCCG
GGCTTGTGGAGCGCACTTGTTCCTGCGTTTATCACAACTCCATtAAAGTATTAGAATGTGTATTG
CGATG

>contig00017 length=204 numreads=9

GGAGATACTCAGACTGCTGTAGACAACAAAGAGTTTtGTTCTCCTTCGGCAGGCACCcGGAGGCTG
AGAGGTCCCTCCCAGGGACCGCCTGCCGAAGAAACAGGACGGGTAGGTTACAAATGGGTTGTA
GGAGTCGTGTAACCTCTTAATGATCCCTCCGAGGTTACCTACGGAGACCTTGTACGACTTTtAC
TTccAGT

>contig00018 length=202 numreads=36

gactcAAGAGATCCGTTGTTGAAaGTTGTATTGTTtAATAACAAAaCGTTCTACTATGACATTATGTG
GTTtGTGTGAAaGAAGACCGAAGAGGTCCTCTGAAGTGACAGGTGAGGTTGAAGTGGATGCCGA
GGCGTGACATGCTCCCGTGACAGAAGCCAGCAAACAACCCCGTAACGACTCGTTAATGATCCTT
CCGCA

>contig00019 length=199 numreads=29

GATTtGTTtGTATTtGTTATTcAGAAGTAGATTcGCTATAAaTTCAAGAGTTTGGTGCTGCCGGCGG
GGgTCGGtCGGgCGCCCGCTAGGGGCAACCCTCCAGCCGTCCGCCGAGGCAACAGCAGTAATTG
GTAAGGTTcACAATGGgTTTTGGAGTAATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTcACCAACGGAG
A

>contig00020 length=193 numreads=14

CAAGAGATCCGTTGTTGAAaGTTTtATTATGTTATAATAAGACTACATTtGTTACAaTAATGTTtAGT
ATAAaaGTGGATGCAAGCATCCAACAGTTCACAGGTGTTATGGATAGAATTACCAACAGTGTACC
TGTTGGCACATCCGGACCGAAGCCTCAGATGATTTGAATTCAATAATGATCCTTCCGCA

>contig00021 length=192 numreads=41

gactcAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTGTATAGTTTGTGACTTGGCGTCAATATGTATGTACTT
GTACATGCGTGTTTGTGTGGTTGGACTTGCCTCCACGCGGCACAGAAGGCCGACAGTGCACCGGGT
TTGGTATGTGGTTAGAGGCGGACGAATCCACCTCTCGAATCCATTAATGATCCTTCTGCA

>contig00022 length=192 numreads=364

AaTTtATTtGTTTtGCCTTGC GGCGTATT CAGAAGATGCTGATAATACAAGAGTTTGA tGGTCCCCG
GCGgCCGCTGGTCCAGTCCGCGTCCGgCTGGGGCGAGTCCGCCGAAGCAACGATAGGTAGGTTCA
CATAAGGGTTTGGgAGTTGAAA ACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGA

>contig00023 length=192 numreads=24

GATTGTTtGGAAGTTACTCAGaGaTGCCACTAAATATaGgtATAGTTTtGCGACCTGCGGCGGGCGC
CTCCGCTaGGGAGGCTGCGGCCCGCCCTGGGGCCCGCCCGAGGCAACGGTAcGGgTATGTTT
ACaGtGGTTTGGGAGTcGtTAAACTCTGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGA

>contig00024 length=190 numreads=45

GATTCATTCTGTTCCTCACTCAGAAGATGCCACAGCAAAGACAGGAGTTTGGTTTtCCCCcGGCGGGC
GCCTTGGTCCGGGGCACGCAGGGGGCGCCGGGGCGTGTCCGCCGAAGCAACGATGGTATGTTCA
CAGTGGTTTGGCGAGTTGTTACGCTCTGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGA

>contig00025 length=185 numreads=3

ATCATTAAACGAGTggAGGGTCTTCTtGGCCcGACCTCCCAACCCTaTGTTtaTtgaCCTCTGTTGCTTC
GGCGGaCCcGccttACGgCcGCCGgAGGAtcGCcTCGCGGCGTCTCTGGccAGCGTCCGCCGATGCC
aaccTcAAAaCTCtGAATGAaTCGTGTCaTtATGTCTAAGTCTATGA

>contig00026 length=187 numreads=4

CTTtAAGACTCCGACGCAAAGATGCAGTGTTTgATGACCTCCGGGGGGCGCCGTCGCCGAAACGGC
GGGGTCGCCCCCGAAGCAACAGAGTTGGTTCACAAAGGGTTGGAGGTCGGGCTTtCGCCCTCACT
CAGTAATGATCCCTCCGCAGGTTACCTACGGAGACCTTGTACGACTTTtACTTCC

