

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



DETECCIÓN DEL HONGO CHYTRIDIOMYCOTA (*Batrachochytrium dendrobatidis*) POR TÉCNICA DE PCR, EN LA RANA MARSUPIAL ANDINA (*Gastrotheca riobambae*) EN LA CIUDAD DE LATACUNGA

Documento Final del Proyecto de Investigación como requisito para obtener el grado de:

Médico Veterinario Zootecnista

Autor:

JORDÁN BAYAS MARJORIE VANESSA

Tutor:

MVZ. DIANA AVILÉS, PHD.

Cevallos – Ecuador

2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

MVZ. DIANA AVILÉS, PHD.

CERTIFICA

Que el presente trabajo de titulación “DETECCIÓN DEL HONGO CHYTRIDIOMYCOTA (*Batrachochytrium dendrobatidis*) POR TÉCNICA DE PCR, EN LA RANA MARSUPIAL ANDINA (*Gastrotheca riobambae*) EN LA CIUDAD DE LATACUNGA”. Ha sido minuciosamente revisado. Por lo tanto, se autoriza la presentación de este trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

Cevallos, 16 de marzo del 2023

MVZ. DIANA AVILÉS, PHD.

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

Yo, **Jordán Bayas Marjorie Vanessa**, con cédula de ciudadanía No **1804906343**, libre y voluntariamente declaro que la tesis “DETECCIÓN DEL HONGO CHYTRIDIOMYCOTA (*Batrachochytrium dendrobatidis*) POR TÉCNICA DE PCR, EN LA RANA MARSUPIAL ANDINA (*Gastrotheca riobambae*) EN LA CIUDAD DE LATACUNGA” es original, auténtica y personal. En tal virtud, declaro que el contenido será de mi sola responsabilidad legal y académica.



.....
Jordán Bayas Marjorie Vanessa

C.I. 180490634-3

DERECHO DE AUTOR

Al presentar esta tesis como uno de los requisitos previos para la obtención del título de Tercer Nivel en la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que haga de esta tesis un documento disponible para su lectura, según las normas de la Universidad. Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de esta tesis dentro de las regulaciones de la Universidad siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial. Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de esta tesis, o parte de ella.



.....
Jordán Bayas Marjorie Vanessa
CI. 180490634-3

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

DETECCIÓN DEL HONGO CHYTRIDIOMYCOTA (*Batrachochytrium dendrobatidis*) POR TÉCNICA DE PCR, EN LA RANA MARSUPIAL ANDINA (*Gastrotheca riobambae*) EN LA CIUDAD DE LATACUNGA

APROBADO POR:

FECHA: 16 de marzo 2023

.....

.....

Ing. Patricio Núñez, PhD

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....

.....

Dra. Cruz Quintana Sandra, PhD

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....

.....

Dr. Rosero Peñaherrera Marco, Mg.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

DEDICATORIA

A mis padres Graciela y Oswaldo que me han ayudado mucho a lo largo de estos años, me han permitido ser la mujer que soy ahora con todos sus consejos, su amor, su apoyo que con mucho esfuerzo nos han ayudado a ser profesionales y pese a la distancia, estos logros son por ustedes.

A los dos hombres más importantes en mi vida Edison mi esposo, que siempre me apoyó y me motivó a continuar y no rendirme y a Benjamín el motor de mi vida, la razón de tanto esfuerzo, empeño y dedicación.

A mis hermanos, Oscar y Katherine no se rindan y crean en sus capacidades, que gracias a ello pueden llegar a donde no se imaginan

Los resultados que consigues estarán en proporción directa al esfuerzo que aplicas.

Denis Waitley

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer principalmente a mis padres, que son el ancla fundamental de la familia, supieron guiarme y aconsejarme cuando las cosas no iban bien, por la paciencia y apoyo continuo en este camino; muchas gracias por todo.

A mi esposo Edison que con sus palabras de ánimo me ayudó a continuar a lo largo de todo el proceso.

Al amor de mi vida, mi hijo Benjamín eres la razón por la que he luchado y lucharé.

A mis hermanos que me motivaron a seguir adelante y a jamás rendirme aun cuando las cosas parecían imposibles.

A mi adorada amiga Gabriela, con quien compartí lágrimas y sonrisas a lo largo de este camino y no me queda más que decir que ¡LO LOGRAMOS!

De igual manera a Christian Quinteros que hizo lo posible e imposible por ayudarme con todos los documentos necesarios y me brindaba su mano en cada tropiezo, y con sus palabras de aliento me ayudó a continuar.

A Jonathan Oñate que su ayuda fue una pieza clave para poder realizar la fase de campo.

Resulta importante reconocer a Andrés Merino y Andrea Manzano, que sin su apoyo no hubiese sido posible la finalización de este proyecto de investigación.

A Esteban López cuya ayuda fue fundamental para la obtención del permiso de investigación con el Ministerio del Medio Ambiente, Agua y Transición Ecológica.

Y finalmente y no menos importante a Ricardo Andrade y Carlos Valle, que me brindaron su ayuda en el proceso de obtención del permiso de investigación con el Ministerio del Medio Ambiente, Agua y Transición Ecológica.

A todos los mencionados, mis más sinceros agradecimientos.

INDICE GENERAL DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVOS	3
1.1.1 Objetivo General.....	3
1.1.2 Objetivos Específicos	3
1.1.3 Hipotesis	3
1.2 MARCO CONCEPTUAL	4
1.2.1 Declinación de anfibios a nivel mundial	4
1.2.2 La quitridiomycosis	5
1.2.3 Taxonomía del hongo	5
1.2.4 Ciclo vital y morfología.....	6
1.2.5 Origen	8
1.2.6 Descripción genómica de <i>B.dendrobatidis</i>	9
1.3 Patogenicidad.....	10
1.4 Papel del microbioma cutáneo de los anfibios.....	13
1.5 <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en Ecuador	15
1.6 Clasificación de la clase amphibia.....	16
1.6.1 Gymnophiona o apoda.....	16
1.6.2 Caudata o urodelos	17
1.6.3 Anura o salientia.....	17
1.7 Anfibios en Ecuador	17
1.7.1 Descripción de <i>Gastrotheca riobambae</i>	18
1.7.2 Distribución de <i>G.riobambae</i>	19
1.7.3 Estado de conservación	20
1.8 Técnicas de detección de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	21
1.8.1 Histología	21
1.8.2 Citología y análisis de un montaje húmedo.....	21
1.8.3 Aislamiento microbiológico	22
1.8.4 Biología molecular: amplificación y detección de ácidos nucleicos.....	22
1.9 Tratamiento y gestión.	23
2 METODOLOGÍA	25
2.1 Ubicación del estudio y unidad de análisis	25
2.2 Solicitud del permiso de investigación.	25
2.3 Alcance	26
2.4 Diseño	26

2.5	Toma de muestras	27
2.6	EQUIPOS Y MATERIALES	27
2.7	Época de muestreo	28
2.8	Área de estudio	28
2.9	Técnicas de medición.....	29
2.10	Toma de Muestras de ranas adultas de <i>Gastrotheca riobambae</i>	29
2.11	Foto identificación	30
2.12	Toma de Muestras de renacuajos de <i>Gastrotheca riobambae</i>	30
2.13	Detección de Quitridiomycosis.....	31
2.13.1	Procesamiento de las muestras biológicas colectadas y extracción del ácido desoxirribonucleico total de las muestras tomadas en renacuajos y anfibios adultos. 32	
2.13.2	Cuantificación de ADN de las muestras tomadas en renacuajos y anfibios adultos de <i>G. riobambae</i>	33
2.13.3	Preparación de las reacciones para amplificación del ADN obtenido de renacuajos y anfibios adultos de <i>G. riobambae</i>	34
2.13.4	Amplificación del material genético de <i>B. dendrobatidis</i> y del ADN de control. 35	
2.13.5	Determinación de los productos mediante electroforesis en gel de agarosa.....	36
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
2.14	Análisis de los resultados.....	38
3.1.1	Área de estudio	38
3.1.2	Estructura poblacional	40
3.1.3	Muestreo de renacuajos de <i>G.riobambae</i>	41
3.1.4	Detección de Quitridiomycosis	42
3.1.5	Detección de <i>B. dendrobatidis</i> en adultos de <i>G.riobambae</i>	43
3.1.6	Detección de <i>B. dendrobatidis</i> en renacuajos de <i>G.riobambae</i>	43
3.1.7	Distribución de <i>B.dentrobatidis</i>	44
2.15	DISCUSIÓN	45
3	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
3.1	Conclusiones	48
3.2	Recomendaciones	49
4	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	50
5	ANEXOS.....	66
7	TABLAS.....	92

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 . Datos descriptivos del genoma de <i>B.dendrobatidis</i>	10
Tabla 2 Condiciones de amplificación de material genético de <i>B. dendrobatidis</i> mediante PCR.....	36
Tabla 3 Diseño para el muestreo poblacional de <i>Gastrotheca riobambae</i> en las parroquias de Latacunga.....	38
Tabla 4 Características de renacuajos de <i>Gastrotheca riobambae</i> ,.....	42
Tabla 5 Valores de precipitación y temperatura obtenidos de los boletines diarios de “Instituto Nacional de meteorología e Hidrología” (INAMHI)	92
Tabla 6 Cuantificación de ADN de las muestras tomadas en renacuajos de <i>G.riobambae</i>	92
Tabla 7 Cuantificación de ADN de las muestras tomadas en anfibios adultos de <i>G. riobambae</i>	93
Tabla 8 Reactivos de la premezcla para la fase de amplificación en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de punto final para la identificación del quítrido <i>B. dendrobatidis</i>	94
Tabla 9 Registro de los datos obtenidos de las poblaciones de <i>G.riobambae</i>	95
Tabla 10 Resultados negativos del corrido de PCR punto final en renacuajos de <i>G.riobambae</i>	96
Tabla 11 Resultados negativos del corrido de PCR punto final en ranas adultas de <i>G.riobambae</i>	97

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se cubrió una superficie total de muestreo aproximada de 7.200 m² (T1 y T2) y de 4.800 m² (T3), donde se obtuvieron datos de distribución local, preferencia por diferentes tipos de sustrato , estructura poblacional, además también se analizó la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* .Se realizó un estudio cuyo objetivo principal fue determinar la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en las poblaciones de ranas adultas y renacuajos de *Gastrotheca riobambae* mediante técnica de PCR de punto final, en los sectores comprendidos de Belisario Quevedo (-0.962806, -78.594406), Juan Montalvo (-0.900921, -78.605251), San Buenaventura (-0.886293, -78.608960), pertenecientes a la ciudad Latacunga, para esto se aplicó el diseño no experimental, transeccional y para la toma de muestras un método no probabilístico por conveniencia. Para la toma de muestras de las ranas adultas se aplicaron técnicas estandarizadas para anfibios como el método de relevamiento por encuentros visuales y puntos auditivos fijos.

En el presente trabajo se aplicó la técnica de PCR de punto final para detectar la presencia de *B. dendrobatidis* y se utilizaron cebadores específicos para el quitrido, en cada ensayo realizado se utilizaron controles positivos, de esta manera nos aseguramos de que las condiciones del PCR se encuentren adecuadas y amplifiquen todas las muestras que resulten positivas. El ensayo para el diagnóstico se realizó en 39 muestras obtenidas mediante hisopados de las tres localidades de Latacunga, los resultados obtenidos pueden estar relacionados a múltiples factores como, los sitios de muestreo, la temperatura ambiental o por la altitud. Los tres lugares donde se realizó la toma de muestras fueron sitios con cierto grado de perturbación antrópica, que es uno de los factores determinantes para la presencia de *B.dendrobatidis*.

Palabras clave: *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Gastrotheca riobambae*, quitridiomycosis, diagnóstico.

ABSTRACT

In the present research work, a total sampling area of approximately 7,200 m² (T1 and T2) and 4,800 m² (T3) was covered, where data were obtained on local distribution, preference for different types of substrate, population structure, as well as the presence of *Batrachochytrium dendrobatidis*. The main objective of this study was to determine the presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in the populations of adult frogs and tadpoles of *Gastrotheca riobambae* by endpoint PCR in the sectors of Belisario Quevedo (-0.962806, -78.594406), Juan Montalvo (-0.900921, -78.605251), San Buenaventura (-0.886293, -78.608960), belonging to the city of Latacunga, for this purpose a non-experimental, transectional design was applied and for sampling a non-probabilistic method by convenience. For the sampling of adult frogs, standardized techniques for amphibians were applied, such as the survey method by visual encounters and fixed auditory points.

The end-point PCR technique was applied to detect the presence of *B. dendrobatidis* and specific primers for the chytrid were used. Positive controls were used in each test performed, thus ensuring that the PCR conditions were adequate and amplified all the samples that were positive. The diagnostic assay was performed on 39 samples obtained by swabs from the three localities of Latacunga, the results obtained may be related to multiple factors such as sampling sites, ambient temperature or altitude. The three locations where samples were taken were sites with a certain degree of anthropic disturbance, which is one of the determining factors for the presence of *B. dendrobatidis*.

Key words: *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Gastrotheca riobambae*, chytridiomycosis, diagnosis.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

INTRODUCCIÓN

A pesar de que Ecuador tiene un gran número de especies de anfibios, estos han ido disminuyendo a través del tiempo, debido a que existe un gran crecimiento de las actividades forestales, ganaderas y agrícolas, las cuales han contribuido al incremento de temperatura, desencadenando una reducción en los hábitats por consiguiente contribuye a la vulnerabilidad de varias especies de anfibios, hasta el punto de ponerlas en peligro de extinción (**Amphibiaweb, 2018; Cadena y García, 2012**).

Tal es así que la importancia de los anfibios destaca en que, los adultos se alimentan de mosquitos y moscas que pican, las cuales son transmisoras de muchas enfermedades tales como el dengue, la malaria y el virus Zika. En consecuencia, si los anfibios mueren, los mosquitos que normalmente serían consumidos pican a los humanos, infectando a muchas más personas con patógenos, de modo que, la propagación de enfermedades transmitidas por mosquitos sería significativamente alta (**West, 2018; Romero et al., 2021**).

De igual manera, al consumir todas las etapas de la vida de los mosquitos, los anfibios ayudan como agentes de control biológico extremadamente útiles para el consumo de invertebrados herbívoros que dañan los cultivos de los agricultores, por lo tanto, si las poblaciones de anfibios disminuyen, conduciría a un aumento en el tamaño de la población de insectos produciendo disminución de la biomasa vegetal (**Van Meter, 2018; West, 2018**).

Del mismo modo, estos animales se consideran indicadores precisos de la salud ambiental y la calidad del hábitat, particularmente para indicar la contaminación o las secuelas de la degradación del hábitat, por lo tanto, ayudan a la detección temprana del deterioro ambiental, es crucial en la gestión ambiental efectiva, ya que es mucho más práctico y rentable implementar medidas preventivas y de mitigación que revertir una catástrofe ambiental importante en todo el ecosistema (**West, 2018**).

Sin embargo, el declive de las poblaciones de anfibios no sólo se debe al cambio climático, sino también a factores antropogénicos, por ejemplo, fragmentación, pérdida de hábitat, contaminación y enfermedades (**Collins y Storfer, 2003; Pounds et al., 2006**).

Tal es el caso de la rana marsupial andina (*Gastrotheca riobambae*) se encuentra distribuida en los bosques y valles interandinos del norte y centro del Ecuador, este tipo de anfibio solía ser de presencia muy frecuente hace varios años, pero lamentablemente en la actualidad ante su decrecimiento poblacional se encuentra catalogada como una especie con un estatus muy vulnerable con población en decrecimiento, y catalogada en peligro en la Lista Roja de UICN (**Coloma et al., 2004**).

Laurance et al., (1996) sugirieron que existe la probabilidad de que una sola enfermedad pueda ser la causante de extinciones masivas de anfibios. Años más tarde, se propone que la responsable de las disminuciones en las poblaciones de anfibios es la quitridiomycosis (**Berger et al., 1998; Bosch et al., 2001**). De la misma forma, **Longcore et al., (1999)** menciona que a nivel mundial una de las más grandes amenazas que tienen los anfibios es un hongo patógeno conocido como *Batrachochytrium dendrobatidis*, que en muchas especies de anfibios este hongo causa una enfermedad denominada Quitridiomycosis, que progresa rápidamente en el hospedador.

Un reporte estudio por **Voyles et al., (2012)**, menciona que en los anfibios se da una reducción en las concentraciones plasmáticas de los electrolitos a causa de un aumento en la carga de zoosporas, es decir, los animales infectados con esta enfermedad van a tener una pérdida severa de solutos, lo que sugiere que *Batrachochytrium dendrobatidis* produce la muerte a causa un desequilibrio electrolítico por alteración en la osmorregulación cutánea (**Voyles et al., 2009**).

A pesar de que este hongo ya ha sido estudiado en varias poblaciones de anfibios en el Ecuador, la presente investigación tiene como objetivo determinar la presencia del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* en las poblaciones silvestres de la rana marsupial andina *Gastrotheca riobambae* en varios sectores de la ciudad de Latacunga, como son Belisario Quevedo, Juan Montalvo y San Buenaventura del Cantón Latacunga, Provincia de Cotopaxi, ya que no hay datos investigativos sobre la problemática expuesta en esta zona, lo que permitirá generar datos que sean de utilidad para futuras investigaciones.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 *Objetivo General*

- Determinar la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en las poblaciones silvestres de *Gastrotheca riobambae*, de los sectores de Belisario Quevedo, Juan Montalvo y San Buenaventura del Cantón Latacunga, Provincia de Cotopaxi, por técnica de PCR

1.1.2 *Objetivos Específicos*

- Determinar por ensayo PCR el material genético de *B. dendrobatidis* obtenido a partir de la técnica de hisopados del sistema tegumentario en adultos de la especie *G. riobambae*.
- Evaluar por ensayo de PCR el material genético de *B. dendrobatidis* obtenido a partir de la técnica de hisopados en el aparato bucal del renacuajo de la especie *G. riobambae*.
- Estimar la distribución local de la infección por *B. dendrobatidis* en las poblaciones de *Gastrotheca riobambae* incluidas en el estudio.

1.1.3 *Hipotesis*

- H1: Las poblaciones de la rana marsupial andina (*Gastrotheca riobambae*) de la ciudad de Latacunga se encuentran afectadas por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*
- H0: Las poblaciones de la rana marsupial andina (*Gastrotheca riobambae*) de la ciudad de Latacunga no se encuentran afectadas por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*.

1.2 MARCO CONCEPTUAL

1.2.1 Declinación de anfibios a nivel mundial

Butchart *et al.*, (2010) mencionan que en la actualidad el mundo está siendo testigo de un declive rápido y severo en la biodiversidad. Existen reportes donde se observan descensos de poblaciones de anfibios, donde al menos el 41% de estas especies están disminuyendo, tal es el caso que la **IUCN (2021)**, reportó en el año 2021, que los anfibios que se encontraron en la categoría de En Peligro Crítico (CR), fueron alrededor de 673 especies, mientras en la categoría de En Peligro (EN), se reportaron 1.085 especies y en la categoría de Vulnerable (VU) 730 especies, lo que se ve en un notable aumento si lo comparamos con los datos del año 2016. Estos datos son un indicativo que, en el futuro, se puede esperar que el número de especies amenazadas aumente.

En Sudamérica, por ejemplo, el país con el número más alto de especies amenazadas en el grupo de anfibios es Colombia con un total de 289 especies, seguido de Ecuador con 170 especies amenazadas, en el tercer lugar está Perú con 103, seguido de Venezuela con 128. Donde se puede observar la notoria desaparición de los anfibios a nivel mundial. **(IUCN,2021)**

Sin embargo, el cambio climático, la destrucción del hábitat, la sobreexplotación, tanto de recursos como de especies, la aparición de especies invasoras son varias de las principales causas de la pérdida de biodiversidad **(Rands *et al.*, 2010)**. Pero el declive de las poblaciones de anfibios, también se debe a factores antropogénicos, como, por ejemplo, fragmentación, contaminación y enfermedades **(Collins y Storfer, 2003; Pounds *et al.*, 2006)**. Tal es así que **Laurance *et al.*, (1996)** sugirieron que existe la probabilidad de que una sola enfermedad pueda ser la causante de extinciones masivas de anfibios. Evidencias existentes señalan, que la drástica disminución de la población anfibia, se le contribuye a la enfermedad quitridiomycosis (en adelante, Chyt), la cual es sumamente devastadora. La Chyt es causada por el hongo quítrido *Batrachochytrium dendrobatidis*. Este hongo es de fácil diseminación y además muy contagiosa lo que conlleva a reducir la biodiversidad anfibia en un corto periodo de tiempo **(Bradley *et al.*, 2019)**.

1.2.2 La quitridiomycosis

Batrachochytrium dendrobatidis

La pérdida de biodiversidad es uno de los principales resultados de la perturbación del ecosistema mediada por el hombre. Una forma en que los humanos han provocado la disminución de la vida silvestre es mediante el transporte de agentes causantes de enfermedades hacia áreas remotas del mundo. De modo que los anfibios se han visto particularmente afectados por enfermedades, debidas en parte a un hongo quitrido patógeno distribuido globalmente *B. dendrobatidis* (Byrne *et al.*, 2019).

1.2.3 Taxonomía del hongo

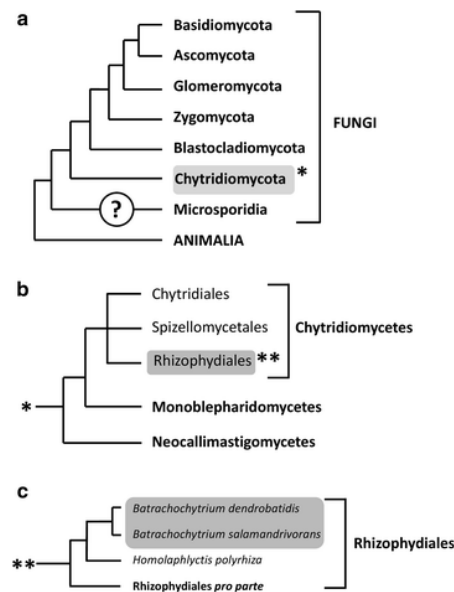


Figura. 1

Filogenia y clasificación del género *Batrachochytrium*. Cladograma que muestra la posición taxonómica de *Batrachochytrium dendrobatidis* y *Batrachochytrium salamandrivorans* dentro del reino fúngico (a), el filo Chytridiomycota (b) y el orden de los Rhizophydiales (c). La posición de Microsporidia sigue siendo incierta. Las longitudes de las ramas no son proporcionales a las distancias genéticas. La topología se deriva de Martel *et al.*, (2013); Longcore *et al.*, (1999) y Hibbett *et al.*, (2007).