>contig00027 length=187 numreads=16

GTAaTAAATtACGTTTtACTGACGCTGATTCCAATAACAAAaGGTTTATGAATTGTCCTGGTGGCGG
GCGAACCCGCCAGGAAACAACAAGTGC GCAAAGACATGGGTGAAaTAATTCAGCTGTGGGAG
AGGCCAAAAGGCGCCCTCCTCACAACTGCATATTTtGTGTAATgaTCCCTCCGCA

>contig00028 length=186 numreads=71

GTAAATTATTACATTGTTACTGACGCTGATTGCCATTGCAAaGGTTTATGGGTTGGTCCTTGTGGT
GGGCGAGCCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAGACACGGGTGGAATAATTCAGCAAGGC
TGGCCACCCCGgAGGTGCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATGATCCCTCCGCA

>contig00029 length=185 numreads=108

TGCGGAAGGATCATTAACTTTCAAATCAGGGTGCGGCGCGGCCCCcGAGGAGCGGAAACAATCC
TTGGGAGGTATGCGGGGGCTTCGAGCCCCcATTTACGCACGCACGACTGCCATCCTTACTTTACG
AGCACCTTCTGTTCTCCCTCGGCGGGGCAACCTGCCGTTGGAACCGAATAAaCt

>contig00030 length=185 numreads=7

ATCATTAAACGAGTTTtAAAaGGTtGTGCTGGCCACTATCTGGGGTAGGTGCACGCCTACTCATATCA
ACCTTCTACCTTTGTCACTTATTGTAGGTCGGTGGAAAGGCTGGTTTGTAAGAACCAGCTGGAAA
ACCTTCCTATGTTTACTACAAACGCTTCAGTTATAGAATGTAATCTTGCgTA

>contig00031 length=183 numreads=52

GACTTATTAAaTAAGACACTCAGATAATCAACGAAGATAACAGAGTTTGGTTTGTCCGCCGGCGGg
CCGCCcGGGGCGCGAGGTCCCGGTAGCTTGCGCCGAGGCAACAAAGAGATAAGTTCACATGGG
TTTGGgAGTTGGATAACTCTGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGA

>contig00032 length=175 numreads=2

TtGTTGGTATCGgAACGGGTAATGCTGTtAtAAAaaGGTTtGgTTGGTTCCAGCGGCAGGTCCGCCc
GCCGAAGGAGAACGAAAaGGTGCTCGTACagTAAAGGGTGGATACGATGGCCACAGGACGcGGg
tcGCGGGGGACCcGcgAAaCCGCGCcTGCGaGCGATCGCGAATC

>contig00033 length=174 numreads=2

AGTTATTATTTTAATAAATTCAGACACGATTGGTTAAGAGTTTTGGTTAGGTTGGCCACCGGCGGG
TGCTGGCCGGAGGGGGTTACCCCTCCGGCGGTCCAAGGACGGACCCGCCGAAGCAACGTGAGGT
TTGGTAGACAAAGGGTTGGgAGGTCCGGCCTGTAAAGAaCCCAG

>contig00034 length=170 numreads=11

AACTAATTtAGCtAATAAGCTCAGACTGCAATCTTCAGACAGCGTTCAATGGTGTCTTCGGCGGGCG
CGGGccaGaGGGCAGaTGCCCCcGGCGGCCatGcGGCGGGCCCCGCCGAAGCAACAAGGTACGAT
AAACACGGGTGGgAGGTtGGACCCAGAGGGCCCTCACT

>contig00035 length=165 numreads=3

GTATATaCTCAGACGACACTAACATTGAGAGTTTgAAggCcTCTGGcGgCGCGCGCCaGCgTTAGC
CaGCGGcGGGcaGGAgCCtaGcGGCCCCCAAAGcAACACgGTAacgaTcaCAGTGGGTGGGAGAT
CTACCCgagAAGGGCGAGAACTCTGTAATGA

>contig00036 length=168 numreads=3

TGAATGCGCAAGCattttcGTGTTGTCgcccTTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGTCCCTCGGGACCGCCGGA
GGACCGCCGAAAGGTGTCTCTGGCCCCGCGCCCGCCGATGGCCAACCTCTAAACTCTGAATGAAT
CGTGTCTATTGTCTGAGTCTATGATTTAAaTAAAG

>contig00037 length=168 numreads=17

CTGATTTTATATTCAGACTCAGACTGCATCACTCTCAGGCATGAAGTTCAGTAGTCCCCGGCGGCT
CGCCCCGAGAGGGCtCCCcGCCGAAGCAACAGTGTTAGGTAGTCACGGGTGGGAGGTTGGGCG
CCCGGAGGCAGCCcGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCA

>contig00038 length=170 numreads=75

AATTTATTAATTAAGTTtACTCAGACTGCAAAGTTACGCAAGAGTTTGAAGTGTCCACCCGGAGCC
CCcGCCCCGAaGGCAGGGTCGCCCCGGAGGCAACAGAGTCGGACAACAAAGGGTTATGAACATCC
CGGTGGTTtagACCGGGTCACTTGTAAATGATCCCTCCGCA

>contig00039 length=167 numreads=11

GATTGATTATATGTATCACTCAGACGCAAGAGATGCAAGAGTTATGAAGGTGTCCGCCGGGGGCC
CcGACGCCCGAAGGCCGGGTGCCCCcGAGGCAACAGAGTCGTTTCGACATGGGGTTGGAGGGA
GGCGCCGGAGCGCCACACTCGGTAATGATCCCTCCGCA

>contig00040 length=164 numreads=2

ATCATTAAATCaGTGGATCCGGCGGgAAGTTCCCGCCGGGTaGACCTCCACCCGTGCCTATCTACTCT
TGTTGCTTTGGCGGGCCGTGGCCTCCACTACGGGCTCTGCTCGTACGTGCCCGCCAGAGGACCAA
ACTCTGAATTTAGTGATGTCTGAGTaCTATTt

>contig00041 length=161 numreads=4

TAATTTTGTGTTTTCACTCAGACTGCAATCTTCAGACAGCGTTCAGAGGGTCTTCGGCAGGCGCAG
GCCCCGGGgCAGAgCCCCcGGCGGCCGTGAGGCGGGCCTGCCGAAGCAACATGGTACAATAGAC
ACGGGTGGGAGGTTGGACCCAAAGGGCCCTC

>contig00042 length=162 numreads=19

TTTtGTATGATTCCAGCGGCAGGTTGCCCCcACCGAAGGAGAACGAAAGGTGCTCGTAAAAAaGGA
TTCAAACGCGTGCGCGTGAAGAGTGTTACCTCCTACCGCCCCGGAAGAACCCGGAGGCCGCGA
CCCACTGGATGATGTGTAATGATCCTTCCGCA

>contig00043 length=161 numreads=22

GATATATTTtGCTTCTCATCAGACGGAGCACTGCTCATTGCAGGAGAGTTTTtCTTGGGGTCCCCATT
GGCAGGCGAGCCTGCCGAGGAAACGTATGGTGCTCGAAAAGTCAAGGGTACTATCTCGACAGGG
CCGAAGCCCCACGATAATGATCCTTCCGCA

>contig00044 length=160 numreads=24

GATTGATTCAAaTATTtACTCAGACGCAAAGATGCAGAGTTGGGTGTCCGCCGGGGgCCCcAACGC
CcGAAGGCAGGGTTCGCCCCcGAGGCAACAGAGTCGGGTCACAATGGGTTGGAGGTTCGGGCCCGG
AGACCCTCACTCAGTAATGATCCCTCCGCA

>contig00045 length=158 numreads=35

GACTCGTTGtAGTGGACTCGGAGATGCCAACGCGCGAGGCAAGAGTCGTGGGCCCGCGGGC
AGGGCCCCCGGAGGCAACGTTTTTCAGGTAAGATTCACGGTGGTTGGGGgTTtGCACCTCCTGTAAT
GATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGA

>contig00046 length=155 numreads=18

AACTTggtttttATAAaTCAGAACATACAGTCCGCTGTGCAAATaGAGTTTTGGCGCTGCCGGCGGGG
ACGgCGGGGCCGgCGGCACGGCCCCGTTAGGGGCGCGAGCGCGACGTCCCACCGCCTCCCGCCG
AGGCAACGCGGCAAGaGgTAaCg

>contig00047 length=155 numreads=32

CACTACCCcATTGCCGCGGTTGCCTCGGCGGTGAGGTCCGCGGGGGgcggggCgtGCGCTCcGGC
GCTCCCCcTCCCGGGCCCCcGCCGGCCGCGCCTTACTCTTAATTTGCaaaGCGgACTGTACGATCT
GATTAATCTTGATAAAACAAGTC

>contig00048 length=150 numreads=18

CACTACCCcATTGCCGCGGTTGCCTCGGCGGTGAGGTCCGCGGTGGGgCCGCGCTCCGGCGCTC
CCcACCCcGGGCCACCCGCCGGCCGCGCCGAACCTCTTcATTtGCAAaGCGGACTGTACGATCTGATT
AATCTTGATAAAaCAAGTC

>contig00049 length=150 numreads=32

CTCCCAAACCACTGTAAACATACCCGTCCCcGTTGCTTCGGCGGGCGGCCcAGGGCGGGgCCGTC
GCCTCCCTCGtGGAGGCGCCcGCCGGAGGATAcctaaaCTATACcgATTATTAGTGGCCCTTCTGAGC
TATACGTgaaTAATtAC

>contig00050 length=144 numreads=9

CAAGATACAATCAGAACATGCAGTCCGCTTTGCAAATGAAGAGTTCGGCGCGGCCGGCGGGGGg
AGCCCCGGGGgAGCCGGGGCGCGGAGGCCCGGACACCGCAGACCCCTCCcGCCGAGGCAACGCG
CGGCAAGAGGGTAGGG

>contig00051 length=142 numreads=6

GGAAGTAAaGTCGTAACAAGGTTTTCTGTAGGTGAACCTGCAGAAGGATCATTAGTGAATTaaaGG
GAcTTTTcATTCTCATGGATTCCCGAACCCcTCACCTTTATCCAATTaCACCTGTGCAcTGTTGGTTAG
GTGTccTTC

>contig00052 length=139 numreads=5

ATGTGTAGGCACACAGGCAGGGACGCAGCCATTGAAGGTGCAGAACCCcGACCCATGAGAAAGT
GCACAGTGGTGTAGAAGGTTGGATGAACGAGGTGTGCACATGCCCGGAGGCCAGCAGCAACCCc
ACTCAACTtCA

>contig00053 length=135 numreads=9

ATCATTAGTGATTAATTATTGAGTGaTAAAAaCTCATAATCTTcTACAAACCACTGTTTAAAATGcttA
CTAGAATGTCCAAGCAGTTAAGCTGTTGAAAtATtAAAAGTTTAAaTAAAaCTTTCAACAACGGATC

>contig00054 length=133 numreads=2

TGAAGTTGAGCAGGGTTGTTGCTGgCCTCcGGGcATGTGCACGCCTtGTtCTGCCACCCTTcTACAC
CACTGTGCACTTCTcATGGGTCCGTTCTGCGCCTTCGGGCTGCGATCTTGCTGTGTGCTTATAC

>contig00055 length=132 numreads=13

ACTTGTtGTATTGaaaTACTCAGAGTAATAGTTCCGCTATAAaTCAAGAGTCTAGTGCTGCCGGcG
GGCGCCGGACGGCCcGCCGAGGCAACAACtGAAACggggAAATGTTcACATTGGGTTTGGAGCG

>contig00056 length=128 numreads=13

AAAaaaTCTGAATCAGACAGTGCAGTACGCTTCGCAGATGCAGAGTTCGGCGCTGCCGGCGGGGg
CCcGGGgCGGgcccgggggcccGCCcAGACCTCCcGCCGAGACAACGGCGCAGGGGgTaGGg

>contig00057 length=120 numreads=2

TATaagCACGTTGCTTCGGCGAGTGTCCCAGAGAGGGTCCGCCCTCCcGGGACGCTACGCTCGCC
GGCAGCCTACTAAaCTCTGTTTCTTTGCGTTGGCATCTCGAGTAAATCAAACAA

>contig00058 length=118 numreads=5

GAAAGGAGATTCATCTGCCAACGCCAAATtAAaCAAaCCCTGAGTTtATTGAATGTGAATTAActA
TGCCTtAGTTGGgCAGAAaCTtAATACAActtCAACAaCGgATCTCTTG

>contig00059 length=110 numreads=2

ATGGGATTCACCTGCCAACGCCCAATTTACCAAActCTGAGTTCATTGAATGTGAATTATCTATGCC
TTTaGTTGGGcAGACACATAATACTTTCAACAACGGATCT

>contig00060 length=109 numreads=1

TCTCGGACCGCCgggggaCCTTTACACGTCTCTGGCCCGCGCCCGccggtGGCCaaccttaacaaactC
TGTAACAACCATGTCTTGTCTGAGTATAATCttaaatt

>contig00061 length=105 numreads=3

GCAAGCCCCCcGGGGGgATACcTCCCCcGGGgCtAGcGCCCGCCGGAGACACCGAAaaaCTCt
GTGTGAAGgtTTGCCTCTGAGTTTGACACAAAaTAGCC

>contig00062 length=106 numreads=4

GATTGATTATGTATCcAACTCAGACGGCAGTCTTCAGACAGCGTTCGAAGAAAGGTCCCccGGCGA
GCACACGCCCCGGGGCACGAGGCCCCccGGCGGCCAGAA

>contig00063 length=102 numreads=2

CTTATTCAGtACAGAAGACTCAGAGAGGCCATacaaTTCAAGAGTTTGGtgACCTCcGGCGGGCGCC
CGCggaGGGGcccaggggcgcccgggtaacggga

>contig00064 length=104 numreads=4

GAACGTTGCCTCGGCGGGCGCCCAGCCTCGCGCCGGGCGTTCAGCCC GCCGGCGGCCCACTC
TGTCTCTGCAGCGtGGCATCTCCGAGTCACTACAAACAA