Berger *et al.*, (1998), consideraron en las primeras etapas de su estudio que *B. dendrobatidis* estaba dentro del orden de Chytridiales, sin embargo, Tedersoo *et al.*, (2018), en sus estudios moleculares determinaron que realmente pertenece al orden de los Rhizophydiales.

1.2.4 Ciclo vital y morfología.

El ciclo vital de *B. dendrobatidis* se distingue por poseer dos ciclos:

Ciclo endobiótico

El hongo crece dentro del huésped (Figura 2b). En este caso, las zoosporas utilizan su flagelo para la motilidad. Una vez en contacto con la epidermis superficial del anfibio, las zoosporas habitan la piel y desarrollan un tubo germinativo que penetra la membrana de la célula huésped para transferir material genético. El extremo distal del tubo germinal se hincha y produce un nuevo astrágalo, quítrido intracelular y esporangio. Este proceso se repite, cada vez excavando en capas más profundas de la epidermis del huésped. Una vez penetrados por completo, los esporangios inmaduros son transportados a la superficie de la piel. Cuando los esporangios finalmente maduran, los tubos de descarga liberan zoosporas maduras al medio ambiente para infectar a nuevos individuos (**Piotrowski et al., 2004**).

Ciclo epibiótico

Por un lado, va a presentarse como zoospora móvil con un solo flagelo, donde carecen de pared y adoptan una forma globosa. (**Berger et al., 2005**). Por otro lado, **Moss et al., (2008)**, mencionan que el desplazamiento de estas esporas de vida libre favorece a la extensión del hongo entre los diferentes tejidos formadores de queratina tales como los pies, piernas, región inguinal y disco oral en estado larvario, además ayuda a la transmisión por contacto. Estudios de laboratorio realizados por **Lam et al., (2011)**, han demostrado que durante el estadio de zoosporas estas se sienten atraídas a varios nutrientes tales como proteínas, azúcares y aminoácidos, por lo contrario, estas se sienten repelidas por los metabolitos producidos por el microbioma del anfibio las cuales pueden resultar nocivas.

Luego de un corto periodo de motilidad, la zoospora se enquista en la epidermis superficial (Figura 2a) y desarrolla una pared celular, en ese momento, el flagelo se reabsorbe formando una pared compuesta principalmente de quitina (**Van Rooij et al., 2015**) y desarrolla pequeñas ramificaciones denominadas rizoides las cuales van a ayudar en la adhesión. Gracias a una división mitótica el citoplasma del esporangio sufre cambios

y se da la formación de nuevas zoosporas flageladas que darán origen a los zoosporangios. Esta etapa es metabólicamente más activa y compleja (**Rosenblum *et al.*, 2012**).

Seguido a esto, el quiste de zoospora germina y desarrolla un tubo germinativo que invade la epidermis del huésped. En la punta del tubo germinativo surge un nuevo esporangio (**Van Rooij *et al.*, 2015; Greenspan *et al.*, 2012**). Posteriormente, el hongo prolifera intracelularmente, dentro de las células del estrato córneo y del estrato granuloso. Los esporangios inmaduros se transportan desde las capas más profundas de la piel hasta la superficie de la piel mediante la diferenciación de las células epidérmicas. En el momento en que los esporangios han desarrollado tubos de descarga y contienen zoosporas maduras, finalmente se producen en el estrato córneo, donde las zoosporas se liberan en el medio ambiente (Figura 3) (**Longcore *et al.*, 1999; Berger *et al.*, 1998**)

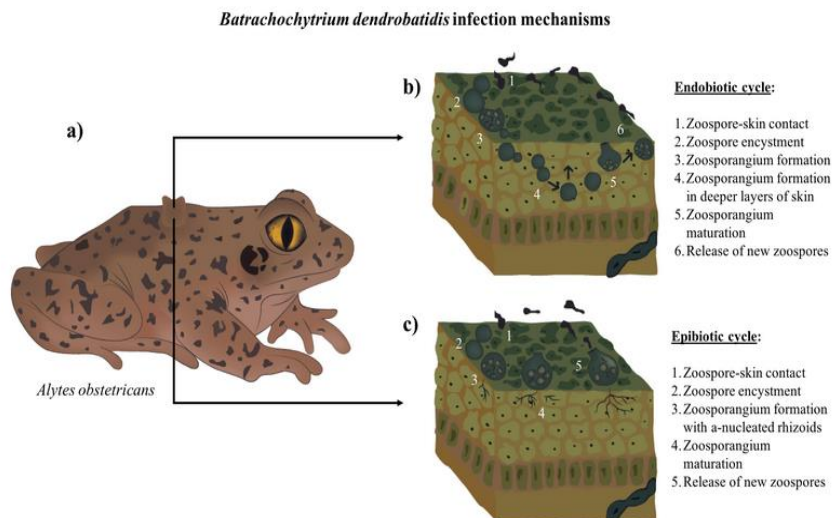


Figura.2

Mecanismos de infección por *B. dendrobatidis* (a) *Alytes obstetricans* , una especie de rana pequeña y robusta que pertenece a Anura, (b) ciclo endobiótico y (c) ciclo epibiótico, (**Romero *et al.*, 2021**).

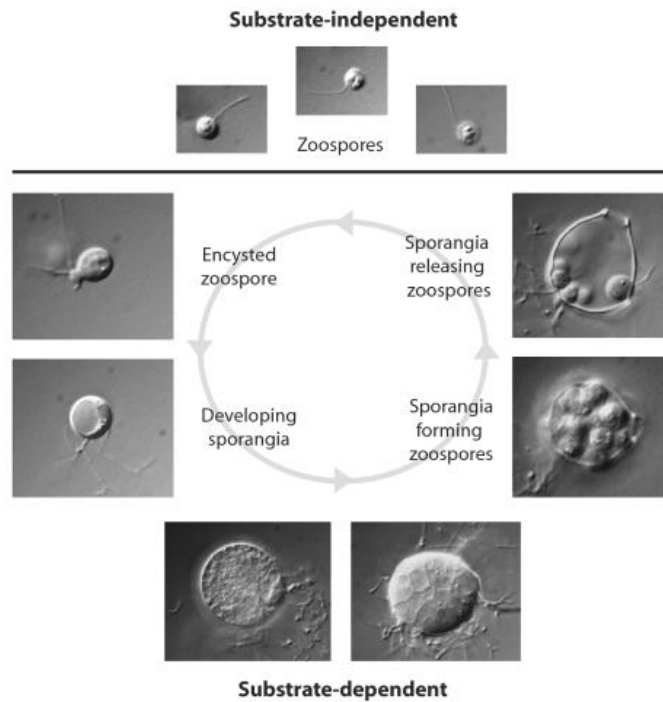


Figura.3

Ciclo de vida de *B.dendrobatidis*. En la etapa de sustrato independiente, las zoosporas son flageladas, móviles y de vida libre. Por el contrario, en el sustrato dependiente (después de infectar al huésped), la zoospora se enquistas y desarrolla un talo de reproducción con un único esporangio que producen y liberan zoosporas.

1.2.5 Origen

Descubierta por primera vez en ranas muertas y moribundas en Queensland en 1993, la quitridiomycosis es una enfermedad altamente infecciosa de los anfibios, causada por el hongo quítrido anfibio *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Desde 1993, la investigación ha demostrado que el hongo está muy extendido en Australia y ha estado presente en el país desde la década de 1970. La enfermedad también se encuentra en África, las Américas, Europa, Nueva Zelanda y Asia (DSEWPaC, 2013).

Desde la década de los noventa donde se da el descubrimiento de la enfermedad, se han planteado dos hipótesis que han intentado explicar el origen de *B. dendrobatidis*, en diferentes regiones de todo el mundo. La primera hipótesis es la del “nuevo patógeno”, que plantea que la enfermedad infectó a nuevos hospedadores y áreas geográficas hace poco tiempo, como consecuencia de factores antrópicos como la comercialización de animales enfermos (Scheele *et al.*, 2017).

Tal es así que, **Schloegel et al., (2012)** mencionan que, estudios enfocados en la rana toro norteamericana muestran que, esta rana es ampliamente distribuida, además, que es portadora de una gran diversidad de genotipos de *B. dendrobatidis*, esto indicaría que su invasión pudo contribuir y facilitar el flujo génico intercontinental del hongo. Además, **Villacís y Zurita (2002)**, afirman que en Ecuador los criaderos de esta especie de rana datan de los años ochenta y por lo tanto coincide con el primer registro de **Ron y Merino (2000)** del quítrido en el país, el cual data de 1980, a su vez **Merino-Viteri, (2001); Ron et al.,(2003)**, mencionaron que en los años 80s y 90s se registraron varias anomalías climáticas teniendo en ambas épocas una combinación inusual de días secos, temperaturas altas y bajas precipitaciones, lo que evidenció en este periodo de tiempo mayor declinación de anfibios.

La otra hipótesis, del “patógeno endémico”, plantea que la enfermedad ya estaba presente en las regiones afectadas en la actualidad y que cambios en el ambiente han vuelto a los anfibios más susceptibles, propiciando así los recientes declives (**Scheele et al., 2017**). No obstante, **Goka et al., (2009)**, menciona que basándose en investigaciones realizadas en la región ITS del ADN ribosomal, la mejor explicación para la pandemia actual del hongo es que existe una combinación de ambas hipótesis.

1.2.6 Descripción genómica de *B.dendrobatidis*.

Gracias a la implementación de técnicas moleculares para detectar la presencia del quítrido en anfibios, se ha logrado secuenciar diferentes cepas de *B.dendrobatidis* provenientes de todo el mundo, para compararlas y determinar los diferentes haplotipos que pueden estar presentes en las poblaciones infectadas y de este modo poder llegar a las posibles conclusiones sobre el origen de *B.dendrobatidis* (**Morgan et al., 2007**). Secuencias de todo el genoma muestran al menos cuatro linajes principales dentro de *B.dendrobatidis*: el linaje panzoótico global (*BdGPL*), el linaje del Cabo (*BdCape*), el linaje suizo (*BdCH*) y el linaje de Brasil (*BdBrazil*)

Fisher et al. (2009) realizó un estudio de perfiles proteómicos de un conjunto global de aislados de *B.dendrobatidis*, dando como resultado una variación significativa en los patrones de expresión de proteínas entre los aislados, sugiriendo, que estos caracteres están bajo selección y que posiblemente pueden estar relacionados a condiciones ambientales locales por lo que, es más probable que *B.dendrobatidis* presente cambios en su desplazamiento, y así permitirle adaptarse a nuevos climas,

especies hospederas, o ambos casos.

La variación del número de copias cromosómicas está muy extendida en esta especie y el genoma de los aislamientos individuales puede contener de 2 a 5 copias de cada cromosoma (Schoch CL, *et al.*2020)

Tabla 1. Datos descriptivos del genoma de *B.dentrobatidis*

Tamaño del genoma	24.3 MB
Longitud total sin huecos	24.1 MB
% de GC	39
Recuento medio de proteínas	9278

(Schoch CL, *et al.*2020)

1.3 Patogenicidad

Aunque la principal causa de la disminución de los anfibios se les acreditan a perturbaciones antropogénicas (Stuart *et al.*, 2004). Asimismo, muchas de estas disminuciones no antropogénicas se han atribuido al patógeno cutáneo (*Bd*), el cual ataca las capas queratinizadas de la piel de los anfibios y puede causar quitridiomycosis según lo mencionado por Berger *et al.*, (1998); Pessier *et al.*, (1999), la piel de los anfibios se caracteriza por tener una alta permeabilidad, por lo tanto se convierte en una característica única entre los tetrápodos, en consecuencia les permite cumplir una serie de funciones fisiológicas, como por ejemplo; la regulación iónica y osmótica además del intercambio de gases cutáneos, que permiten al organismo mantener las condiciones de homeostasis necesarias para la vida , pero para que todas estas funciones se lleven a cabo se requiere de una epidermis húmeda y, por lo tanto la secreción de manera activa de varias sustancias acuosas de las glándulas dérmicas, esta característica genera que los anfibios sean más susceptibles a grandes pérdidas de agua por evaporación (Larsen *et al.*, 2014). Dada la importancia de la regulación fisiológica a través de la piel, una alteración de la función cutánea suele tener graves consecuencias para la salud de los anfibios (Pessier, 2002).

La quitridiomycosis afecta las capas queratinizadas de la epidermis, principalmente a las células del estrato córneo y granuloso a través de una zoospora flagelada nadadora y, en piezas bucales de renacuajos de anuros, pudiendo extenderse al resto del cuerpo en el estado adulto durante la metamorfosis (**McMahon y Rohr, 2015**).

La piel de los anfibios sufre un proceso de desprendimiento o muda constante, donde el anfibio muda la capa externa de la piel, el estrato córneo en su totalidad de manera regular es así, que la piel se convierte en la primera línea de defensa contra los patógenos invasores, de esta manera se asegura una función fisiológica óptima (**Larsen et al., 1976, Alibardi et al., 2003**). Es importante destacar que se ha planteado la hipótesis de que dicho proceso desempeña un papel fundamental en la regulación de los microbios cutáneos, al eliminar periódicamente las poblaciones residentes de bacterias y hongos (**Meyer et al., 2012**). Se ha demostrado que esta regulación elimina hasta el 100% de los microbios cultivables en la superficie de la piel (**Meyer et al., 2012, Cramp et al., 2014**) y puede ayudar a prevenir eventos de disbiosis (**Colombo et al., 2015**).

Se cree que el sistema inmunitario de los anfibios adultos está fundamentalmente conservado en estructura y función con respecto a otros vertebrados con mandíbula, como los mamíferos, a pesar de su divergencia evolutiva temprana (**Robert, 2020**). Dado el papel vital de la piel en el mantenimiento de la homeostasis de los anfibios, el mantenimiento de la integridad y función de la piel es de considerable importancia. Con este fin, la capa queratinizada externa se elimina periódicamente y se reemplaza por "desprendimiento". El desprendimiento también juega un papel importante en la regulación de la abundancia de microbios cutáneos (**Meyer et al., 2012; Cramp et al., 2014**), y en ranas infectadas con , el desprendimiento ayuda a eliminar el hongo *B. dendrobatidis* de la capa queratinizada (**Ohmer et al., 2017**). El desprendimiento intermitente de la capa externa de la epidermis, el estrato córneo, no presenta un patrón estacional evidente en los anfibios, puede ayudar en la eliminación física de los microorganismos de la piel (**Ling, 1972; Cramp et al., 2014**).

La piel eliminada durante todo este proceso se desprende ya sea en una sola pieza o en pequeños parches con la ayuda de boca y extremidades, por lo general suele ser ingerida con el propósito de aprovechar los materiales y acelerar la regeneración epidérmica, como

mecanismo de recuperación de sus proteínas epidérmicas, y además como un agregado de vitamina D a su dieta (**Bustard y Maderson, 1965; Ling, 1972; Sabagh y Carvalho-eSilva, 2008**).

Davies & Withers (1993) mencionan que el periodo y la frecuencia de muda tienden a variar entre unos pocos días hasta algunas semanas entre especies y también entre adultos y juveniles. Un claro ejemplo son las investigaciones realizadas por **Balakrishna y Shakuntala (1988), Scharrer (1958), Larsen (1976)** donde se reporta que los periodos de muda en adultos de la especie *Bufo melanostictus* fue de 5 a 6 días, en *Bufo marinus* de 7 a 8 días y en *Bufo bufo* entre 7 y 11 días mientras que sus juveniles mudaron entre 4 y 7 días. No obstante, estos datos sobre frecuencia de muda entre especies y diferentes estadios ontogénicos son muy escasos.

Del mismo modo, **Ohmer et al., (2017)** encontraron que el desprendimiento o muda ayudo a reducir la carga de *B. dendrobatidis* en cinco especies de anuros, con especies menos susceptibles que eliminan la infección. Sin embargo, las especies susceptibles continuaron desarrollando quitridiomycosis a pesar de un aumento en la frecuencia de descamación y a pesar de una reducción temporal en la carga de *B. dendrobatidis* después de la descamación (**Ohmer et al., 2017**). En anfibios sanos (*Rhinella marina*), el desprendimiento se acompaña de un aumento de la permeabilidad cutánea (**Wu et al., 2017**).

La quitridiomycosis provoca una variedad de cambios en la epidermis del huésped, que incluyen hiperqueratosis, hiperplasia, ulceración, erosiones y necrosis (**Martel et al., 2013; Berger et al., 2005**). La quitridiomycosis es notable cuando los anfibios muestran su comportamiento alterado (falta de apetito y letargo), además que estos sufren daños físicos en la piel, (eritema cutáneo, hiperqueratosis), en el caso de los renacuajos, se producen malformaciones bucales provocando malnutrición. Las proteasas (enzimas que digieren otras proteínas) liberadas por los hongos parecen ser los causantes de atacar las uniones intercelulares en la epidermis, lo que conlleva a una reducción en la cohesión del tejido por lo tanto va a provocar la muerte celular por anoikis, que se produce cuando una célula abandona la membrana basal a la que estaba anclada (**Brutyn et al., 2012**).

En los anfibios las células epiteliales cutáneas contienen proteínas de transporte de iones (canales, cotransportadores, intercambiadores, ATPasa) donde los electrolitos se van a intercambiar a través de espacios paracelulares o transcelularmente. (**Hillyard et al., 2008**).

En ranas enfermas con quitridiomycosis, ocurre una disminución o, en los peores casos pérdida de la capacidad absorbente de los iones cutáneos, lo que conlleva a hiponatremia e

hipocloremia, es decir, niveles bajos en los electrolitos circulantes (**Voyles et al., 2009**). Estas iones son fundamentales para alcanzar el potencial eléctrico necesario para la contracción muscular durante el ciclo cardíaco, por lo que, al disminuir por debajo de niveles críticos, se produce un estado asistólico en el que el corazón no es capaz de latir, que conlleva la muerte del anfibio (**Voyles et al., 2009**).

Brutyn et al., (2012), añaden que *B. dendrobatidis* pueden alterar las uniones intercelulares epidérmicas, gracias a la producción de una mezcla de proteínas (proteasas, proteínas asociadas a biopelículas y una lipasa de éster carotenoides). Asimismo **Rosenblum et al., (2012)**, mencionan que en consecuencia va a existir una supresión de genes relacionados con la producción de queratina y colágeno. Además de sus efectos sobre la integridad de la piel, **Campbell et al., (2012)** sugirieron que las infecciones cutáneas producidas por *B. dendrobatidis* pueden inhibir directamente los canales epiteliales de sodio (ENaC), que son los principales responsables de la recaptación cutánea de Na^+ de las secreciones cutáneas y/o del medio ambiente (**Schild, 2010; Larsen y Ramlov, 2013**).

La supervivencia del hospedador puede deberse gracias a otra defensa inespecífica, la cual es gracias a las propias comunidades de microorganismos como bacterias, hongos y microeucariotas asentadas en la piel del anfibio (**Kueneman et al., 2017**).

1.4 Papel del microbioma cutáneo de los anfibios

Los anfibios emplean tanto mecanismo de inmunidad innata como adquirida para enfrentarse a la quitridiomycosis. Las lisozimas son unas de las primeras barreras de las defensas innatas frente a infecciones. Se trata de una serie de enzimas presentes en la superficie de este estrato superior donde se encuentra una capa de moco producido por las glándulas mucosas, el mismo que contiene una serie de moléculas defensivas, que incluyen en inicio lisozima y varias enzimas producidas por fagocitos y queratinocitos, seguido de péptidos antimicrobianos secretados a través de las glándulas serosas, además de anticuerpos de las mucosas, así como finalmente comunidades bacterianas simbióticas comensales (microbioma) con sus compuestos antimicrobianos secretados (**Van Rooij et al., 2015; Murphy, 2012**).

Marchesi y Rave (2015), establecen que el hábitat que se encuentra formado tanto por microorganismos, genomas y el ambiente que a esta rodea, se denomina microbioma. De esta manera **Loudon et al., (2014)**, aseguran que el microbioma cutáneo de los anfibios comprende microorganismos cultivables y no cultivables. Es así como los metabolitos antifúngicos que

incluyen 2,4-diacetilfloroglucinol, indol-3-carboxaldehído y violaceína (fig.4) producidos por las bacterias del microbioma son esenciales para proteger a los anfibios en contra de *B. dendrobatidis* (Brucker *et al.*,2008).

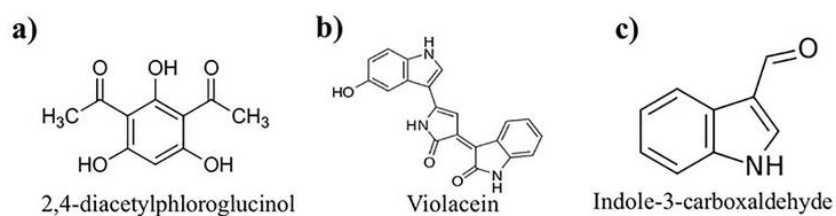


Figura. 4

Metabolitos antifúngicos (a) 2,4-diacetilclorclorucinol producido por *Lysobacter gummosus*, (b) indol-3-carboxaldehído y (c) violaceína producida por *Janthinobacterium lividum*. (Romero *et al.*, 2021).

Las propiedades antifúngicas de las bacterias presentes el microbioma propio de las ranas ha sido estudiados mediante bioensayos elaborados por Bresciano *et al.*, (2015) en Ecuador y Catenazzi *et al.*, (2018) en Perú, donde demuestran las propiedades antifúngicas al estudiar el efecto de estos compuestos en la tasa de crecimiento de *B. dendrobatidis*. Estos autores pudieron encontrar, en ambos países bacterias pertenecientes a los géneros *Janthinobacterium*, *Pseudomonas* y *Serratia*.

Los resultados de la investigación de Catenazzi *et al.*, (2018) donde se aislaron bacterias cultivables de ocho especies de ranas y analizaron su potencial de inhibición de *B. dendrobatidis* demostraron que la bacteria con más probabilidad de inhibición con un 78.04% fue *Pseudomonas entomophila*, mientras que otras especies de este mismo género que no fueron identificadas presentaron una probabilidad de inhibición de 55,96 %.

Burkart *et al.*, (2017), concuerdan que *Pseudomonas* es el género más común aislado de todas las especies de ranas estudiadas. De esta manera *Gastrotecha excubitor* reporta la mayor biodiversidad de bacterias cultivables registrada hasta la fecha por esta razón esta especie es más resistente a la infección por *B. dendrobatidis*, y por lo tanto, existe una mayor resistencia a Chyt.

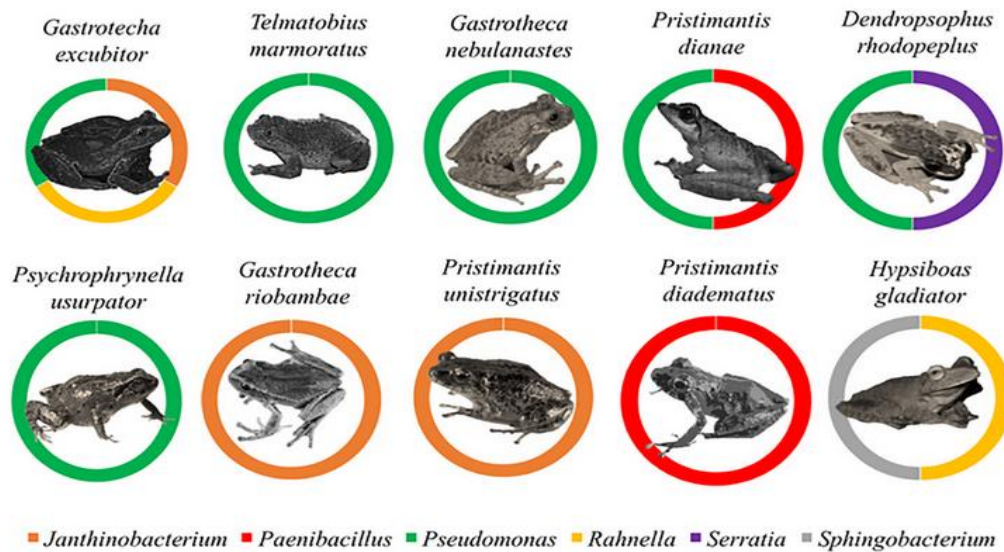


Figura 5. Prevalencia de la biodiversidad bacteriana en el microbioma cutáneo de anfibios andinos. *Pseudomonas* se encuentra en la mayoría de las especies de ranas estudiadas (en color verde) y las especies de *Gastrotheca excubitor* tienen una biodiversidad bacteriana más cultivable (Romero *et al.*, 2021).

1.5 *Batrachochytrium dendrobatidis* en Ecuador

Una de las posibles causas en el descenso de las poblaciones de anfibios en Ecuador se debe a la infección provocada por quitridiomycosis. El dato más antiguo de la presencia del este patógeno para Sudamérica es un estudio realizado por Lips *et al.*, (2008), en la provincia de Cañar en 1980 en Ecuador, donde se evaluó un *Atelopus bomolochos*, teniendo como resultado que *B. dendrobatidis* es un patógeno introducido en América del Sur a fines de la década de 1970 y principios de 1980. Estos datos son un claro ejemplo de que el quítrido ha estado presente en las poblaciones silvestres mucho antes de que el problema de las declinaciones de anfibios sea notable en Ecuador.

Harvell *et al.*, (2002) señalan que factores como la temperatura, la humedad y la lluvia afectan a la biología de los anfibios, estos factores podrían afectar también el crecimiento, la persistencia y la ecología de un patógeno potencial. Los cambios climáticos regionales o locales podrían afectar el desarrollo, las tasas de supervivencia, la transmisión de enfermedades y la susceptibilidad del huésped, de esta manera Piotrowski *et al.*, (2004), afirman que hay una influencia en el grado de respuesta de la población huésped. De la misma forma en la que factores como la temperatura y la humedad afectan a los anfibios, pueden afectar de gran manera la biología básica del *B. dendrobatidis*. Ya que, en sus estudios de laboratorio

realizados, el crecimiento óptimo de *B. dendrobatidis* ocurre entre 17 y 25 °C, y la muerte ocurre a temperaturas superiores a 29 °C o inferiores a 0 °C, o después de una desecación prolongada. **Ron, (2005)** concuerda con dichos resultados de laboratorio ya que se reflejan a sus estudios de campo realizados en Australia, Panamá, Sudáfrica y el oeste de los EE. UU, donde menciona que la prevalencia de la infección tiende a variar según la estación, la elevación o la región, con una mayor prevalencia asociada con temperaturas más frías y condiciones de humedad (**Woodhams et al., 2003; Kriger K y Hero J, 2007**).

Este hongo también ha sido reportado por **Ron y Merino, (2000)** en un estudio realizado en las provincias de Azuay y Carchi, en especies de *Atelopus ignescens*, *Telmatobius niger*, *Gastrotheca pseustes* y *Hyla psarolaima*; dando como resultado que las especies, *A. ignescens*, *A. bomolochos* y *T. niger*, han mostrado declinaciones poblacionales y la causa sugerida es la quitridiomycosis.

Así mismo **Korfel, (2012)**, reportó que en el Parque Nacional “El Cajas”, en la provincia del Azuay que tiene un rango altitudinal aproximado de 2500 a 4200 m.s.n.m, donde identificó *B. dendrobatidis* en renacuajos de *Gastrotheca pseustes* con una prevalencia del 7.9%, del mismo modo **Narváez, (2021)**, en su investigación realizada en el Parque Metropolitano Guanguiltagua de Quito que posee elevaciones que oscilan entre los 2700 y 3000 m.s.n.m, dio como resultado que en renacuajos de la rana marsupial andina (*Gastrotheca riobambae*) se obtuvo una prevalencia de 39% (aparatos bucales) y en Cutines de Quito (*Pristimantis unistrigatus*) la prevalencia fue de 15% (hisopado de piel); es así como este hecho indica que el hongo puede crecer fuera del rango considerado óptimo para su crecimiento y por lo tanto subsiste en los Andes ecuatorianos.

1.6 Clasificación de la clase amphibia

Los tres órdenes de anfibios vivos hoy en día son: los Gymnophiona, el Urodela, y el Anura, son altamente especializados y tienen modificaciones en gran medida el plan corporal de los antiguos anfibios (**Wright, 2006**).

1.6.1 Gymnophiona o apoda.

Sus miembros son conocidos como cecilias, nombre derivado de la palabra latina *caecus*, que significa “sin vista” o “ciego”. La mayoría de este grupo de anfibios parecidos a gusanos y sin extremidades vive bajo tierra en regiones tropicales húmedas de todo el mundo (**Británica, 2021**).

Las cecilias se parecen superficialmente a las lombrices de tierra además que carecen de extremidades, la mayoría están fuertemente anilladas y tienen cabezas muy osificadas en forma de cuña y colas romas que reflejan el estilo de vida de madriguera de estos anfibios tropicales. Algunas están débilmente anilladas y son acuáticas (**Vitt y Caldwell, 2014**).

1.6.2 Caudata o urodelos

Las salamandras tienen un diseño corporal básico parecido a un lagarto, con un cuerpo alargado sostenido por cuatro extremidades y una cola larga. Todas las salamandras modernas han perdido uno o más dedos de los pies, y algunas especies y familias tienen extremidades considerablemente reducidas (**Vitt y Caldwell, 2014**). Las salamandras son ecológicamente diversas. Algunos son totalmente acuáticos, algunos excavan madrigueras, muchos son terrestres y muchos otros son arbóreos y viven en epífitas en el dosel del bosque (**Wright, 2006**).

1.6.3 Anura o salientia.

Se diferencian de otros vertebrados en que tienen cuerpos robustos, sin cola, con cabeza y cuerpo continuos y extremidades bien desarrolladas. Las patas traseras suelen tener casi el doble de la longitud del cuerpo y su morfología refleja su locomoción saltatoria bípeda. No todas las ranas saltan ya que algunas son totalmente acuáticas y usan una patada sincrónica de las patas traseras para propulsarse, mientras que otros simplemente caminan en sus hábitats terrestres y arbóreos. Entre los anfibios, las ranas son el grupo más rico en especies y más ampliamente distribuido (**Vitt y Caldwell, 2014**).

1.7 Anfibios en Ecuador

Hasta mayo del 2021 en Ecuador se describieron formalmente 653 especies de anfibios, es decir es el cuarto país con mayor diversidad de anfibios a nivel mundial. Esta cantidad es sorprendentemente alta y aumenta de manera rápida ya que hay un gran número de especies descubiertas cada año. Inclusive se proyecta que los descubrimientos de nuevas especies se aceleren como producto del uso cada vez más generalizado de marcadores genéticos en la sistemática de los anfibios (**Anfibios del Ecuador, 2021**).

Las provincias amazónicas cuentan con la mayor riqueza de especies, entre estas las más diversas son: Napo, Morona Santiago y Pastaza. Tal es así que la diversidad de la provincia del Napo (210 especies) sobrepasa la de países enteros como Argentina, Paraguay, Uruguay, Chile,

(**Amphibiaweb, sf**). En las provincias de la sierra en cambio están: Pichincha (144), Carchi (95), Imbabura (92) y Cotopaxi (79), las cuales ocupan los primeros lugares en cuanto a especies de anfibios (**Anfibios de Ecuador, 2021**).

1.7.1 Descripción de *Gastrotheca riobambae*

Taxonomía

Reino: *Animalia*

Phylum: *Chordata*

Clase: *Amphibia*

Orden: *Anura*

Familia: *Hemiphractidae*

Género: *Gastrotheca*

Especie: *Gastrotheca riobambae*

(**IUCN, 2008**)

Características de *Gastrotheca riobambae*



Figura.6 Adulto de *Gastrotheca riobambae* (**Ron et al., 2021**).

Gastrotheca riobambae es una rana arbórea, de tamaño mediano a grande, tiene un cuerpo robusto, su hocico es redondo y sobresale sobre la mandíbula. La cabeza es algo más ancha que larga. La distancia interorbitaria es igual a la distancia ojo-fosa nasal, aproximadamente el 120% del ancho del párpado. Extremidades anteriores moderadamente robustas y sus dedos índice y medio tienen la misma longitud y terminan en pequeños discos que son solo un poco

más anchos que los dedos. La tibia es más corta que el pie en alrededor del 41% de la longitud hocico-cloaca (**Duellman y Hillis, 1987**). Sus pies son palmeados y terminan en garras (**Haas, 2003**). Su piel es una mezcla areolada y lisa con algunos parches de piel granular (**Duellman y Hillis, 1987**). Ausencia de pliegues y tubérculos cloacales, la apertura del marsupio estrechamente en forma de U, con el borde anterior de la abertura posteriormente al nivel del sacro (**Ron y Merino, 2021**).

En estos anfibios el dimorfismo sexual permite diferenciar a machos y hembras, poseen una bolsa con la entrada a la parte posterior del dorso, en cambio los machos en el momento del canto se infla un saco gular. Además, poseen dos fases de colores: café y verde, pero hay muchos individuos con la mezcla de estas dos fases, con colores uniformes o con rayas a lo largo del dorso morfológicamente se distinguen por el tamaño, las hembras (6.5 cm) suelen ser relativamente más grandes que los machos (5cm), (**Duellman K et al, 2010; Coloma, 2006**).

Al momento de la incubación, se desarrolla un delgado revestimiento muy irrigado por vasos sanguíneos en las paredes de la bolsa marsupial, de esta manera este “tapiz”, se acopla a la forma de los huevos, donde el embrión va a desarrollar una membrana vascular propia que le permitirá estar en contacto directo con la madre por medio de un conjunto de branquias especializadas, por las cuales se establece un intercambio de gases, líquidos y nutrientes además de la eliminación de desechos (**Duellman et al, 2001, 2005**). Los renacuajos se caracterizan por ser de desarrollo libre, en el cual completan su metamorfosis en alrededor de dos o tres meses dentro del agua. Las ranitas emergen del agua y de estos los machos juveniles comienzan a cantar dos meses después (**Duellman et al, 2001**).

1.7.2 Distribución de *G.riobambae*

Esta especie es endémica de Ecuador donde tiene un rango geográfico y altitudinal muy amplio. Esta especie está restringida a los Andes y valles interandinos en el norte y centro de Ecuador desde Imbabura al sur hasta Chimborazo. Su rango altitudinal es de 2.200 a 3.500 m.s.n.m (**Coloma et al., 2004**).

Puede vivir en bosques húmedos, en zonas agrícolas y eventualmente en los bosques secos del callejón interandino. Se las puede observar cerca de plantas tales como bromelias, plantas de *Agave* y plantaciones de maíz. El hábitat con el ser humano es compartido, generalmente cerca de lugares que contienen fuentes naturales de agua, en áreas de bastante humedad e irrigación. Los adultos habitan bajo piedras o en aglomeraciones de plantas. Estos lugares son preferidos para esconderse durante el día y salir en la noche cuando tienden a bajar a lugares cerca del agua (**Coloma et al., 2004**).

Suelen encontrarse junto a fuentes de agua como canales de riego, pozas, riachuelos, lagunas o ciénagas.

También ha sido registrada en Machachi (provincia Pichincha), Lasso (provincia Cotopaxi), Sigchos (provincia Cotopaxi), Ambato (provincia Tungurahua), Guaranda (provincia Bolívar) y en la laguna de Colta (Provincia de Chimborazo) en simpatría y sintopía con otra especie *Gastrotheca pseustes* (Chasiluisa *et al.*, 2021).

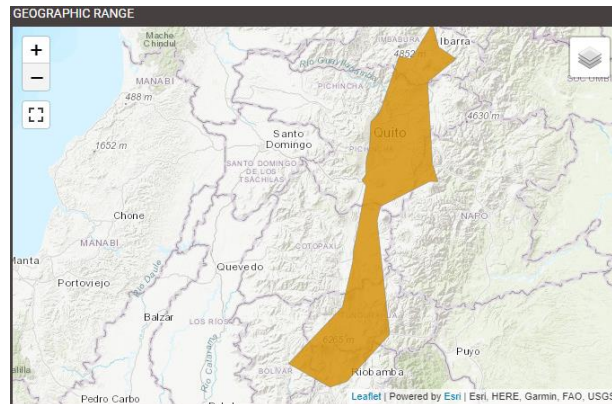


Figura 7. Rango Geográfico de distribución de *Gastrotheca riobambae* (IUCN. 2008; BerkeleyMapper. 2022).

1.7.3 Estado de conservación

- Lista Roja Anfibios del Ecuador: **Vulnerable**
- Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN: **En peligro**

(Chasiluisa *et al.*, 2021).

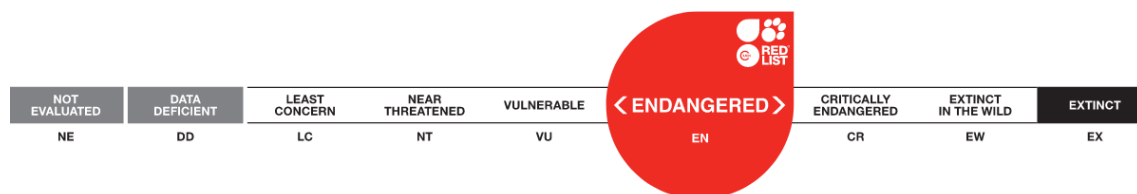


Figura 8. Estado de conservación de *Gastrotheca riobambae*, donde se la cataloga como **En Peligro** debido a una drástica disminución de la población estimada en más del 50% en las últimas tres generaciones (Coloma *et al.*, 2004; IUCN. 2008).

1.8 Técnicas de detección de *Batrachochytrium dendrobatidis*

Para tener un control adecuado de la enfermedad es fundamental una pronta identificación del patógeno ya que la mayoría de las especies sensibles a esta infección pueden presentar signos además, varias de estas infecciones se dan de manera subclínica, como consecuencia los animales infectados pueden actuar como una fuente de infección para las especies más vulnerables, de esta manera un mejor control ayudaría a evitar la dispersión del patógeno dentro de una colección (**Pessier y Mendelson, 2017**).

1.8.1 Histología

Kruger et al., (2006), refieren que esta técnica es considerada como un método de baja sensibilidad para la detección de *B. dendrobatidis* en anfibios.

Este tipo de técnica se aplica a muestras de piel y mudas de animales muertos, también en cortes de dedos, que se encuentran preservadas en formalina o etanol, y en tejidos del disco oral en el caso de renacuajos. Se deben obtener cortes de 5 µm los que se puede teñir con eosina o hematoxilina. Pueden encontrarse tallos vacíos y septados, además formas esféricas de los zoosporangios en el estrato córneo y papilas de descarga. Las zoosporas suelen ser basófilas y las paredes del zoosporangio eosinófilas. La hiperqueratosis es una respuesta no específica del huésped que se observa en una variedad de enfermedades de la piel, pero que se asocia con la infección por *B. dendrobatidis*, se pueden observar además hiperplasia y diferentes grados de inflamación y degeneración (**Pessier et al., 1999; Pessier y Mendelson 2017; OIE 2021**).

1.8.2 Citología y análisis de un montaje húmedo.

Mediante el raspado cutáneo de la muda de piel de la rana se puede tener una muestra que nos permita la identificación del hongo en un microscopio. Para llevar a cabo esta técnica es necesario colocar la muestra en un portaobjetos y adicionar 1 o 2 gotas de solución salina o agua y se procede a colocar el cubreobjetos. Esta muestra puede ser teñida con varios tintes que nos permitirán tener una visualización más clara, se puede utilizar azul de lactofenol, hidróxido de potasio al 10%, rojo congo o DipQuick. En estas muestras se podrán observar esporangios intracelulares con formas redondas u ovaladas que en mayor frecuencia suelen observarse vacíos, pero también se pueden encontrar tallos con zoosporas y con el septo interno (**Pessier y Mendelson 2017; OIE, 2021**).

1.8.3 Aislamiento microbiológico

El proceso se puede realizar a través de muestra del disco oral de renacuajos, anfibios muertos o moribundos. Se inicia con un examen microscópico con porciones delgadas de piel, donde se observan las células epidérmicas en busca de esporangios y se las coloca en medio de cultivo mTGh (Tryptona, Hidrolizado de gelatina, Agar) con antibióticos.

Posteriormente las muestras de piel se vuelven a colocar con mTGh y se incuban en una temperatura estimada de 17 a 23°C. El crecimiento se puede observar en un tiempo estimado de 2 semanas a 1 mes. Las colonias obtenidas pueden ser transferidas a un medio con Tryptona al 1% y para generar stocks que se mantienen a una temperatura de 5°C, estos pueden permanecer viables en estas condiciones durante cuatro meses (**Blaustein et al., 1994; Berger et al., 2005**).

1.8.4 Biología molecular: amplificación y detección de ácidos nucleicos

Las técnicas de biología molecular son apropiadas para su uso en anfibios en cuarentena, en estudios de prevalencia de poblaciones libres o que son parte de una colección y que pueden ser candidatas para reintroducción de especies. Las muestras para este estudio pueden ser tomadas mediante la técnica de hisopado, baños de inmersión, cortes del aparato bucal en renacuajos, o a su vez muestras de tejido (dedos del pie). Entre todas estas técnicas la que se prioriza es el hisopado ya que es una técnica menos invasiva (**Pessier y Mendelson 2017**).

Annis et al., (2004) desarrollaron primers específicos para *B. dendrobatidis*, a partir de los primers universales de secuenciación para hongos en las regiones ITS5 e ITS4 (**White et al., 1990**), los cuales reconocen las regiones conservadas entre los genes 28S y 18S de ARNr. Estos fueron usados para amplificar el gen 5.8S ARNr y el espacio interno transcrito (ITS) con las regiones ITS1 y ITS2 para el quítrido *B. dendrobatidis* y otros géneros de quitridos. Demostrando que los primers funcionan y amplifican específicamente una banda de aproximadamente 300 pares de bases correspondiente a *B. dendrobatidis*.

En el mismo año **Boyle et al., (2004)** implementaron un ensayo de PCR en tiempo real o cuantitativo (q-PCR) la cual resultó muy útil para detectar infecciones leves en fases iniciales y con el cual se puede detectar y cuantificar con precisión una zoospora en una muestra diagnóstico (tejido o swab).

Asimismo, **Hellicar et al., 2015**, menciona que (q-PCR) utiliza la combinación de varias muestras de DNA en una, lo que permite una mayor sensibilidad en estudios cualitativos donde la presencia/ausencia es más crítica que la cantidad en etapas iniciales de infección.

1.9 Tratamiento y gestión.

Mutschmann (2015); Van Rooij et al., (2015), mencionan que el primer paso para mitigar esta enfermedad es su correcta identificación, realizar un diagnóstico a primera vista es posible ya que hay varios signos clínicos observables como: úlceras, bajo peso, desprendimiento de piel, letargia, los cuales son característicos de esta enfermedad.

Woodhams et al., (2011) ; Woodhams et al., (2012); Scheele et al., (2014) ; Garner et al., (2016), mencionan que existen tratamientos con agentes antifúngicos, es decir con fármacos o bacterias simbióticas antifúngicas, lo que podría ayudar en la reducción del impacto de quitridiomycosis, además de un tratamiento del medio ambiente con antifúngicos y la reducción de la densidad de huéspedes. No obstante, ensayos de campo realizados con anterioridad indican que el beneficio se da a corto plazo para las poblaciones afectadas y una efectividad limitada para prolongar la esperanza de vida en anfibios afectados. Lo que concuerda con la investigación realizada por **Knapp et al., (2022)**, donde realizaron experimentos donde incluyeron tratamientos con itraconazol en diferentes etapas del desarrollo de los anfibios; en etapas tempranas de la vida (renacuajos en etapas tardías y subadultos) se instauró un tratamiento solo con itraconazol, de manera similar en anfibios adultos el tratamiento fue de itraconazol y por último un tratamiento de itraconazol junto a un aumento del microbioma de la piel con *Janthinobacterium lividum* en subadultos (bacteria comensal con propiedades antifúngicas). Como resultado se pudo observar que los tratamientos con itraconazol causaron reducciones inmediatas en la carga de *B. dendrobatidis* y se obtuvieron efectos a largo plazo que difieren entre las etapas de la vida. Sin embargo, la carga de *B. dendrobatidis* en las etapas tempranas de la vida regresaron a los niveles previos iniciales en menos de 1 año, así mismo, el tratamiento en adultos aumentó la tasa de supervivencia de las ranas, y a pesar de esto la población disminuyó críticamente posterior al tratamiento de 3 años, por otra parte en el tratamiento de aumento en el microbioma se observó el aumento de *J. lividum*, no obstante dichas concentraciones disminuyeron al cabo de 1 mes y por lo tanto disminuyó su efecto protector. En resumen, todos los tratamientos de mitigación fueron nulos para obtener cambios en un largo periodo de tiempo.

De esta manera **Drawert et al., (2017)** sugiere que es probable que ningún tratamiento sea efectivo para combatir la reducción poblacional que este patógeno causa, sin embargo, la reducción de las cargas de *B. dendrobatidis* en huéspedes individuales puede tener el mayor

potencial para producir un resultado beneficioso. Dada la incertidumbre con respecto a la efectividad de las medidas de mitigación, existe una necesidad crítica de ensayos de campo adicionales.

Es importante mencionar que el tratamiento con Itraconazol es el más utilizado en animales con signología clínica, infecciones subclínicas y sobre todo como tratamiento preventivo. La solución de Itraconazol al 0,01% puede ser diluido tanto en solución salina al 0,6%, en solución de Ringer para anfibios o incluso en agua local, pero es importante recalcar que debe evitarse su uso en postmetamorfos y renacuajos (**Baitchman y Pessier 2013; Pessier y Mendelson 2017**).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Ubicación del estudio y unidad de análisis

Desde 1998, se llevan a cabo estudios que permitan determinar la naturaleza, magnitud y causas de las declinaciones poblacionales y extinciones de anfibios de los Andes ecuatorianos (Coloma, 2006). A pesar de que anfibios y reptiles son elementos clave en la salud de los ecosistemas Retallick *et al.*, 2004 añaden que el desconocimiento generalizado de la sociedad acerca de los anfibios ha permitido que la situación crítica de sus poblaciones no alcance el grado de preocupación conservacionista que existe en la sociedad respecto a otras especies más emblemáticas.

Gastrotheca riobambae es considerada una especie de rana muy común en zonas andinas, sin embargo, su población ha disminuido debido al crecimiento urbano, cambios climáticos, presencia de patógenos, entre otros y a pesar de ser una especie tolerante a modificaciones de hábitat, sus poblaciones se restringen a zonas con remanentes de vegetación natural (Amphibiaweb,2018). Debido a estos aspectos de conservación de anfibios y hábitats las muestras se obtuvieron de los sectores del Cantón Latacunga, Provincia de Cotopaxi, la misma que se encuentra ubicada al noreste de la Ciudad de Latacunga. Se encuentra a 9.1 kilómetros de distancia de la cabecera provincial, a una altura de 2948 metros sobre el nivel del mar. Sus coordenadas geográficas son -0.89905125, -78.600918.

La zonas específicas de estudio escogidas fueron en Belisario Quevedo (sus coordenadas geográficas son -0.962806, -78.594406), Juan Montalvo (sus coordenadas geográficas son -0.900921, -78.605251), San Buenaventura (sus coordenadas geográficas son -0.886293, -78.608960), ya que a pesar de encontrarse dentro del casco urbano de la ciudad; mantiene zonas con vegetación y condiciones naturales que permiten que este tipo de ranas se reproduzcan y no se pierda por completo las poblaciones endémicas (Manzano,2010).

2.2 Solicitud del permiso de investigación.

El diagnóstico de quitridiomycosis propuesto en este trabajo por medio de una técnica de biología molecular que implica la utilización de ADN, requiere según la normativa del país la obtención de un Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos emitido por la autoridad

competente, en este caso el Ministerio del Medio Ambiente, Agua y Transición Ecológica. Dicho contrato se encuentra registrado con código Nro. MAATE-CMARG-2022-0718.

2.3 Alcance

Para esta investigación se tomó en cuenta el alcance de tipo descriptivo ya que se enfoca en describir las características generales de la distribución de un fenómeno, estos estudios describen las variables en los sujetos en un corto periodo de tiempo. En un estudio descriptivo el investigador selecciona una serie de variables y después recaba información sobre cada una de ellas, para así representar lo que se investiga (describirlo o caracterizarlo) (**Hernández Sampieri, 2018**).

2.4 Diseño

Esta investigación tiene un diseño no experimental, transeccional. No experimental porque se realiza sin manipular deliberadamente las variables, lo que se hace en este tipo de investigación es observar los fenómenos tal y como se dan en su contexto natural, es decir no se pueden manipular las variables, los datos a reunir se obtendrán de los individuos de cada zona muestreada y transeccional ya que la recolección de los datos se da en un solo momento, en un tiempo único. (**Cortés y Iglesias 2004**).

Para prospección de área se emplearon 10 salidas, en los meses de noviembre y diciembre en los cuales se realizó la elección de los sitios de muestreo, en estos días se recorrieron diferentes puntos (lotes baldíos, zonas pantanosas, lugares con presencia de pastizales agrícolas, filos de acequias, reservorios naturales de agua), tomando en cuenta sectores que posean extensiones más amplias de terreno, y con información recabada de los pobladores de los lugares, que comentaban donde era más común escuchar ranas cantando, por lo cual se eligieron los sectores de Belisario Quevedo (T1), Juan Montalvo (T2), San Buenaventura (T3). El canto de *G. riobambae* es único, y sus llamados para encontrar pareja son específicos para cada especie al igual que las respuestas fonotácticas (respuestas a estímulos auditivos) de las hembras reproductivas, por lo tanto, en anuros el canto constituye el mayor mecanismo de aislamiento reproductivo previo al apareamiento (**Littlejohn y Watson 1974**). Para el conocimiento y diferenciación de canto se tomó como referencia las vocalizaciones grabadas y registradas que se pueden obtener de la página de BOWEB el cual es el mayor repositorio de información de la biodiversidad ecuatoriana. Da acceso a una base de datos de 9000 fichas de especies y casi

medio millón de especímenes de flora, fauna y hongos. Además, presenta especímenes digitalizados, mapas de distribución e información general de la biodiversidad. También da acceso a una enorme biblioteca de elementos multimedia incluyendo más de 280000 imágenes. Siga los enlaces para acceder a esos contenidos (**Bioweb. sf**)

2.5 Toma de muestras

Se realizó una toma de muestras mediante un método no probabilístico por conveniencia. No probabilístico porque se seleccionan individuos o casos típicos sin intentar que sean estadísticamente representativos de una población determinada. En las muestras no probabilísticas, la elección de las unidades no depende de la probabilidad, sino de razones relacionadas con las características y contexto de la investigación. Aquí el procedimiento no es mecánico o electrónico, ni con base en fórmulas de probabilidad, sino que depende del proceso de toma de decisiones de un investigador (**Hernández Sampieri ,2018**). Y por conveniencia porque estas muestras están formadas por los casos disponibles a los cuales tenemos acceso (**Battaglia, 2008**).

2.6 EQUIPOS Y MATERIALES

Materiales fase de campo

- **Biológicos**
 - Anfibios premetamórficos y adultos
- **Reactivos y soluciones**
 - Gel desinfectante de manos.
 - Alcohol al 70%
- **Otros materiales**
 - Hisopos MW100 (Medical Wire and Equipment Co, Durham, North Carolina, USA)
 - Guantes de nitrilo
 - Linterna
 - Botas
 - Redes de malla
 - Cubrebocas
 - Calibrador
 - Libreta de registro

- Cooler para el transporte.

2.7 Época de muestreo

La época de muestreo también es muy importante ya que esta se llevó a cabo en una temporada de lluvia según lo mencionado por **Gallardo, (1979)**, donde reporta que las épocas de reproducción de los anfibios se hallan en coincidencia con las épocas de lluvia, lo que resulta de vital importancia en un área relativamente seca. Los anfibios salen de los refugios solamente en las épocas de lluvias, y algunas presentan formas cavícolas (ocultamiento bajo tierra, donde permanecen hasta que se produzcan las lluvias). Tal sería la adaptación de *G. riobambae*, puesto que se pueden registrar renacuajos durante todos los meses del año, pero la mayor parte de las reproducciones parecen ocurrir en la época más lluviosa (**Del Pino, 1980; Ramírez, 2008**)

La distancia efectiva para encontrar ranas visualmente es aproximadamente de 1 a 3 metros a cada lado de la vereda, dependiendo de la densidad de la vegetación. También debe intentarse identificar la especie al momento que se localiza. En algunos casos puede ser posible identificar a un animal al nivel de especie y determinar el sexo sin necesidad de capturarlo, pero más frecuentemente será necesario capturar la rana para determinar el sexo y en muchos casos, para determinar la especie (**Lips K y Reaser J. 2001**).

2.8 Área de estudio

Dos localidades (T1 y T2) presentaron una estructura vegetal similar por lo que parecería haber una preferencia por sustrato en hojas aledañas a cuerpos de agua y acequias que cruzan por ahí por parte de las ranas de *G.riobambae*, posiblemente por evitar el contacto con animales que pastan. En este caso el hábitat se compone de césped, hojarasca, hierbas, dentro de una zona ganadera y cerca de ella. A diferencia de T3 la cual no se encontró cerca de una zona ganadera, lo que se pudo observar fue vegetación remanente dentro de los cenagales, donde estos animales se pueden refugiar, buscar alimento y reproducirse. Las tres localidades se encuentran en un área con cierto grado de perturbación antrópica por lo que *G.riobambae* prefiere perchar en las zonas más alejadas de las trochas usadas por pobladores locales.

2.9 Técnicas de medición

En los transectos que se trazaron para el monitoreo se aplicaron técnicas estandarizadas para anfibios como el método de relevamiento por encuentros visuales descrito por **Rueda et al., (2006)** quienes mencionan que es una búsqueda de desplazamiento lento y constante, donde se va revisando toda la vegetación, piedras, rocas y diferentes lugares que puedan servir como refugio a los especímenes dentro de un hábitat determinado. Además, se evitó recoger las muestras cerca de caminos y trochas usadas por pobladores locales debido a que influyen positiva o negativamente en la presencia de varias especies de anfibios dándonos una visión distorsionada de la realidad, por lo que se debe evitar evaluarlos. También se utilizó el método de puntos auditivos fijos descritos por **Rand y Drewry (1994)**, donde menciona que se debe inspeccionar cada localidad (charcas, acequias y riachuelos) dependiendo de las emisiones acústicas donde se escuchen machos vocalizando. Se ha descubierto que el método es más eficiente y preciso si una persona hace las observaciones mientras que la otra registra toda la información. Las tareas pueden alternarse de un inventario a otro (**Lips K y Reaser J. 2001**).

2.10 Toma de Muestras de ranas adultas de *Gatrotheca riobambae*

Antes de iniciar las capturas todo el equipo (botas, redes de malla, cooler, libretas), se desinfectaron con alcohol al 70%. Una vez que fueron designados los diferentes puntos donde se tomarán las muestras, que en su mayoría fueron lugares que contienen fuentes de agua en áreas de bastante humedad e irrigación, como es el caso de la parroquia Belisario Quevedo y Juan Montalvo (T1 y T2) ya que era una zona agrícola con presencia de animales en pastoreo, además se revisaron sectores con aglomeraciones de plantas y presencia de zonas pantanosas como en la parroquia San Buenaventura (T3) ya que estos lugares son preferidos para que los anfibios puedan esconderse durante el día y salir en la noche (**Coloma et al., 2004**). Las muestras se recolectaron desde las 09:00 de la mañana hasta las primeras horas de la noche, este lapso no es el recomendable para la toma de muestras, más sin embargo fueron días de bastante lluvia en el sector por lo que fue muy favorable para la toma de muestras ya que se escuchaban machos vocalizando y fue de gran ayuda para la toma de muestras.

Para el diagnóstico de quitridiomycosis, cada uno de los individuos fue capturado siguiendo los protocolos de uso de animales aprobados y las restricciones de permisos estatales (**Berger et al., 1998; Nichols et al., 2001**). En la manipulación de estos animales no es aconsejable el uso

de guantes que contengan talco, ya que estos pueden irritar la piel del anfibio. Es recomendable el uso de guantes de vinilo y nitrilo, ya que se ha demostrado que el látex es tóxico para los embriones de rana y los renacuajos (**Gutleb, 2001**).

Para la manipulación se utilizaron guantes de nitrilo, y se cambiaron todos los guantes, bolsas de plástico, hisopos en cada manipulación para de esta manera minimizar completamente la contaminación cruzada (**Hyatt, 2007**).

En relación con la toma de muestras, estas fueron tomadas según el método de hisopado, el cual consiste en deslizar un hisopo estéril (MW100, Medical Wire and Equipment Co, Durham, North Carolina, USA) de 5 a 8 veces sobre la superficie ventral, la ingle, las piernas y las membranas interdigitales del anfibio, aplicando cierta presión sin lastimar al animal (**Hyatt, 2007**).

2.11 Foto identificación

Además, se empleó la foto-identificación descrito por Donnelly *et al.*, (1994) todos los individuos capturados fueron fotografiados con el fin de utilizar los patrones de coloración y manchas en el dorso y flancos, evitando así marcarlos con el método de amputación de dedos, los cuales podrían presentar efectos adversos (**Clarke, 1972; citado en Donnelly et al., 1994**). Este tipo de identificación ha sido probado con éxito en estudios poblacionales de anfibios (**Gross, 2009; Yáñez-Muñoz et al., 2010**). La foto-identificación de individuos se la realizó con la cámara de teléfono Samsung A22, **Ramírez, (2008)** menciona que los diferentes patrones de coloración le permiten a esta rana camuflarse perfectamente en el hábitat y al parecer escoge los sitios de acuerdo con su coloración, adoptando diferentes posturas según sea su requerimiento. Los cambios en su coloración son evidentes y es posible que la tonalidad oscura se relacione con la humedad y/o la ausencia de luz, y en sitios claros, su coloración sea verdosa.

Las muestras de hisopos fueron conservadas a una temperatura de 4°C con la ayuda del cooler hasta su llegada al laboratorio, donde se guardaron en el congelador a -20 °C aproximadamente hasta su análisis (**OIE, 2019**).

2.12 Toma de Muestras de renacuajos de *Gastrotheca riobambae*.

En estas tres localidades (T1, T2 y T3), se evaluaron todos los cuerpos de agua permanentes, ya que estos son el sitio vital para el desarrollo de los renacuajos, durante los 3 días que duró el

muestreo por cada localidad escogida, se evaluaron las charcas de agua que se forman después de la lluvia, además de acequias, las cuales se observó que eran drenadas rápidamente en 1 o 2 días, estos pequeños cuerpos de agua son el sitio vital para el desarrollo de los renacuajos y tomando en cuenta el estadio de desarrollo óptimo para la toma de muestras se decidió por escoger las pozas que tenían una mayor profundidad y renacuajos en estadios diferentes, pero para esta investigación se recolectaron los que morfológicamente se encontraban en estadios avanzados de desarrollo Anexo 3.

Para la captura de los renacuajos se utilizaron redes de malla con agujeros moderados y mangos de madera para atrapar varios renacuajos por poza, se muestreo 1 poza por localidad, tomando en cuenta el estadio de desarrollo de los renacuajos entre 26 y 46 según lo sugerido por **Gosner (1960)** en el libro de **Duellman & Trueb (1994)**. Las muestras se tomaron introduciendo el hisopo en las piezas bucales de los renacuajos, y girándolos de 5 a 7 veces. Una vez tomadas las muestras, los hisopos fueron almacenados y rotulados con un código único para cada renacuajo. Una vez terminado el muestreo todos los individuos fueron colocados en un recipiente de plástico para la toma de medidas, se utilizó un calibrador (pie de rey), se consideró la medida de longitud de los renacuajos desde la punta de la boca hasta la punta de la cola, posteriormente todos los renacuajos fueron liberados y todo el equipo se desinfectó con alcohol al 70% después del contacto (**Hyatt A, 2007**).

Las muestras se almacenaron en una refrigeradora (2-4 °C), hasta su transporte al Laboratorio Molecular Museo de Zoología (QCAZ) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, en Quito.

2.13 Detección de Quitridiomycosis

Extracción de ADN

Se extrajo ADN de las muestras de los hisopos de los aparatos bucales de renacuajos y de los hisopos provenientes de la piel de adultos de *G. riobambae*.

2.13.1 Procesamiento de las muestras biológicas colectadas y extracción del ácido

desoxirribonucleico total de las muestras tomadas en renacuajos y anfibios adultos.

Materiales

➤ **Biológicos**

- Hisopados de renacuajos y adultos de *G.riobambae*

➤ **Reactivos**

- Perlas de Zirconia (0.5 mm diameter, Biospec Products)
- Buffer prepman Ultra (Sample Preparation Reagent. Applied Biosystems)

➤ **Equipos y otros**

- Balanza Analítica
- Tubos Eppendorf 1.5 ml
- Tubos eppendorf 0.5 ml
- Micropipetas
- Puntas para pipetas
- Guantes
- Vortex
- Centrífuga
- Incubadora
- Refrigerador

Métodos

- 1) Se procedió a rotular los tubos eppendorf de 1.5 ml de acuerdo con cada código único por rana adulta y renacuajo, basándonos en el hisopo utilizado.
- 2) En cada tubo se pesó de 0.02 a 0.03 g de perlas de zirconia en los tubos de 1.5 ml.
- 3) A continuación, se procedió agregar 50 μ m de buffer PrepMan Ultra, con la ayuda de una micropipeta.
- 4) Seguido a esto en cada tubo se añadieron los hisopos en el interior del tubo eppendorf de 1.5ml, para esto se cerró la tapa y con ligeros movimientos intentamos romper el hisopo hasta que la punta de algodón quede en contacto con los reactivos anteriores.
- 5) Después se vortearon todas las muestras por alrededor de 2 minutos, procurando que las perlas de zirconia estén en contacto con la punta del algodón.
- 6) Una vez que las muestras estén listas se centrifugaron a 1300 rpm por 2 minutos.

- 7) Mientras las muestras se encontraban en la centrífuga, se procedió a precalentar el termobloque a 92°C. Una vez culminada la fase de centrifugación se añaden los tubos a la incubadora durante 10 minutos.
- 8) Simultáneamente al paso anterior se rotularon tubos eppendorf de 0.5 ml con los códigos únicos de cada muestra.
- 9) Se dejaron enfriar las muestras por alrededor de 5 minutos a temperatura ambiente.
- 10) Una vez transcurridos los 5 minutos, se volvió a centrifugar a 1300 rpm por 8 minutos.
- 11) El sobrenadante obtenido, se transfirió a los tubos eppendorf de 0.5 ml, con la ayuda de una micropipeta.
- 12) Para concluir con esta fase las muestras se almacenaron a 4°C en un refrigerador hasta el siguiente día.

2.13.2 Cuantificación de ADN de las muestras tomadas en renacuajos y anfibios adultos de *G. riobambae*.

Con protocolo ya establecido por el Laboratorio Molecular de Anfibios de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador QCAZ para el uso del espectrofotómetro Nanodrop” se cuantificó cada uno de los ADN extraídos dándonos una concentración en ng de ADN/ μ L

Materiales

➤ Biológicos

- ADN renacuajos y adultos de *G.riobambae*

➤ Reactivos

- H₂O de PCR
- Buffer prepman Ultra (Sample Preparation Reagent. Applied Biosystems)

➤ Equipos y otros

- NanoDrop
- Computadora con el programa NanoDrop
- Micropipetas
- Puntas para pipetas
- Guantes
- Libreta de apuntes

Métodos

- 1) Retiramos los tubos eppendorf que se habían guardado con anterioridad en el refrigerador y los dejamos a temperatura ambiente
- 2) Iniciamos corriendo el programa NanoDrop en el computador.
- 3) Colocamos 0,15 µl de H₂O de PCR para limpiar la máquina y presionar Ok en la pantalla.
- 4) Con la ayuda de un papel de lente procedemos a limpiar el lente y a continuación se agrega 0.15 µl del buffer que utilizamos para disolver el ADN con anterioridad, y en la pantalla del PC se da clic en BLANK
- 5) Nuevamente procedemos a limpiar el lente y colocamos 0.15 µl de la muestra de ADN, en orden utilizando los códigos previamente rotulados en cada tubo eppendorf.
- 6) Con la ayuda de un papel de lente procedemos a limpiar el lente y se repite el paso anterior con todas las muestras tanto de renacuajos como de adultos de *G. riobambae*.
- 7) En nuestra libreta de apuntes copiamos y verificamos todos los resultados tomando en cuenta la concentración y pureza de las muestras.
- 8) Los valores obtenidos en la cuantificación se pueden observar en la Tabla 1.

2.13.3 Preparación de las reacciones para amplificación del ADN obtenido de renacuajos y anfibios adultos de G. riobambae.

Materiales

➤ **Biológicos**

- ADN total de anfibios.

➤ **Reactivos y soluciones**

- H₂O de PCR
- Buffer de PCR
- MgCl₂ (Cloruro de magnesio)
- dNTP's (Solución de Desoxirribonucleótidos trifosfatos)
- Primer Forward: Cebador directo Bd1a (CAGTGTGCCATATGTCACG)
- Primer reverse: Cebador directo Bd1b (CATGGTTCATATCTGTCCAG)
- Taq

➤ **Equipos y otros materiales**

- Cabina para PCR
- Centrífuga

- Micropipeta
- Tubos eppendorf
- Puntas para pipeta
- Tubos para PCR
- Vortex
- Guantes

➤ **Métodos**

- 1) Se rotulan nuevamente tubos de PCR (0.2 ml), con los códigos únicos de cada individuo.
- 2) Se estimó el volumen de la premezcla necesaria tomando el número de muestras analizadas. En la cabina para PCR se prepara el Mastermix en un tubo de 1,5 ml, colocando los reactivos de la tabla 3, en el orden indicado para un volumen de 24.05 μ l por reacción.
- 3) Con la ayuda del Vortex se homogeneizó toda la premezcla.

2.13.4 Amplificación del material genético de *B. dendrobatidis* y del ADN de control.

El control positivo que se usó en cada reacción de PCR, corresponde a un individuo analizado anteriormente y que forma parte del archivo de los individuos positivos de quitridiomycosis en el laboratorio molecular QCAZ.

Materiales

➤ **Biológicos**

- ADN total de renacuajos y anfibios adultos de *G. riobambae*.

➤ **Reactivos y soluciones**

- Premezcla

➤ **Equipos y otros materiales**

- Termociclador
- Guantes
- Centrífuga
- Micropipeta
- Tubos eppendorf
- Puntas para pipeta
- Tubos para PCR 0.2 ml

➤ **Métodos**

- 1) En los tubos para PCR de 2 ml se adiciona 0.25 ng/μl de la premezcla.
- 2) Luego pasamos el ADN total obtenido con anterioridad a todos los tubos de PCR que contienen la premezcla.
- 3) El Primer Forward (CAGTGTGCCATATGCAC) y reverse (CATGGTTCA TATCTTCCAGG), amplifican las regiones ITS 1 y la región 5.8 S ribosomal respectivamente.
- 4) En el termociclador se llevaron a cabo las amplificaciones tomando en cuenta las siguientes condiciones explicadas en la Tabla 2.
- 5) Refrigeramos las muestras para su posterior uso.

Tabla 2 Condiciones de amplificación de material genético de *B. dendrobatidis* mediante PCR.

Paso		Tiempo (min', seg'')	Temperatura
Desnaturalización I.		10'00''	93° C
35 ciclos	Desnaturalización	00'45''	93° C
	Alineamiento	00'45''	60° C
	Extensión	01'00'	72° C
Extensión Final		10'00''	72° C
Almacenamiento		∞	4° C

2.13.5 Determinación de los productos mediante electroforesis en gel de agarosa

Materiales

➤ **Reactivos y soluciones**

- Agarosa
- Agua destilada
- Buffer TAE (Tris, Acetato, EDTA).
- ADN polimerasa (DreamTaq Green de la marca Thermo Scientific)
- Gel de carga (BlueJuice Gel Loading Buffer).
- Tinte (SYBR Safe)

➤ **Equipos y otros materiales**

- Micropipetas
- Puntas para pipetas
- Cámara de electroforesis
- Guantes de nitrilo
- Balanza analítica
- Fotodocumentador (Bio-Rad)

➤ **Métodos**

- 1) Pesamos la agarosa y añadimos en un vaso de precipitación junto con buffer TAE al 0.5x para generar una solución de 1%.
- 2) Se incuba la solución en el microondas por unos 10-15 segundos, hasta que la muestra se vea translúcida y no existan grumos.
- 3) Mientras la agarosa toma una temperatura adecuada se monta el molde de gel sobre el soporte junto al peine de acuerdo el número de muestras a correr en el gel.
- 4) Se coloca la mezcla de agarosa en el molde y esperamos a que gelidifique.
- 5) Pasados algunos minutos retiramos el peine de del gel y lo colocamos en la cámara de electroforesis junto al molde, llenamos la cámara de electroforesis del buffer TAE, hasta cubrir los electrodos y la superficie de gel.
- 6) Partimos de las muestras de ADN obtenidas luego de la amplificación almacenadas en el refrigerador, en cada pozo con la ayuda de la micropipeta, se colocó 2µl de gel de carga (BlueJuice Gel Loading Buffer) y 3µl de muestra por pocillo.
- 7) En los dos pocillos del extremo derecho se colocan dos controles negativos y el marcador de peso molecular.
- 8) Se encendió la cámara de electroforesis durante 90 minutos a un voltaje de 120.
- 9) Una vez terminado el tiempo, se retira el gel de la cámara de electroforesis y se lo coloca en buffer TAE que cubra el gel con 3µl de tinte (SYBR Safe) por 10 minutos.
- 10) Se visualizaron las bandas con la ayuda de un fotodocumentador para visualizar la imagen en el computador.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.14 Análisis de los resultados

3.1.1 Área de estudio

Se dedicaron 4 semanas de muestreo (3 días de muestreo por zona y 15 horas de esfuerzo por localidad) para el levantamiento de información (Tabla 3). Debido a que cada localidad era menor a 1 ha, se realizaron transectos de 600 x 4 m en T1 y T2 y de 400x4 m para T3, con un tiempo estimado de 5 horas diarias de búsqueda por tres días.

Tabla 3 Diseño para el muestreo poblacional de *Gastrotheca riobambae* en las parroquias de Latacunga.

Zona de muestreo	Técnica	Nº Transectos y puntos fijos	Nº días/ horario	Área cubierta	Esfuerzo empleado
T1	Inspección por encuentro visual (IEV)	3 (600 x 4 m)	3 días (9-11h y 16-20h)	7.200 m ²	5 h/3transectos 15 h/salida
T2	Inspección por encuentro visual (IEV)	3 (600 x 4 m)	3 días (9-11h y 16-20h)	7.200 m ²	5 h/3transectos 15 h/salida
T3	Inspección por encuentro visual (IEV)	3 (400 x 4 m)	3 días (9-11h y 16-20h)	4.800 m ²	5 h/3transectos 15 h/salida

En el caso de las localidades (T1 y T2) el hábitat se compone de césped, hojarasca, hierbas, dentro de una zona ganadera y cerca de ella, por lo que presentaron una estructura vegetal similar, las ranas muestreadas se encontraban en un estrato vertical bajo entre los 0- 30 cm, entre los pastizales, y escondidos en los filos de las acequias, por esta razón se tomó en cuenta el tipo de sustrato donde se encontraba cada individuo, de esta manera como se puede observar en la Figura 9 el 62% (10) de ranas muestreadas se las encontró entre los pastizales propios del lugar y el 38% (6) restante se encontró en los filos de las acequias, por lo que parecería haber una preferencia de sustrato en hojas aledañas que en acequias que cruzan por ahí.

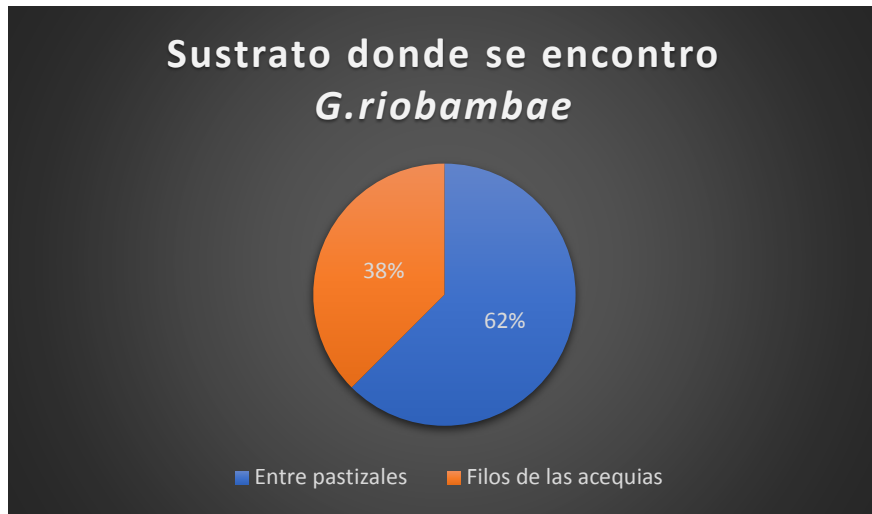


Figura 9.

Sustratos donde se encontró *G.riobambae* en las localidades T1 y T2

Contrario en el T3 al ser un lugar pantanoso, donde se estima (no se realizó la medición) tiene proporciones irregulares con profundidades que pueden ir de 50-150 cm, al ser alejada de una zona ganadera, se realizó el muestreo tanto en los filos de las acequias y en el interior de la vegetación remanente dentro de los cenagales.

En la Figura 10 se puede observar que el 73% (8) de los individuos de T3 preferían estar en el interior de los cenagales y el 27% restante se los encontró en los filos de las acequias que rodeaban el lugar, la preferencia de sustrato podría deberse a que estos animales se pueden refugiar, buscar alimento y reproducirse, de una manera más adecuada.

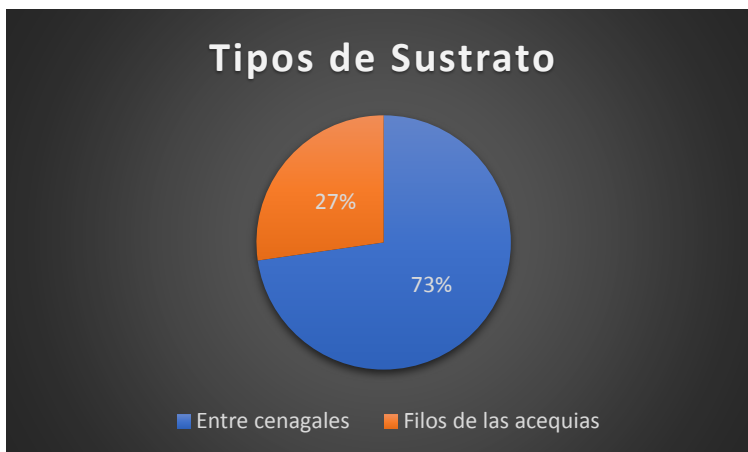


Figura 10.

Sustratos donde se encontró *G.riobambae* en la localidad de T3

Todas las ranas muestreadas del T1 y T2 se encontraban en un estrato vertical bajo entre los 0-30 cm, entre los pastizales, y escondidos en los filos de las acequias, el estrato donde se

encuentren va a depender mucho del tipo de hábitat donde se encuentren ya que las ranas se van a encontrar con mayor frecuencia en lugares que les brinden seguridad y camuflaje, especialmente cuando descansan, se asolean, cantan, posan, se desplazan en busca de alimento o simplemente para esconderse por sobrevivencia (**Del Pino, 1980**). Probablemente los estratos bajos les brinden mayor protección de sus depredadores, debido a la espesura de vegetación.

Contrario en el T3 al ser un lugar pantanoso, donde se estima (no se realizó la medición) tiene proporciones irregulares con profundidades que pueden ir de 50-150 cm, por esta razón al momento de la toma de muestras este fue el lugar más complicado de recorrer ya que tenía una gran cantidad de cenagales profundos, el 100% de individuos se los encontró entre la vegetación propia del lugar.

3.1.2 Estructura poblacional

Puesto que los muestreos por conveniencia no excluyen a las hembras ya que no son únicamente estimaciones auditivas, más bien podría ser que al momento de la captura del macho (guiado por su canto), las hembras que se encuentren cerca podrían advertirse y mejorar su cripticidad (característica que hace pasar inadvertido) al momento de su búsqueda. Esto en base a 2 de las hembras registradas (A12T2 y A15T2), la primera hembra se registró aproximadamente 4 minutos después que al macho (distancia menor de 1m), esta se encontraba inmóvil entre el pastizal cercano a una acequia, la siguiente hembra se encontró al mismo tiempo que al macho, estos se encontraban a menos de 50 cm de distancia.

En el remanente (entre pastizales) la distribución espacial de T1 y T2 (en aproximadamente 1 hectárea) fue variable, en T1 se registraron 7 individuos (machos) distanciados entre 300-450 m. No obstante, en T2 las distancias entre los 9 individuos (5 machos y 4 hembras) varió entre <1 y 250 m, donde se registraron 2 hembras en una cercanía <1m en cuanto al macho. A diferencia de las 2 hembras restantes las cuales se encontraban distanciadas entre 100 y 250m con respecto a los machos, distancia muy larga para que estos individuos se puedan encontrar (**Saunders et al., 1991**). El amplio distanciamiento entre individuos y congregaciones puede provocar la extinción de poblaciones (**Cushman, 2006**).

La estructura poblacional estuvo formada mayormente por machos, cómo podemos ver en la Figura 11, se puede hacer una determinación de sexo en las ranas de *G. riobambae*, gracias a su dimorfismo sexual, donde de las 27 ranas muestreadas el 85 % (23) son machos y el 15 % (4) restantes son hembras, la alta captura de machos fue determinada por su canto, presentando así

un efecto del muestreo poblacional, aunque se debe en parte al tipo de muestreo, también nos podría sugerir la agilidad de las hembras por ocultarse.

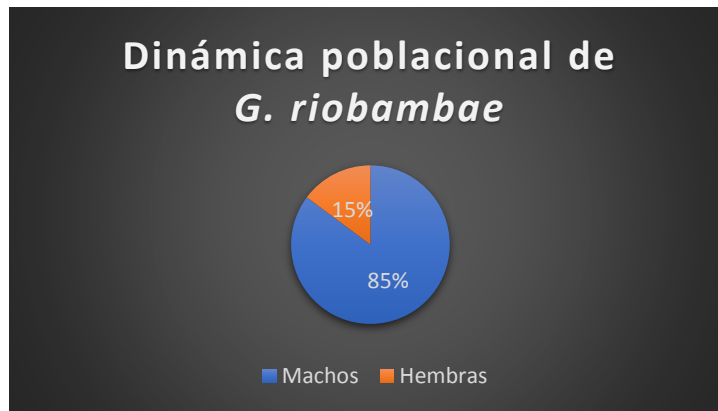


Figura 11.

Dinámica poblacional de *Gastrotheca riobambae* en tres localidades de la ciudad de Latacunga.

3.1.3 Muestreo de renacuajos de *G.riobambae*

En estas tres localidades (T1, T2 y T3), se evaluaron todos los cuerpos de agua permanentes, ya que estos son el sitio vital para el desarrollo de los renacuajos, durante los 3 días que duró el muestreo, por cada localidad escogida se evaluaron las charcas de agua que se forman después de la lluvia, además de acequias, las cuales se observó que eran drenadas rápidamente en 1 o 2 días, estos pequeños cuerpos de agua son el sitio vital para el desarrollo de los renacuajos y tomando en cuenta el estadio de desarrollo óptimo para la toma de muestras se decidió por escoger las pozas que tenían una mayor profundidad y renacuajos en estadios diferentes, pero para esta investigación de recolectaron los que morfológicamente se encontraban en estadios avanzados de desarrollo (Anexo 3), de esta manera se procedió a medirlos con la ayuda de un calibrador (pie de rey), donde la a medida de longitud total del renacuajo se consideró desde la punta de la boca hasta la punta de la cola.

El promedio de estadio de desarrollo en los renacuajos muestreados fue de 38,6 tomando en cuenta los reportado por **Manzano, (2010)** donde menciona que mientras más avanzado el estadio del renacuajo, mayor es la prevalencia de quitridiomycosis, y además la correlación podría deberse a que en estadios más avanzados tienen los discos orales más grandes y con más queratina la cual es el sustrato del quítrido (**Berger et al, 1998**). Adicionalmente **Manzano, (2010)** también añade que el promedio de longitud total está relacionado estrechamente al estadio del renacuajo que tiende a variar de acuerdo con el individuo que se esté estudiando, en

el caso de este estudio el promedio de longitud fue de 49.53 mm, por lo que concuerda con los estadios de desarrollo en los que se encontraba cada renacuajo (Tabla 4).

El factor que pudo influenciar en el número de muestras recolectadas, es que cuando se realizó la prospección del estudio para la toma de muestras, los renacuajos se encontraban en etapas tempranas de desarrollo y al momento de la toma de muestras uno de los habitantes de T2, nos supo manifestar que previo al muestreo se realizó una minga en todos los sectores, lo que pudo ser el principal factor que influyo en el número de muestras recolectadas por sector, lo que causaría que los anfibios de *G.riobambae*, al no existir lugares donde puedan depositar las pequeñas larvas que terminan su desarrollo en pequeñas charcas o en aguas lenticas, las ranas estaría delimitando su reproducción y su permanecía estaría delimitada por su longevidad.

Tabla 4 Características de renacuajos de *Gastrotheca riobambae*,

Número de poza	Código del individuo	LT por renacuajo (mm)	Estadio Renacuajo
Poza 1	R1P1	46,20	35
	R2P1	51,70	37
	R3P1	36,80	42
	R4P1	39,90	45
Poza 2	R5P2	39,40	39
	R6P2	50,30	41
	R7P2	59,20	37
	R8P3	57,80	40
Poza 3	R9P3	59,40	34
	R10P3	48,60	38
	R11P3	49,70	37
	R12P3	55,30	33
Promedio		49,53	38,16

3.1.4 Detección de Quitridiomicosis

Durante el proceso de amplificación el ensayo contó con un control positivo de *B. dendrobatidis* el cual ayudó a detectar inhibidores al momento de realizar la amplificación (OIE, 2012) de esta manera se aseguró que la generación de amplicones sea correcta. En el presente trabajo se aplicó la técnica de PCR de punto final para detectar la presencia de *B. dendrobatidis* y se utilizaron cebadores específicos para el quitrido, en cada ensayo realizado se utilizaron controles positivos, de esta manera nos aseguramos de que las condiciones del PCR se encuentren adecuadas y amplifiquen todas las muestras que resulten positivas.

3.1.5 Detección de *B. dendrobatidis* en adultos de *G. riobambae*

Se recolectaron un total de 27 muestras de ranas adultas de *G. riobambae*, de todas las muestras los resultados fueron negativos para presencia de *B. dendrobatidis*, es decir las muestras fueron diagnosticadas como negativas por medio de PCR punto final.

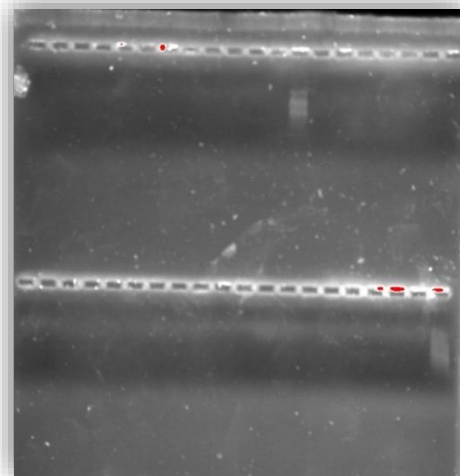


Figura 10. Fotografías del gel de agarosa de las muestras de ranas adultas de *G. riobambae*. No se observa aglutinación en las muestras por lo que se establece el diagnostico negativo para *B. dendrobatidis*.

3.1.6 Detección de *B. dendrobatidis* en renacuajos de *G. riobambae*

Se recolectaron un total de 12 muestras del aparato bucal de renacuajos de *B. dendrobatidis* de tres pozas escogidas y, de todas las muestras los resultados fueron negativos para presencia de *B. dendrobatidis*, es decir las muestras fueron diagnosticadas como negativas por medio de PCR punto final.

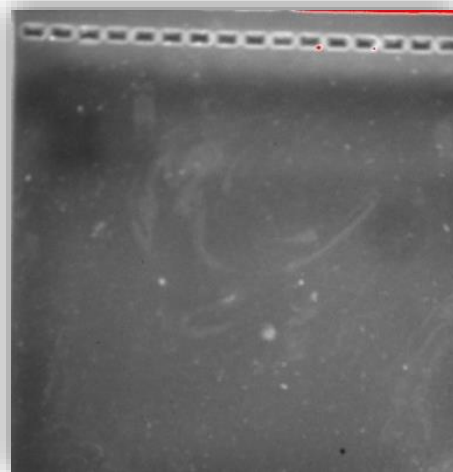


Figura 11. Fotografías del gel de agarosa de las muestras de renacuajos de *G. riobamba*. No se observa aglutinación en las muestras por lo que se establece el diagnostico negativo para *B. dendrobatidis*

Para verificar que las condiciones de PCR estén correctas y amplifiquen los fragmentos de aquellas muestras positivas, se utilizaron controles positivos y negativos para comprobar que no haya ocurrido contaminación (colocar en lugar

de ADN agua). Se realizó nuevamente el PCR en el 33.33% de las muestras de renacuajos y en el 14.81 % de las muestras de los adultos y se confirmó el diagnóstico negativo.

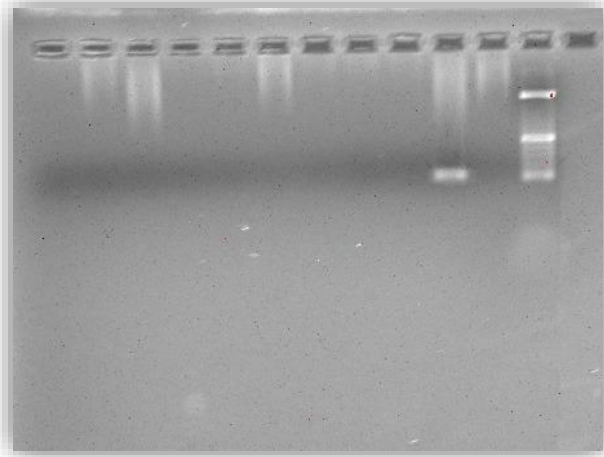


Figura 12. Fotografías del gel de agarosa de las muestras de renacuajos y de ranas adultas de *G.riobambae*,

3.1.7 Distribución de *B.dentrobatidis*

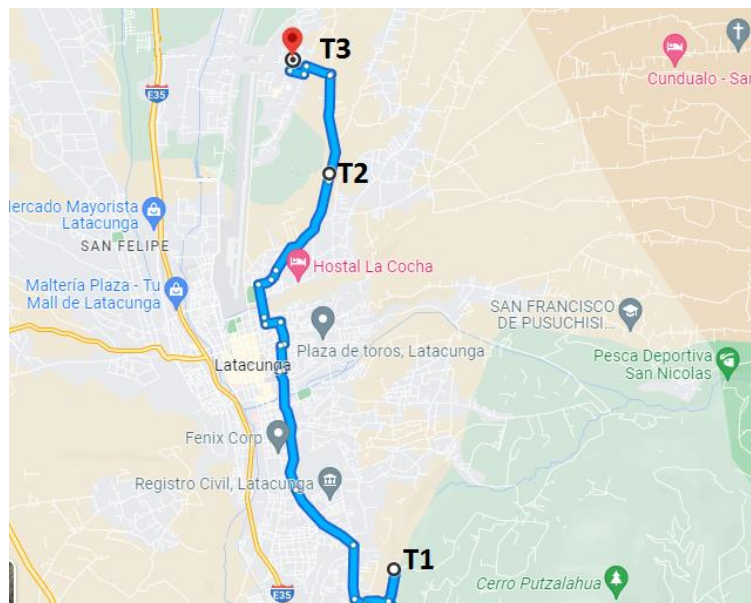


Figura 13. Se muestra la prospección de área donde el diagnóstico para *B.dentrobatidis* es negativo

Se asume que todos los individuos maduros registrados, son sanos y están libres del hongo patógeno *B.dentrobatidis* ; debido a que no presentaban signos de enfermedad (hiperqueratosis, hiperplasia, ulceración, erosiones y necrosis), tampoco decaimiento, por el contrario, se veían saludables. Y aunque en ninguna población se registraron casos positivos de *B.dentrobatidis* , no se puede asegurar que podrían estar libres de la enfermedad, debido a los bajos registros.

2.15 DISCUSIÓN

La falta de datos investigativos de la enfermedad provocada por *B. dendrobatidis* en las zonas donde se realizó el muestreo y el diagnóstico negativo, podría ser específico a las condiciones medioambientales, las respuestas inmunológicas del huésped, los péptidos, las bacterias de la piel o a su vez existe la posibilidad de resistencia conductual e inmunológica adquirida en algunos anfibios (**Schmeller et al., 2014; McMahon et al., 2014**). De esta manera **Greenspan et al., (2017)**, aseguran que los cambios climáticos llegaron a ocasionar variaciones extremas en cuanto a la temperatura, de la misma manera **Bradley et al., (2019)** mencionan que al ser ectotermos los anfibios invierten mayor cantidad de energía en los procesos inmunológicos y de esta manera se puede ver afectada la relación entre los anfibios y *B. dendrobatidis*.

Los tres lugares donde se realizó la toma de muestras fueron sitios con cierto grado de perturbación antrópica, de igual manera otro de los factores determinantes para la ausencia de *B. dendrobatidis* pudo haber sido la temperatura ambiental que según los datos recogidos por el “Instituto Nacional de meteorología e Hidrología” (INAMHI) Tabla 1, el promedio de temperatura ambiental durante la investigación fue desde 5-20°C, lo que al compararlo con la información aportada por **Piotrowski., (2004)** el cual menciona que el rango óptimo para el desarrollo de *B. dendrobatidis* se encuentra entre 17-25°C, pero al compararlo con los datos proporcionados por **Narváez et al., (2021)** en su investigación realizada en el parque metropolitano Guanguiltagua de Quito donde las temperaturas medias de las pozas registradas fueron de 13-15°C, y tuvo como resultado que en renacuajos de la rana marsupial andina (*G. riobambae*) hubo una prevalencia de 39% (aparatos bucales) y en Cutines de Quito (*Pristimantis unistrigatus*) la prevalencia fue de 15% (hisopado de piel); ante la presencia de *B. dendrobatidis*, es así como este hecho indica que el hongo puede crecer fuera del rango considerado apto para su crecimiento y por lo tanto subsiste en los Andes ecuatorianos, de esta manera las zonas donde se realizó el muestreo posee temperaturas en las cuales el desarrollo del quitrido es favorable a pesar de que no se encuentran en su rango óptimo de crecimiento (17-25°C), pero por sus características pueden llegar a crecer un rango más amplio

. En laboratorio, *B. dendrobatidis* se desarrolla en un amplio rango de temperaturas, entre 4 y 25°C (**Piotrowski et al., 2004**). Tal es así que una vez las zoosporas han sido liberadas pueden permanecer activas durante 24 horas a una temperatura de 23°C, pero en un rango de temperatura entre 4-14°C permanecen activas durante 48 horas, a temperaturas bajas <17°C se producen más zoosporas pero se reproducen más lentamente lo que conlleva a que tengan una vida más prolongada, por el contrario a temperaturas altas >25°C hay un menor crecimiento de *B. dendrobatidis*, una mayor tasa de renovación celular de la epidermis, como resultado se da la eliminación de patógeno del huésped antes de completar su ciclo de vida (**Piotrowski et al., 2004; Bradley et al., 2019**). Esto explica la mayor incidencia de quitridiomycosis en ecosistemas de altura, donde las temperaturas se mantienen bajas, incluyendo los Andes (**Bosch et al., 2001**).

La toma de muestras se realizó en época de lluvias lo que puede estar directamente relacionado con los resultados obtenidos, tal es así que **Burrowes et al., (2004)**, añaden que los cambios en la temperatura como en la precipitación ocasionan cambios negativos en el comportamiento de los anfibios, ya que en épocas secas los individuos tienden a estresarse por la falta de agua y se movilizan hacia fuentes de agua lo que facilita el contagio de la enfermedad, esto concuerda con lo descrito por **Narvaez et al., 2021**, al correlacionar la prevalencia de la enfermedad con las temperaturas máximas ambientales encontraron que en el rango comprendido de 17.50°C a 25°C, hubo mayor cantidad de individuos afectados, ya que a medida que aumentó la temperatura los niveles de infección también aumentaron, además pudieron concluir que mientras más lluvia se registró disminuyó el promedio de infección.

En cuanto a la altitud las muestras fueron tomadas en la ciudad e Latacunga la cual tiene un rango latitudinal que va desde los 2680 a 5920 m.s.n.m lo que al compararlo con las investigaciones realizadas por **Korfel, (2012)**, donde reportó que en el Parque Nacional “El Cajas”, en la provincia del Azuay que tiene un rango altitudinal aproximado de 2500 a 4200 m.s.n.m, identificó *B. dendrobatidis* en renacuajos de *Gastrotheca pseustes* con una prevalencia del 7.9%, del mismo modo **Narváez, (2021)**, en su investigación realizada en el Parque Metropolitano Guanguiltagua de Quito que posee elevaciones que oscilan entre los 2700 y 3000 m.s.n.m,

Hillyard et al., (2008) añaden en su investigación que en las etapas iniciales de la infección se encuentra menor cantidad de zoosporas, además que la técnica de hisopado frecuentemente arroja resultados negativos cuando la carga del hongo en el hospedador

es baja por lo consiguiente los resultados que se obtienen son negativos con respecto a la presencia de material genético de *B. dendrobatidis* (**Shin et al., 2014**).

De este modo **Hillyard et al., (2008)** proponen que para considerar resultados realmente negativos ante la presencia de *B. dendrobatidis*, se debe realizar como mínimo 3 muestreos con un intervalo de 14 días entre ellos.

Un reciente estudio realizado en el parque Metropolitano de Quito, determinó que la población larvaria de *Gastrotheca riobambae* y en adultos de *Pristimantis unistrigatu* se ve afectada por la prevalencia de quitridiomycosis, sin embargo no se afirma que exista una disminución de la misma por la presencia del hongo patógeno (**Narváez, 2021**), estos datos coinciden en lo reportado por **Woodhams et al., (2007)**, donde comenta que la susceptibilidad a la quitridiomycosis varía entre las especies anfibias; como sería el caso de *A. ignescens* el cual declinó (**Ron et al., 2003**). Razón por la cual se infiere que la potencial amenaza a corto plazo para esta especie no parece ser *Batrachochytrium dendrobatidis*, sino la acelerada conversión del hábitat lo cual genera poblaciones distantes incapaces de encontrarse debido a la presencia de barreras (**Cushman, 2006**). A esto se le suman los cambios climáticos con estaciones cálidas y prolongadas (**Pounds et al., 2006**), las mismas que repercuten en la reproducción y desarrollo de renacuajos (**Young et al., 2004**)

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

3.1 Conclusiones

Con la implementación del ensayo de PCR convencional no se observó la amplificación de material genético del hongo patógeno *B. dendrobatidis* de las muestras recolectadas. De un total de 27 muestras analizadas bajo el ensayo de PCR convencional se obtuvo un 100 % de resultados negativos, sin embargo se pudo recabar datos adicionales como por ejemplo; los individuos que habitan dentro de una zona ganadera tienen una preferencia de sustrato a los pastizales propios del lugar como es el caso del 62% de las ranas muestreadas, a diferencia del 38% restante las cuales se encontraban en los filos de las acequias, y los individuos cuyo hábitat era un lugar pantanoso el 73% preferían estar en el interior de los cenagales a diferencia del 27% restante a los cuales se los encontró en los filos de las acequias. La estructura poblacional estuvo formada mayormente por machos, donde de las 27 ranas muestreadas el 85 % (23) son machos y el 15 % (4) restantes son hembras lo que nos podría sugerir la agilidad de las hembras por ocultarse.

Con relación a los resultados obtenidos de los renacuajos de *G. riobambae*, se lograron obtener un total de 12 muestras para lo cual se tomó en cuenta el estadio de desarrollo de los mismos, los cuales se encontraban entre 26 y 46, teniendo como resultado un promedio de estadio de desarrollo de 38.6, además el promedio de longitud total fue de 49.53 mm y lo que está relacionado estrechamente al estadio del renacuajo que tiende a variar de acuerdo con el individuo que se esté estudiando, con la implementación del ensayo de PCR convencional no se observó la amplificación de material genético del hongo patógeno *B. dendrobatidis* de las muestras recolectadas.

El presente estudio reporta por primera vez la inexistencia de *B. dendrobatidis* en las poblaciones de ranas silvestres *G. riobambae* incluidas en el estudio

No se encontró presencia del hongo patógeno *B. dendrobatidis* en el total de muestras analizadas en los sectores escogidos de las parroquias de Belisario Quevedo, Juan Montalvo y San Buenaventura en la ciudad de Latacunga, perteneciente a la provincia de Cotopaxi, por lo que concluye que si bien no hay rastro de la enfermedad en las zonas muestreadas se podría repetir el ensayo en las zonas que no fueron añadidas en este ensayo.

3.2 Recomendaciones

- Hacer un monitoreo del estado de las poblaciones de anfibios en todo el sector.
- Para la toma de muestras celulares en renacuajos, se debe escoger los que tengan la mucosa oral bien desarrollada ya que esto nos ayuda a que el hisopo ingrese con mayor facilidad y así podremos obtener una muestra más adecuada.
- Utilizar la técnica más específica para la detección del quitrido, como por ejemplo qPCR ya que esto nos ayudará a tener un diagnóstico más preciso.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alibardi, L. 2003. Adaptation to the land: the skin of reptiles in comparison to that of amphibians and endotherm amniotes. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **298**, 12–41.
- Amphibiaweb. sf. Search for Amphibians by Region. (En línea, sitio web). Consultado el 12 marz. 2022. <https://amphibiaweb.org/maps/index.html>
- Amphibiaweb.2018. *Gastrotheca riobambae*: Riobamba Marsupial Frog. (En línea, sitio web). Consultado el 4 dic. 2022. <https://amphibiaweb.org/species/1399>
- Annis, S. L; Dastoor, F. P.; Ziel, H.; Daszak, P. ;Longcore, J. 2004. DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases* 40, 420-428, [doi:10.7589/0090-3558-40.3.420](https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.3.420).
- Baitchman, E. J., & Pessier, A. P. (2013). Pathogenesis, diagnosis, and treatment of amphibian chytridiomycosis. *The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice*, 16(3), 669–685. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2013.05.009>
- Balakrishna, T. A; Shakuntala, K. 1988. The moult process in *Bufo melanostictus* (Schn.) (Anura; Bufonidae). *Journal of the Indian Institute of Science* 68:1-6
- Berger L, Hyatt AD; Speare R, Longcore JE. 2005. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis Aquat Organisms* 68:51–63. doi: [10.3354/dao068051](https://doi.org/10.3354/dao068051).
- Berger, L; Speare, R; Daszak, P; Green, DE; Cunningham, AA.; Goggin, CL; Slocombe, R; Ragan, MA; Hyatt, AD; McDonald, KR; Hines, HB; Lips, KR; 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(15), 9031–9036. [doi:10.1073/pnas.95.15.9031](https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.9031).
- Berkeley Mapper. 2022. s.e. Consultado 16 mar. 2022. Disponible en <https://berkeleymapper.berkeley.edu/index.html?tabfile=https://amphibiaweb>

.org/tmpfiles/727626&configfile=https://amphibiaweb.org/tmpfiles/bm_conf ig_646907.xml&ViewResults=tab&sourcename=AmphibiaWeb+Species+M ap:+Gastrotheca+riobambae&hibiaweb=true&label=1&opacity=0.50&p ointDisplay=pointMarkers (Berkeleymapper.berkeley.edu).

Bioweb sf. <https://bioweb.bio/>

Blaustein, A. R; Wake, D. B; Sousa, W. P. 1994. Amphibian Declines: Judging Stability, Persistence, and Susceptibility of Populations to Local and Global Extinctions. *Conservation Biology*, 8(1), 60–71. <http://www.jstor.org/stable/2386721>

Bosch, J., Martínez-Solano, I., & García-París, M. 2001. Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation*, 97(3), 331–337. [doi:10.1016/S0006-3207\(00\)00132-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(00)00132-4)

Bradley PW; Brawner MD, Raffel TR; Rohr JR; Olson DH; Blaustein AR.2019. Shifts in temperature influence how *Batrachochytrium dendrobatidis* infects amphibian larvae. *PLoS One*. 19;14(9):e0222237. doi: 10.1371/journal.pone.0222237. PMID: 31536533; PMCID: PMC6752834. .

Bresciano JC; Salvador CA; Paz-Y-Miño C; Parody-Merino AM; Bosch J; Woodhams DC.2015. Variation in the Presence of *Anti-Batrachochytrium dendrobatidis* Bacteria of Amphibians Across Life Stages and Elevations in Ecuador. *Ecohealth*. 12(2):310-9. doi: 10.1007/s10393-015-1010-y. Epub 2015 Feb 11. PMID: 25669915.

Brucker RM; Baylor CM; Walters RL; Lauer A; Harris RN; Minbiole KP.2007. The identification of 2,4-diacetylphloroglucinol as an antifungal metabolite produced by cutaneous bacteria of the salamander *Plethodon cinereus*. *J Chem Ecol*. 2008 Jan;34(1):39-43. doi: 10.1007/s10886-007-9352-8. Epub 2007 Dec 6. PMID: 18058176.

Brutyn, M; D’Herde, M; Dhaenens, P; Van Rooij, E; Verbrughe, A.D; Hyatt, S; Croubels, D; Deforce, R; Ducatelle, F; Haesebrouck, A; Martel K; Pasmans,

- M. 2012. *Batrachochytrium dendrobatidis* zoospore secretions rapidly disturb intercellular junctions in frog skin. *Fungal Genet. Biol.* 49(10): 830–837.
- Burkart, D; Flechas, S. VVredenburg, V. T; Catenazzi, A. 2017. Cutaneous bacteria, but not peptides, are associated with chytridiomycosis resistance in Peruvian marsupial frogs. *Animal Conservation* **20**, 483-491, doi:10.1111/acv.12352.
- Burrowes, P., Joglar, R., y Green, D. 2004. Potential causes for amphibian declines in Puerto Rico. *Herpetologica*, 60(2), 141–154.
- Bustard, H; Maderson, P. F. A. 1965. The eating of shed epidermal material in squamate reptiles. *Herpetologica* 21(4):306-308
- Butchart SH; Walpole M; Collen B; van Strien A; Scharlemann JP; Almond RE; Baillie JE; Bomhard B; Brown C; Bruno J; Carpenter KE; Carr GM; Chanson J; Chenery AM; Csirke J; Davidson NC; Dentener F; Foster M; Galli A; Galloway JN; Genovesi P; Gregory RD; Hockings M; Kapos V; Lamarque JF; Leverington F; Loh J; McGeoch MA; McRae L; Minasyan A; Hernández Morcillo M; Oldfield TE; Pauly D; Quader S; Revenga C; Sauer JR; Skolnik B; Spear D; Stanwell-Smith D; Stuart SN; Symes A; Tierney M; Tyrrell TD y Vié JC; Watson R. 2010. Global biodiversity: indicators of recent declines. *Science*. 28;328(5982):1164-8. doi: 10.1126/science.1187512. Epub 2010 Apr 29. PMID: 20430971.
- Byrne, A. Q; Vredenburg, V. T; Martel, A; Pasmans, F; Bell, R. C; Blackburn, D. C; Bletz, M. C; Bosch, J; Briggs, C. J; Brown, R. M; Catenazzi, A; Familiar López, M; Figueroa-Valenzuela, R; Ghose, S. L; Jaeger, J. R; Jani, A. J; Jirku, M; Knapp, R. A; Muñoz, A; Portik, D. M; ... Rosenblum, E. B. 2019. Cryptic diversity of a widespread global pathogen reveals expanded threats to amphibian conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(41), 20382–20387. <https://doi.org/10.1073/pnas.1908289116>.
- Cadena , D; Garcia, M. 2012. Fertilización asistida en rana marsupial andina (*Gastrotheca riobambae*) en el Centro de investigación y conservación de

Anfibios, proyecto Balsa de los Sapos de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito: Universidad Central del Ecuador.

Campbell, C; Voyles, J; Cook, D; & Dinudom, A. 2012. Frog skin epithelium: electrolyte transport and chytridiomycosis. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(3), 431–434. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.12.002>.

Catenazzi, A; Flechas, S. V; Burkart, D; Hooven, N. D; Townsend, J; Vredenburg, V. T. 2018. Widespread Elevational Occurrence of Antifungal Bacteria in Andean Amphibians Decimated by Disease: A Complex Role for Skin Symbionts in Defense Against Chytridiomycosis. *Frontiers in microbiology*, 9, 465. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00465>

Chasiluisa, V; Frenkel, C; Vallejo, A; Félix-Novoa, C; Ron, S. R. 2021. *Gastrotheca riobambae* En: Ron, S. R., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. (Eds). *Anfibios del Ecuador*. Version 2021.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.pgs,773-775.

Collins, JP; Storfer, A. 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions*, 9: 89-98. doi: 10.1046 / j.1472-4642.2003.00012.x

Coloma, L. 2004. The IUCN Red List of Threatened Species. Recuperado 29 de octubre de 2021, de <https://www.iucnredlist.org/species/55357/11298345>.

Colombo, B. M., Scalvenzi, T., Benlamara, S., & Pollet, N. (2015). Microbiota and mucosal immunity in amphibians. *Frontiers in immunology*, 6, 111. <https://doi.10.3389/fimmu.2015.00111>.

Cramp, RL; McPhee, RK; Meyer, EA; Ohmer, ME; Franklin, CE.2014. First line of defense: the role of shedding in the regulation of skin microbes in frogs. *Conservation Physiology* 2 , cou012.

Davies, M; Withers, P. C. 1993. Morphology and physiology of the anura. In: Davies, M. & Withers, P. C. eds. *Fauna of Australia*. Canberra, Australian Government Publication, C.S.I.R.O, p. 1-35.

- Del Pino, E.M. 1980. El mantenimiento y aspectos del comportamiento del sapo Marsupial *Gastrotheca riobambae* (Hylidae). *Revista de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador* 7(27):41-49.
- DSEWPaC (Department of Sustainability, Environment, Water, Population and Communities). 2013. Chytridiomycosis (Amphibian chytrid fungus disease) Fact sheet. Available from:
<http://www.environment.gov.au/biodiversity/invasive-species/publications/factsheet-chytridiomycosis-amphibian-chytrid-fungus-disease>
- Duellman, WE; Hillis, DM.1987. Marsupial frogs (Anura: Hylidae: *Gastrotheca*) of the Ecuadorian Andes: resolution of taxonomic problems and phylogenetic relationships. *Herpetologica*, 43, 141-173.
- Duellman W. 2001. Hylid frogs of Middle America. Society for the study of Amphibians and Reptiles.
- Duellman W y Köhler J. 2005. New species of marsupial frog (Hylidae: Hemiphractinae: *Gastrotheca*) from the Yungas of Bolivia. *Journal of Herpetology*, 39, 91–100.
- Fisher, M. C., Bosch, J., Yin, Z., Stead, D. A., Walker, J., Selway, L., Brown, A. J., Walker, L. A., Gow, N. A., Stajich, J. E., & Garner, T. W. 2009. Proteomic and phenotypic profiling of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* shows that genotype is linked to virulence. *Molecular ecology*, 18(3), 415–429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04041.x>
- Gallardo, J.M. 1979. Composición, distribución y origen de la herpetofauna Chaqueña. Pp 299-307. En: Duellman, W.E. (Ed). 1979. *The south american herpetofauna: It's origin, evolution and dispoersal. The South American Herpetofauna: Its origin, evolution and Dispersal. Monogr. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas.* 7: 1-485
- Garner, T. W; Schmidt, B. R; Martel, A; Pasmans, F; Muths, E; Cunningham, A. A; Weldon, C; Fisher, M. C; Bosch, J. 2016. Mitigating amphibian chytridiomycoses in nature. *Philosophical transactions of the Royal Society of*

London. Series B, Biological sciences, 371(1709), 20160207.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0207>.

Gervasi, S., Gondhalekar, C., Olson, D. H., & Blaustein, A. R. (2013). Host identity matters in the amphibian-*Batrachochytrium dendrobatidis* system: fine-scale patterns of variation in responses to a multi-host pathogen. *PloS one*, 8(1), e54490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054490>

Goka K; Yokoyama J; Une Y; Kuroki T; Suzuki K; Nakahara M; Kobayashi A; Inaba S; Mizutani T; Hyatt A. 2009. Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes, and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology*, 18: 4757–4774.

Gosner, K. L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16:183-190

Greenspan SE; Longcore JE; Calhoun AJ. 2012. Host invasion by *Batrachochytrium dendrobatidis*: fungal and epidermal ultrastructure in model anurans. *Dis Aquat Órgano* 100: 201–210.

Greenspan, S. E., Bower, D. S., Roznik, E. A., Pike, D. A., Marantelli, G., Alford, R. A., Schwarzkopf, L., y Scheffers, B. R. 2017. Infection increases vulnerability to climate change via effects on host thermal tolerance. *Scientific reports*, 7(1), 9349. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09950-3>

Gutleb, A. C; Bronkhorst, M; van den Berg, J. H; Murk, A. J. 2001. Latex laboratory-gloves: an unexpected pitfall in amphibian toxicity assays with tadpoles. *Environmental toxicology and pharmacology*, 10(3), 119–121. [https://doi.org/10.1016/s1382-6689\(01\)00091-6](https://doi.org/10.1016/s1382-6689(01)00091-6)

Haas A. 2003. Phylogeny of frogs as inferred from primarily larval characters (Amphibia:Anura). *Cladistics : the international journal of the Willi Hennig Society*, 19(1), 23–89. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2003.tb00405.x>

Harvell, C. D; Mitchell, C. E; Ward, J. R; Altizer, S; Dobson, A. P; Ostfeld, R. S; Samuel, M. D. 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and

marine biota. *Science* (New York, N.Y.), 296(5576), 2158–2162. <https://doi.org/10.1126/science.1063699>.

Hellicar, A. D., Rahman, A., Smith, D. V., & Henshall, J. M. 2015. Machine learning approach for pooled DNA sample calibration. *BMC bioinformatics*, 16, 214. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0593-1>

Hibbett, D. S; Binder, M; Bischoff, J. F; Blackwell, M; Cannon, P. F; Eriksson, O. E; Huhndorf, S; James, T; Kirk, P. M; Lücking, R; Thorsten Lumbsch, H; Lutzoni, F; Matheny, P. B; McLaughlin, D. J; Powell, M. J; Redhead, S; Schoch, C. L; Spatafora, J. W; Stalpers, J. A; Vilgalys, R., ... y Zhang, N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, 111(Pt 5), 509–547. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>

Hillyard, S ;Mobjerg, N ;Tanaka, Sh; Hviid Larse, E. 2008. Osmotic and ionic regulation in amphibians. In *Osmotic and Ionic Regulation: Cells and Animals* (ed. DHevan), págs. 36-44. Florida, EE. UU: Prensa CRC.

IUCN. (International Union for Conservation of Nature), Conservation International & NatureServe. 2008. *Gastrotheca riobambae*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-3. (En línea, sitio web). Consultado el 16 marzo. 2022. <https://www.iucnredlist.org/species/55357/11298345#bibliography>

IUCN. (*International Union for Conservation of Nature*). 2021. Summary Statistics: summaries by country. version 2021-3. (En línea, sitio web). Consultado el 23 febr. 2022. <https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics>.

Knapp, R. A; Joseph, M. B; Smith, T. C; Hegeman, E. E; Vredenburg, V. T; Erdman, J. E; Jr, Boiano, D. M; Jani, A. J; Briggs, C. J. 2022. Effectiveness of antifungal treatments during chytridiomycosis epizootics in populations of an endangered frog. *PeerJ*, 10, e12712. <https://doi.org/10.7717/peerj.12712>

Korfel, C. A. (2012). Distribution and environmental correlates between amphibians and the fungal pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis* [Doctoral dissertation, Ohio State University]. OhioLINK Electronic Theses and

http://rave.ohiolink.edu/etdc/view?acc_num=osu1350573649.

- Kruger KM; Hero J-M.2007. The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is non-randomly distributed across amphibian breeding habitats. *Div Distrib.* 13:781–788.
- Kruger, K. M; Hero, J. M; Ashton, K. J. 2006. Cost efficiency in the detection of chytridiomycosis using PCR assay. *Diseases of aquatic organisms*, 71(2), 149–154. <https://doi.org/10.3354/dao071149>
- Kueneman, J. G; Weiss, S; McKenzie, V. J. 2017. Composition of Micro-eukaryotes on the Skin of the Cascades Frog (*Rana cascadae*) and Patterns of Correlation between Skin Microbes and *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Frontiers in microbiology*, 8, 2350. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02350>.
- Lam BA, Walke JB, Vredenburg VT, Harris RN.2010 La proporción de individuos con bacterias de la piel anti -*Batrachochytrium dendrobatidis* está asociada con la persistencia de la población en la rana *Rana muscosa* . *Biol. Conservar*; **143** :529–531
- Larsen, E. H; Deaton, L. E; Onken, H; O'Donnell, M; Grosell, M; Dantzler, W. H; Weihrauch, D. 2014. Osmoregulation and excretion. *Comprehensive Physiology*, 4(2), 405–573. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130004>.
- Larsen, L. O.1976. In *Physiology of the Amphibia Vol. 3* (eds J.A. Moore & Brian Lofts) 53–100 (Academic Press, 1976).
- Larsen, E. H; Ramlov, H. 2013. Role of cutaneous surface fluid in frog osmoregulation. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 165, 365-370. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.04.005>
- Laurance, W. F., McDonald, K. R., & Speare, R. 1996. Epidemic Disease and the Catastrophic Decline of Australian Rain Forest Frogs. *Conservation Biology*, 10(2), 406–413. <http://www.jstor.org/stable/2386857>

- Ling, J. K. 1972. Adaptive Functions of Vertebrate Molting Cycles. *American Zoologist*, 12(1), 77–93. <http://www.jstor.org/stable/3881733>
- Lips KR; Diffendorfer J; Mendelson JR; Sears MW. 2008. Riding the wave: Reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLoS Biol.* 6(3):0441–54.
- Lips, K. R., J. K. Reaser, B. E. Young & R. Ibañez. 2001. Monitoreo de Anfibios en América Latina: Manual de Protocolos. *Herpetological* 30: 1- 115.
- Littlejohn MJ y Watson GF. 1974. Mating Call Discrimination and Phonotaxis by Females of the *Crinia Laevis* Complex (Anura: Leptodactylidae). *Copeia*. (1):171–175.
- 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. <https://doi.org/10.2307/3761366>.
- Longo, A. V., Burrowes, P. A., y Joglar, R. L. 2010. Seasonality of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in direct-developing frogs suggests a mechanism for persistence. *Diseases of Aquatic Organisms*, 92, 253–60.
- Loudon, A. H; Holland, J. A; Umile, T. P; Burzynski, E. A; Minbiole, K. P; Harris, R. N. 2014. Interactions between amphibians' symbiotic bacteria cause the production of emergent anti-fungal metabolites. *Frontiers in microbiology*, 5, 441. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00441>
- Manzano, A.L. 2010. Prevalencia de quitridiomycosis en la población larvaria de *Gastrotheca riobambae* del parque Metropolitano de Quito. Tesis previa a la obtención de Ingeniera en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí – Ecuador
- Marchesi, J. R; Ravel, J. 2015. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 3, 31-31, [doi:10.1186/s40168-015-0094-5](https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5).

- Martel A; Spitzen-van der Sluijs A; Blooi M; Bert W; Ducatelle R; Fisher MC; Woeltjes A; Bosman W; Chiers K; Bossuyt F; Pasmans F. 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:15325–15329.
- McMahon, T. A., Sears, B. F., Venesky, M. D., Bessler, S. M., Brown, J. M., Deutsch, K., Halstead, N. T., Lentz, G., Tenouri, N., Young, S., Civitello, D. J., Ortega, N., Fites, J. S., Reinert, L. K., Rollins-Smith, L. A., Raffel, T. R., & Rohr, J. R. (2014). Amphibians acquire resistance to live and dead fungus overcoming fungal immunosuppression. *Nature*, 511(7508), 224–227. <https://doi.org/10.1038/nature13491>.
- McMahon, T.A; Rohr J.R .2015. Transition of Chytrid Fungus Infection from Mouthparts to Hind Limbs During Amphibian Metamorphosis. *EcoHealth*, 12(1): 188–193.
- Merino-Viteri, A. R. 2001. Análisis de las posibles causas de las disminuciones de las poblaciones de anfibios en los Andes de Ecuador. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador
- Meyer, EA; Cramp, RL; Bernal, MH; Franklin, CE. 2012. Changes in scaling skin microbial abundance: possible implications for infection and disease in amphibians. *Diseases of aquatic organisms* **101** , 235.
- Moss, A.S. , Reddy, N.S. , Dorta, I.M. , and Francisco, M.J.S. 2008. Chemotaxis of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* and its response to a variety of attractants. *Mycologia* 100: 1–5.
- Morgan, JA, Vredenburg, VT, Rachowicz, LJ, Knapp, RA, Stice, MJ, Tunstall, T., ... y Taylor, JW. 2007. Genética de poblaciones del hongo que mata ranas *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias* , 104 (34), 13845-13850.
- Murphy KP. 2012. *Inmunobiología de Janeway*, 8.^a edición. Nueva York, Nueva York: Garland Science.

- Mutschmann, F. 2015. Chytridiomycosis in Amphibians. *J. Exotic Pet Med.* 24(3): 276–282.
- Narváez-Narváez, D. A., Cabrera-Andrade, A., Merino-Viteri, A., Paz-Y-Miño, C., Burgos, G., & Genoy-Puerto, A. (2021). INFECTION DYNAMICS OF *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS* IN TWO FROG SPECIES INHABITING QUITO'S METROPOLITAN GUANGÜILTAGUA PARK, ECUADOR. *Journal of wildlife diseases*, 57(4), 749–760. <https://doi.org/10.7589/JWD-D-20-00110>
- Ohmer, M. E. B; Cramp, R. L; Russo, C. J. M; White, C. R; Franklin, C. E. 2017. Skin sloughing in susceptible and resistant amphibians regulates infection with a fungal pathogen. *Scientific reports*, 7(1), 3529. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03605-z>
- OIE (Organización Mundial de la Salud Animal). 2019. Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos: infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*. pag. 6-15
- OIE (Organización Mundial de la Salud Animal). 2021. Infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*. En: Manual de las pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. pag .8-19. https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/aahm/current/2.01.01_INF_BATRACHOCHYRIUM_ESP.pdf
- Pessier, A.P; Mendelson JR III (Eds.). 2017. Manual para el control de enfermedades infecciosas en las colonias de resguardo para anfibios y programas de reintroducción a la naturaleza, versión 2.0. IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group: Apple Valley, MN.pgs.8-10.
- Pessier, A.P; Nichols, D; Longcore, J And Fuller. 1999. Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 11,194-199. <https://doi.org/10.1177/104063879901100219>.
- Pessier, A. P. 2002. An overview of amphibian skin disease. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 11, 162-174. <https://doi.org/10.1053/saep.2002.123980>

- Piotrowski, J. S; Annis, S. L; Longcore, J. E. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* **96**, 9-15.
- Pounds, J., Bustamante, M. R., Coloma, L. A., Consuegra, J. A., Fogden, M. P. L., Foster, P. N., ... Young, B. E. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439(7073), 161–167. [doi:10.1038/nature04246](https://doi.org/10.1038/nature04246).
- Ramírez, S. & Rodríguez, M. 2011. Estado poblacional y relaciones ecológicas de *Gastrotheca riobambae* (Anura:Hemiphractidae) en dos localidades del Volcán Pasochoa. Prov. Pichincha.Ecuador. *Boletín Técnico Serie Zoológica*, 10: 69-97
- Rands, M; Adams, L; Bennun, S; Butchart, A; Clements, A; Coomes, A. Entwistle, i. Hodge, v. Kapos, j.p.w. Scharlemann, w.j. sutherland & bhaskar vira. 2010. Biodiversity conservation: challenges beyond 2010. *Science* 329(5997): 1298–1303.
- Robert, J. 2020. Experimental platform using the amphibian *xenopus laevis* for research in fundamental and medical immunology. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2020, 247–251.
- Rollins-Smith, L. A., Ramsey, J. P., Pask, J. D., Reinert, L. K., & Woodhams, D. C. (2011). Amphibian immune defenses against chytridiomycosis: impacts of changing environments. *Integrative and comparative biology*, 51(4), 552–562. <https://doi.org/10.1093/icb/acr095>
- Romero-Zambrano,G; Bermúdez-Puga ,SA; Sánchez-Yumbo ,AF; Yáñez-Galarza, JK; Ortega-Andrade, H ; Naranjo-Briceño, L. 2021. Amphibious chytridiomycosis, a lethal pandemic disease caused by the killer fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*: New approaches to host defense mechanisms and techniques for detection and monitoring. *Revista Bionatura* 6 (1):1628-1629. Disponible en: [DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.28](https://doi.org/10.21931/RB/2021.06.01.28).
- Ron S; Merino A. 2000. Amphibian declines in Ecuador: overview and first report of chytridiomycosis from South America. *Froglog*, 42: 2–3.

- Ron, S. 2005. Predicting the Distribution of the Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica*, 37(2), 209–221.
- Ron, S. R; Merino-Viteri, A; Ortiz, D. A. 2021. Anfibios del Ecuador. Versión 2020.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Versión PDF descargada de: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb>
- Rosenblum, E. B ; Poorten, T. J; Settles, M; Murdoch, G. K. 2012. Only skin deep: shared genetic response to the deadly chytrid fungus in susceptible frog species. *Mol.Ecol.*21, 31103120. <https://doi.org/10.1111/j.1365294X.2012.05481.x>
- Sabagh, L. T; Carvalho-e-Silva, A. 2008. Feeding overlap in two sympatric species of *Rhinella* (Anura: Bufonidae) of the Atlan.
- Scharrer, E. 1958. Molting cycles in the toad, *Bufo marinus*. *The Anatomical Record* 130:369.
- Scheele B.C; F. Guarino, W; Osborne, D.A; Hunter, L.F; Skerratt & D.A. Driscoll. 2017. After the epidemic: Ongoing declines, stabilizations and recoveries in amphibians afflicted by chytridiomycosis. *Biol. Conserv.* 206: 37–46.
- Scheele, B. C; Hunter, D. A; Grogan, L. F; Berger, L; Kolby, J. E; McFadden, M. S; Marantelli, G; Skerratt, L. F; Driscoll, D. A. 2014. Interventions for reducing extinction risk in chytridiomycosis-threatened amphibians. *Conservation biology : the journal of the Society for Conservation Biology*, 28(5), 1195–1205. <https://doi.org/10.1111/cobi.12322>
- Schild, L. 2010. The epithelial sodium channel and the control of sodium balance. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*1802, 1159-1165. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.06.014>
- Schloegel L; Toledo L; Longcore J; Greenspan S; Conrado A; Lee M; Zhao S; Wangen C; Ferreira C; Hipolito M; Davies A; Cuomo C; Daszak P; James T. 2012. Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology*, 21: 5162–5177.

- Schmeller, D. S., Blooi, M., Martel, A., Garner, T. W. J., Fisher, M. C., Azemar, F., Clare, F. C., Leclerc, C., Jäger, L., Guevara-Nieto, M., Loyau, A., & Pasmans, F. (2014). Microscopic aquatic predators strongly affect infection dynamics of a globally emerged pathogen. *Current biology : CB*, 24(2), 176–180. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.11.032>.
- Schoch CL, et al.2020. Taxonomía de NCBI: una actualización completa sobre curación, recursos y herramientas. Base de datos (Oxford): [baaaa062](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa062) . PubMed: [32761142](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32761142/) PMC: [PMC7408187](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7408187/) .
- Shin, J., Bataille, A., Kosch, T. A., y Waldman, B. 2014. Swabbing often fails to detect amphibian Chytridiomycosis under conditions of low infection load. *PloS one*, 9(10), e111091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111091>
- Stuart, S; Chanson, J; Cox,N; Young, B;Rodrigues,A;Fischman,D;Waller,R. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306,1783-1786.<https://doi.org/10.1126/science.1103538>
- Tedersoo, L.S; Sánchez-Ramírez, U; Kõljalg, M ; Bahram, M; Döring, D; Schigel, T ; May, M; Ryberg & Abarenko V. 2018. High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity* 90(1): 135–159.
- Van Meter, R. J., Glinski, D. A., Purucker, S. T., & Henderson, W. M. (2018). Influence of exposure to pesticide mixtures on the metabolomic profile in post-metamorphic green frogs (*Lithobates clamitans*). *The Science of the total environment*, 624, 1348–1359. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.175>
- Van Rooij, P., Martel, A., D'Herde, K., Brutyn, M., Croubels, S., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., & Pasmans, F. (2012). Germ tube mediated invasion of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibian skin is host dependent. *PloS one*, 7(7), e41481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041481>.
- Van Rooij, P; Martel, A; Haesebrouck, F; Pasmans, F 2015. Amphibian chytridiomycosis: a review with focus on fungus-host interactions. *Veterinary Res.* 46(1): 137.

- Villacís, S Zurita, J. 2002. Especialización: La Ranicultura como fuente de Divisas para el Ecuador. Tesis de Grado en Economía en Gestión Empresarial. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Instituto de Ciencias Humanísticas y Económicas. Guayaquil, Ecuador.
- Vitt, L; Caldwell, J. 2014. Herpetology . Amsterdam [etc.], Academic Press an imprint of Elsevier.
- Voyles, J; Vredenburg, VT; Tunstall, TS; Parker, JM; Briggs, CJ; Rosenblum, EB. 2012. Pathophysiology in mountain yellow-legged frogs (*Rana muscosa*) during a chytridiomycosis outbreak. *PloS One*, 7(4), e35374.
- Voyles, J; Young, S; Berger, L; Campbell, C; Voyles, WF; Dinudom, A; Cook, D; Webb, R; Alford, RA; Skerratt, LF; Speare, R. 2009. Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science*, 326, 582-585.
- West J. 2018. Importance of Amphibians: A Synthesis of Their Environmental Functions, Benefits to Humans, and Need for Conservation. At BSU Honors Program Theses and Projects. Article 261. Disponible en: http://vc.bridgew.edu/honors_proj/261 Copyright © 2018 Josh West
- Woodhams, D. C; Geiger, C. C; Reinert, L. K; Rollins-Smith, L. A; Lam, B; Harris, R. N; Briggs, C. J; Vredenburg, V. T; Voyles, J. 2012. Treatment of amphibians infected with chytrid fungus: learning from failed trials with itraconazole, antimicrobial peptides, bacteria, and heat therapy. *Diseases of aquatic organisms*, 98(1), 11–25. <https://doi.org/10.3354/dao02429>
- Woodhams, D. C; Alford, R. A; Marantelli, G. 2003. Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Diseases of aquatic organisms*, 55(1), 65–67. <https://doi.org/10.3354/dao055065>
- Woodhams, D. C; Bosch, J; Briggs, C. J; Cashins, S; Davis, L. R; Lauer, A; Muths, E; Puschendorf, R; Schmidt, B. R; Sheafor, B; Voyles, J. 2011. Mitigating amphibian disease: strategies to maintain wild populations and control chytridiomycosis. *Frontiers in zoology*, 8(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-8-8>.

Wright, K. M. 2006. Overview of Amphibian Medicine. *Reptile Medicine and Surgery*, 941–971. [doi:10.1016/b0-72-169327-x/50079-1](https://doi.org/10.1016/b0-72-169327-x/50079-1)

Wu, N. C., Cramp, R. L., & Franklin, C. E. 2017. Living with a leaky skin: upregulation of ion transport proteins during sloughing. *Journal of Experimental Biology*, 220(11), 2026-2035.

ANEXOS

Anexo 1



Foto 1. Localidad de muestro T1 perteneciente a la parroquia de Belisario Quevedo

Foto 2. Localidad de muestro T2 perteneciente a la parroquia de Juan Montalvo



Foto 3. Localidad de muestro T3 perteneciente a la parroquia de San Buenaventura

Anexo 2

Toma de muestras adultos



Foto 4. Búsqueda de ranas mediante método de relevamiento por encuentros visuales



Foto 5. Visualización e identificación del individuo a muestrear.



Foto 6. Captura y manipulación del individuo para posterior toma de muestras.



Foto 7. Toma de muestra mediante hisopado de las ingles del individuo



Foto 8. Toma de muestra mediante hisopado de porción ventral del individuo



Foto 9. Toma de muestra mediante hisopado de porción dorsal del individuo



Foto 10. Toma de muestra mediante hisopado de los flancos izquierdo y derecho del individuo



Foto 11. Toma de muestra mediante hisopado de las membranas interdigitales del individuo

Anexo 3

Foto 12a. Estadios en metamorfosis en renacuajos según Gosner, (1960).

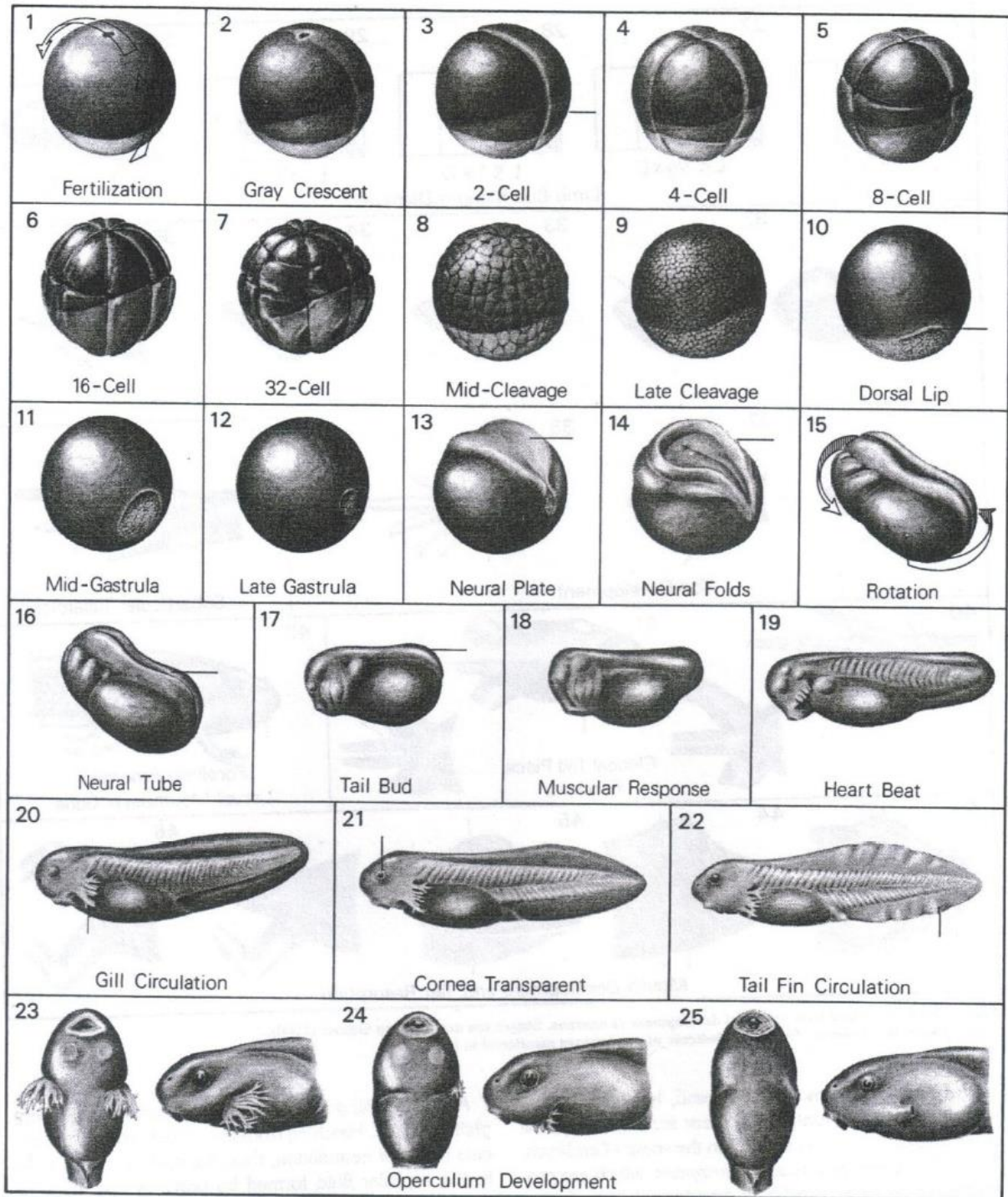


Figure 5-17. Standard early stages of development of anurans. Stages are according to Gosner (1960). Guidelines indicate major features mentioned in text.

Foto 12b. Estadios en metamorfosis en renacuajos según Gosner, (1960).

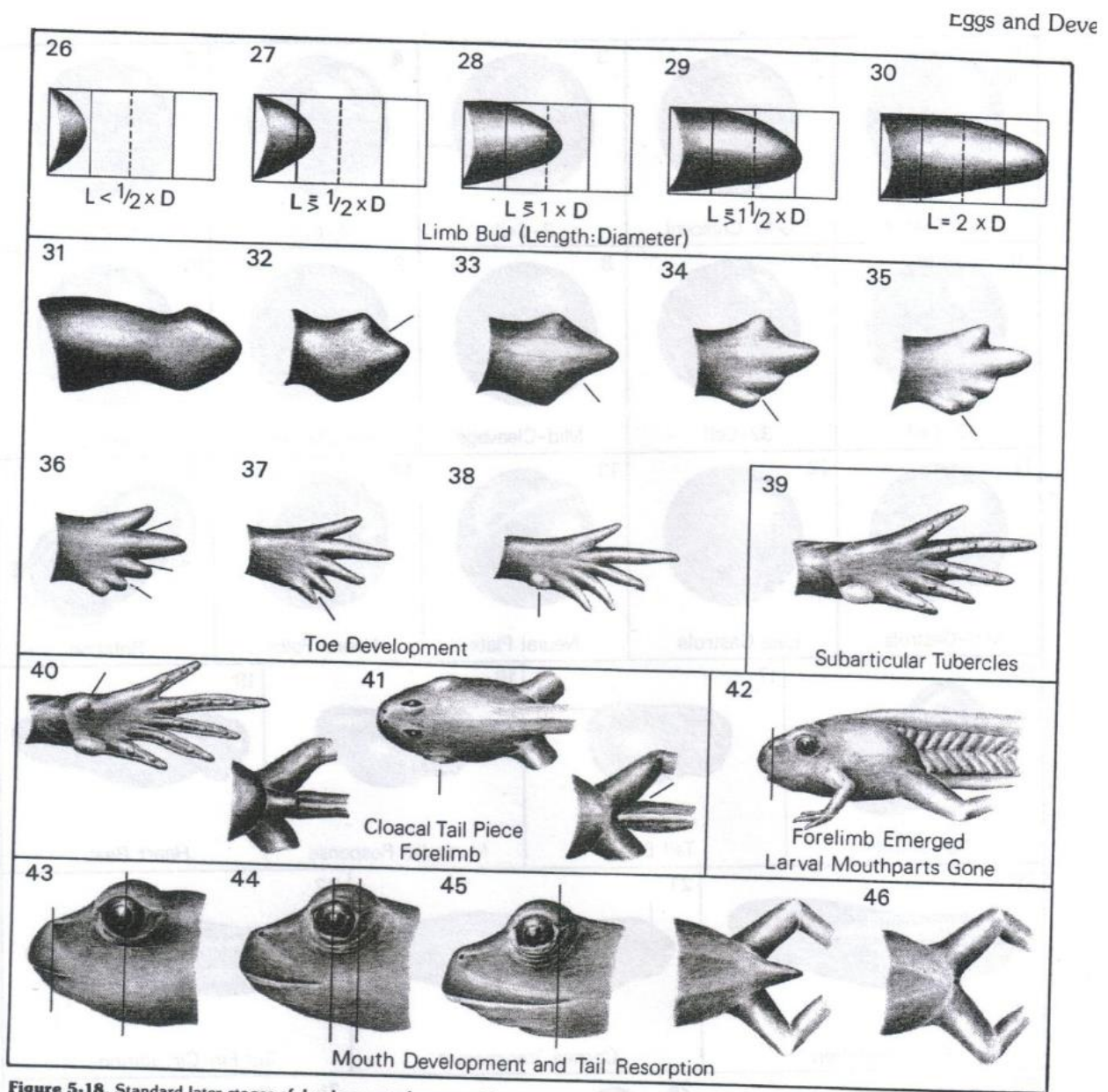


Figure 5-18. Standard later stages of development of anurans. Stages are according to Gosner (1960). Pigmentation is not shown. Guidelines indicate major features mentioned in text.

Anexo 4

Toma de muestras de renacuajos



Foto 13. Antes de iniciar la captura se buscaron alrededor de las pozas de agua que se forman después de la lluvia o a su vez en el agua estancada de las fuentes de riego.



Foto 14. Hisopado de la pieza bucal, girando el hisopo de 5 a 8 veces.



Foto 15. Hisopado de la pieza bucal, girando el hisopo de 5 a 8 veces



Foto 16. Hisopado de la pieza bucal, girando el hisopo de 5 a 8 veces

Anexo 5

Identificación de cada anfibio adulto de *G.riobambae* muestreado

T1

Foto 17. Anfibio (macho) identificado con el código A1T1.



Foto 18. Anfibio (macho) identificado con el código A2T1.



Foto 19. Anfibio (macho) identificado con el código A3T1



Foto 20. Anfibio (macho) identificado con el código A4T1



Foto 21. Anfibio (macho) identificado con el código A5T1



Foto 22. Anfibio (macho) identificado con el código A6T1



Foto 23. Anfibio (macho) identificado con el código A7T1



T2

Foto 24. Anfibio (macho) identificado con el código A8T2



Foto 25. Anfibio (macho) identificado con el código A9T2



Foto 26. Anfibio (macho) identificado con el código A10T2



Foto 27. Anfibio (macho) identificado con el código A11T2



Foto 28. Anfibio (hembra) identificado con el código A12T2



Foto 29. Anfibio (hembra) identificado con el código A13T2



Foto 30. Anfibio (hembra) identificado con el código A14T2



Foto 31. Anfibio (hembra) identificado con el código A15T2



Foto 32. Anfibio (macho) identificado con el código A16T2



T3

Foto 33. Anfibio (macho) identificado con el código A1T3



Foto 34. Anfibio (macho) identificado con el código A2T3



Foto 35. Anfibio (macho) identificado con el Código A3T3



Foto 36. Anfibio (macho) identificado con el código A4T3



Foto 37. Anfibio (macho) identificado con el código A5T3



Foto 38. Anfibio (macho) identificado con el código A6T3



Foto 39. Anfibio (macho) identificado con el código A7T3



Foto 40. Anfibio (macho) identificado con el código A8T3



Foto 41. Anfibio (macho) identificado con el código A9T3



Foto 42. Anfibio (macho) identificado con el código A10T3



Foto 43. Anfibio (macho) identificado con el código A11T3



Anexo 6

Procesamiento de las muestras biológicas colectadas, y extracción ácidos desoxirribonucleicos (ADN)

Foto 44. Muestras de hisopos con material genético de *B. dendrobatidis*



Foto 45. Perlas de zirconia



Foto 46. Tubos rotulados con un código único por muestra recolectada



Foto 47. Peso de los tubos eppendorf para su posterior adición de 0.02 a 0.03 g de perlas de zirconia



Foto 48. Peso y encerado de tubo eppendorf de 1.5ml



Foto 49. Tubo eppendorf más
perlas de zirconia pesadas



Foto 50. Adición de 50 μ l de buffer
PrepMan Ultra



Foto 51. Se incorporaron los
hisopos a las mezclas anteriores

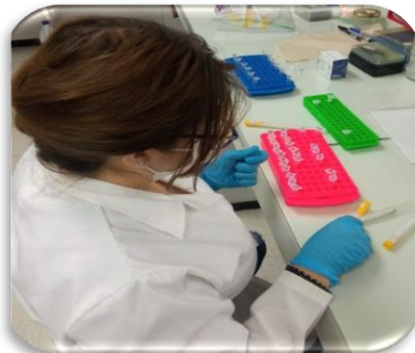


Foto 52. Uso del vortex para permitir la unión de las perlas de zirconia con el algodón del hisopo



Foto 53. Se centrifugaron las muestras a 1300rpm durante un lapso de 2 minutos



Foto 54. Incubador



Foto 55. El sobrenadante obtenido, se transfirió a los tubos eppendorf de 0.5 ml, con la ayuda de una micropipeta



Foto 56. Muestras en refrigeración



Anexo 7

Cuantificación de ADN de las muestras tomadas en renacuajos y anfibios adultos de *G. riobambae*.

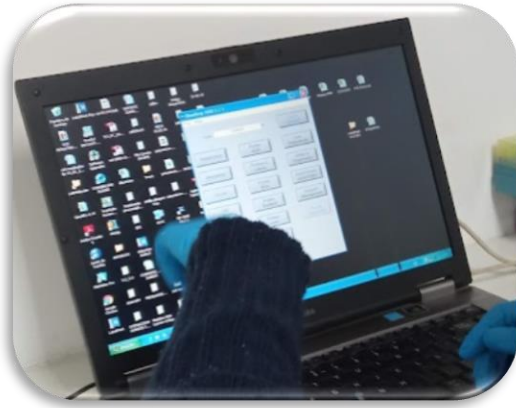


Foto 57. Iniciamos corriendo el programa NanoDrop en el computador.



Foto 58. Limpieza del lente después de cada uso

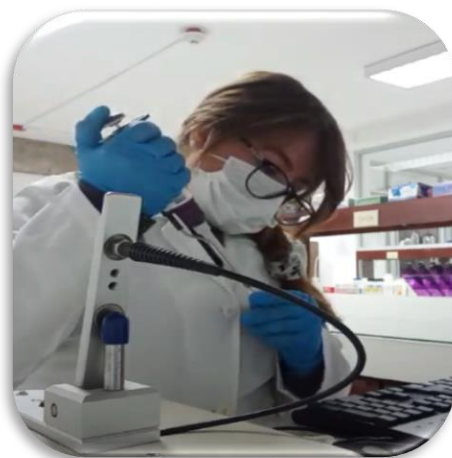


Foto 59. Con la ayuda de la Micropipeta extraemos 0.15 μ l de ADN



Foto 60. Añadimos el material en la platina y en nuestra libreta de apuntes copiamos los resultados tomando en cuenta la concentración y pureza de las muestras.

Anexo 8

Amplificación de los productos mediante electroforesis en gel de agarosa



Foto 61. Cuando la solución esta lista se la coloca en el molde, en conjunto con los peines, que nos ayudan a formar los pocillos para colocar las muestras.

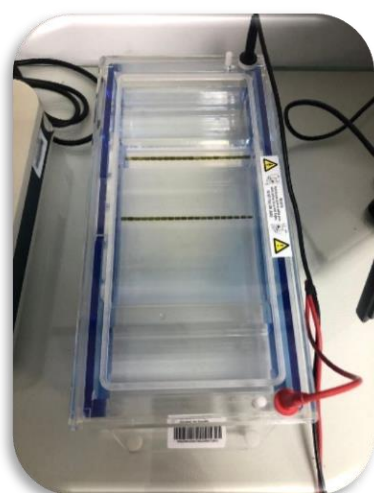


Foto 62. Una vez la muestra se encuentra solidificada se retiran los toques y agregamos el gel en la cámara de electroforesis, se cubre con la solución TAE y se retiró el peine.



Foto 63. Se encendió la cámara de electroforesis durante 90 minutos a un voltaje de 120.



Foto 64. Se observa el corrido en los geles.

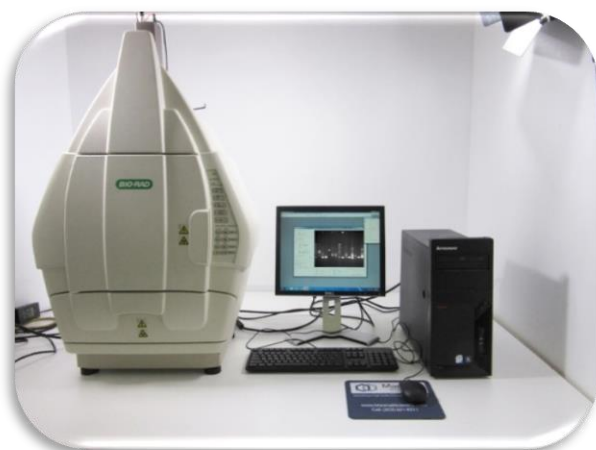


Foto 65. Se visualizaron las bandas con la ayuda de un fotodocumentador.

TABLAS

Tabla 5 Valores de precipitación y temperatura obtenidos de los boletines diarios de “Instituto Nacional de meteorología e Hidrología” (INAMHI)

RANGO DE DÍAS	PRECIPITACIÓN (MM)	TEMPERATURA (°C)
30 de diciembre- 3 enero 2023	8-11	5-20
4 al 8 de enero 2023	12-27	6-20
8 al 13 de enero 2023	12-27	7-18

Tabla 6 Cuantificación de ADN de las muestras tomadas en renacuajos de *G.riobambae*

Numero de Poza	Código del individuo	ng/μl
Poza 1	R1P1	160.2 ng/μl
	R2P1	215 ng/μl
	R3P1	111.1 ng/μl
	R4P1	103.2 ng/μl
Poza 2	R5P2	122.6 ng/μl
	R6P2	113.5 ng/μl
	R7P2	175.9 ng/μl
	R8P3	87.7 ng/μl
Poza 3	R9P3	96.7 ng/μl
	R10P3	114.4 ng/μl
	R11P3	140.6 ng/μl
	R12P3	137.9 ng/μl

Nota: Cantidad de ADN que se pudo obtener en las muestras de hisopado pertenecientes a renacuajos de *G.riobambae*

Tabla 7 Cuantificación de ADN de las muestras tomadas en anfibios adultos de *G. riobambae*.

<i>Localidad M.</i>	Código del individuo	ng/μl
<i>T 1</i>	A1T1	60 ng/μl
	A2T1	111.2 ng/μl
	A3T1	154.3 ng/μl
	A4T1	177.6 ng/μl
	A5T1	165.5 ng/μl
	A6T1	65.6 ng/μl
	A7T1	67.6 ng/μl
<i>T 2</i>	A8T2	84.6 ng/μl
	A9T2	147 ng/μl
	A10T2	132.5 ng/μl
	A11T2	52.6 ng/μl
	A12T2	211.4 ng/μl
	A13T2	164.2 ng/μl
	A14T2	92.4 ng/μl
	A15T2	104,7 ng/μl
	A16T2	94.30 ng/μl
<i>T 3</i>	A1T3	245.1 ng/μl
	A2T3	67.9 ng/μl
	A3T3	113.9 ng/μl
	A4T3	86.7 ng/μl
	A5T3	120.2 ng/μl
	A6T3	115.8 ng/μl
	A7T3	150 ng/μl
	A8T3	68.1 ng/μl
	A9T3	86.8 ng/μl
	A10T3	137.6 ng/μl
	A11T3	109.7 ng/μl

Nota: Cantidad de ADN que se pudo obtener en las muestras de hisopado pertenecientes a ranas adultas de *G.riobambae*

**Tabla 8 Reactivos de la premezcla para la fase de amplificación en la
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de punto final para la
identificación del quítrido *B. dendrobatidis***

PREMEZCLA A 20RX			
Reactivos	Cantidad por reacción	Total para 20 Rx	Especificaciones
H2O de PCR	18.3 µl	365 µl	Grado PCR
Buffer de PCR	2.5 µl	50 µl	Buffer de reacción (-MgCl2) 1.25 ml. Invitrogen
MgCl2 (Cloruro de Magnesio)	1.5 µl	30 µl	50 mM MgCl2 1 ml. Invitrogen
dNTP's (Solución de Desoxirribonucleótidos trifosfatos)	0.5 µl	10 µl	100 mM dNTP Set, Grado PCR. Invitrogen
Primer F	0.5 µl	10 µl	5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3' Tm=53.6 °C, PM=5,803.8
Primer R	0.5 µl	10 µl	5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3' Tm=50.3 °C, PM=6,083.0
Taq	0.25 µl	5 µl	Taq DNA Polymerasa Recombinante. 500 unidades (5U/µL). Invitroge
TOTAL	24.05 µl	480 µl	
PREMEZCLA B 20RX			
Reactivos	Cantidad por reacción	Total para 20 Rx	Especificaciones
H2O de PCR	18.3 µl	365 µl	Grado PCR
Buffer de PCR	2.5 µl	50 µl	Buffer de reacción (-MgCl2) 1.25 ml. Invitrogen
MgCl2 (Cloruro de Cagnesio)	1.5 µl	30 µl	50 mM MgCl2 1 ml. Invitrogen
dNTP's (Solución de Desoxirribonucleótidos trifosfatos)	0.5 µl	10 µl	100 mM dNTP Set, Grado PCR. Invitrogen
Primer F	0.5 µl	10 µl	5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3' Tm=53.6 °C, PM=5,803.8
Primer R	0.5 µl	10 µl	5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3' Tm=50.3 °C, PM=6,083.0
Taq	0.25 µl	5 µl	Taq DNA Polymerasa Recombinante. 500 unidades (5U/µL). Invitroge
TOTAL	24.05 µl	480 µl	

Tabla 9 Registro de los datos obtenidos de las poblaciones de *G.riobambae*

Zona de Muestreo	Día de muestreo	Localidades de M	Esfuerzo de búsqueda (min', seg'')	Código del individuo	Macho (M) o Hembra (H)
T1	1	T1a	45'20''	A1T1	M
	1	T1a	50'50''	A2T1	M
	1	T1a	26'47''	A3T1	M
	2	T1b	97'34''	A4T1	M
	2	T1b	95'25''	A5T1	M
	3	T1c	92'17''	A6T1	M
	3	T1c	89'56''	A7T1	M
T2	1	T2a	55'21''	A8T2	M
	1	T2a	40'10''	A9T2	M
	1	T2a	29'17''	A10T2	M
	2	T2b	87'34''	A11T2	M
	2	T2b	75'55''	A12T2	H
	2	T2b	92'17''	A13T2	H
	3	T2c	89'56''	A14T2	H
	3	T2c	34'12''	A15T2	H
	3	T2c	77'11''	A16T2	M
	3	T2c	77'11''	A16T2	M
T3	1	T3a	54'37''	A1T3	M
	1	T3a	67'39''	A2T3	M
	1	T3a	10'11''	A3T3	M
	1	T3a	15'01''	A4T3	M
	2	T3b	14'33''	A5T3	M
	2	T3b	54'37''	A6T3	M
	2	T3b	20'37''	A7T3	M
	2	T3b	64'06''	A8T3	M
	3	T3c	2'50''	A9T3	M
	3	T3c	26'23''	A10T3	M
	3	T3c	34'32''	A11T3	M

Tabla 10 Resultados negativos del corrido de PCR punto final en renacuajos de *G.riobambae*

Numero de Poza	Código del individuo	Resultado
Poza 1	R1P1	Negativo
	R2P1	Negativo
	R3P1	Negativo
	R4P1	Negativo
Poza 2	R5P2	Negativo
	R6P2	Negativo
	R7P2	Negativo
Poza 3	R8P3	Negativo
	R9P3	Negativo
	R10P3	Negativo
	R11P3	Negativo
	R12P3	Negativo

Tabla 11 Resultados negativos del corrido de PCR punto final en ranas adultas de *G.riobambae*

Localidad M.	Código del individuo	Resultado
T 1	A1T1	Negativo
	A2T1	Negativo
	A3T1	Negativo
	A4T1	Negativo
	A5T1	Negativo
	A6T1	Negativo
	A7T1	Negativo
	A8T2	Negativo
	A9T2	Negativo
	A10T2	Negativo
	A11T2	Negativo
T 2	A12T2	Negativo
	A13T2	Negativo
	A14T2	Negativo
	A15T2	Negativo
	A16T2	Negativo
	A1T3	Negativo
T 3	A2T3	Negativo
	A3T3	Negativo
	A4T3	Negativo
	A5T3	Negativo
	A6T3	Negativo
	A7T3	Negativo
	A8T3	Negativo
	A9T3	Negativo
	A10T3	Negativo
	A11T3	Negativo