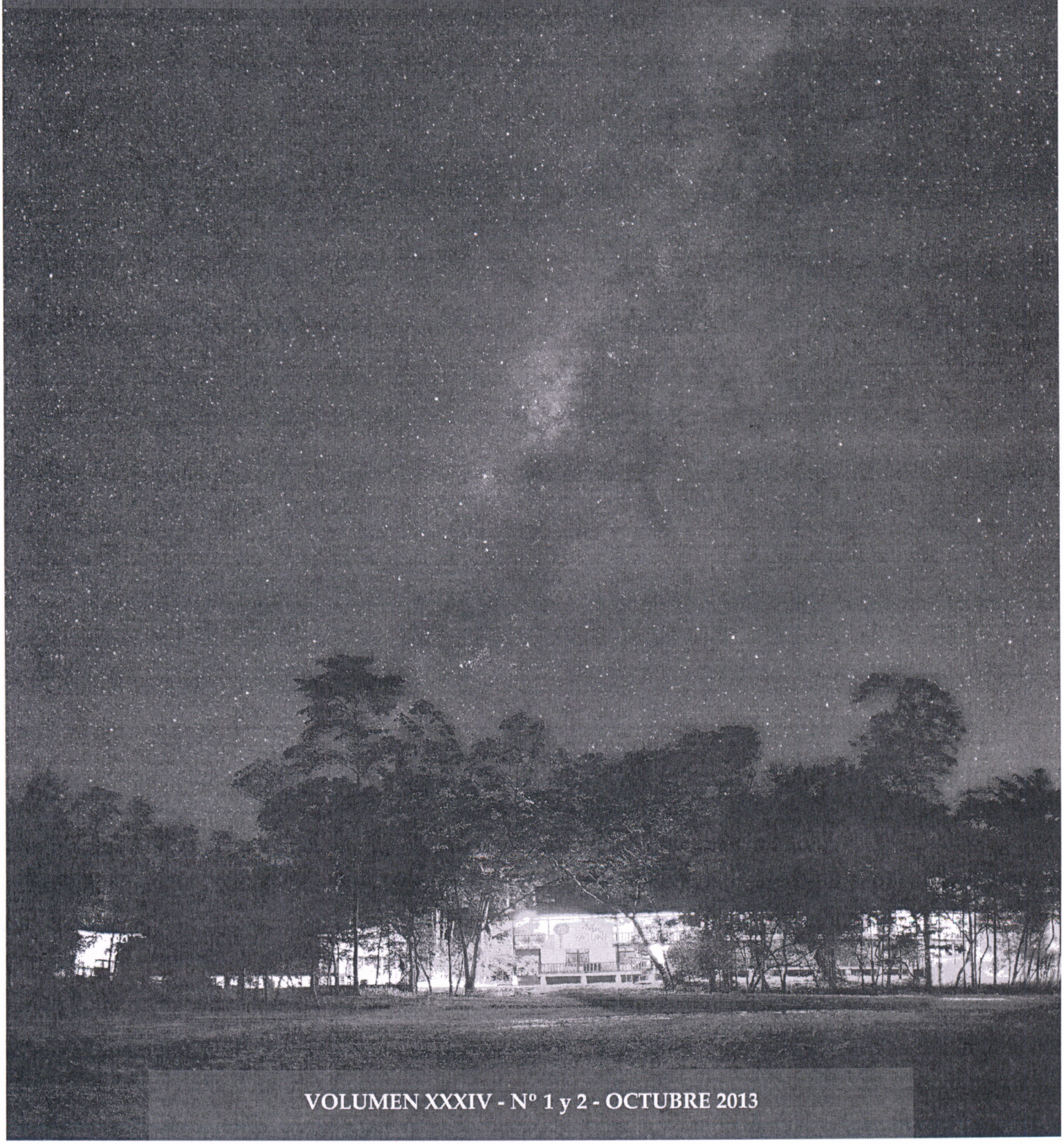
ISSN 0034-9313

REVISTA ECUATORIANA DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS



VOLUMEN XXXIV - Nº 1 y 2 - OCTUBRE 2013

ISSN 0034-9313

REVISTA ECUATORIANA DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS

VOLUMEN XXXIV - Nº 1 y 2 - OCTUBRE 2013

Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas
Volumen XXXIV Números 1 y 2 - octubre 2013
ISSN 0034-9313

Impresión:
Centro de Publicaciones



Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Av. 12 de Octubre 1076 y Roca, Quito, Ecuador

Corrección de estilo: Alfonso Sánchez

QualityPrint Cía. Ltda., Quito, Ecuador
Diseño y diagramación: Claudia Hernández Mora



Fotografía portada (Noche en la Estación Científica Yasuní): Rubén D. Jarrín E.
Fotografía contraportada: (Hongo ramificado de Yasuní): Lucas M. Bustamante

REVISTA ECUATORIANA
DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS

Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Rector: Dr. Manuel Corrales Pascual, S.J.

Casa de la Cultura Ecuatoriana Benjamín Carrión

Presidente: Sr. Raúl Pérez Torres

Sociedad Ecuatoriana de Ciencias Biológicas, Núcleo de Pichincha

Presidente: Dr. Jaime Costales Cordero

Editores:

Dr. Carlos A. Soria Proaño[1] (Ciencias Naturales)

[1]Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Dr. Sergio Barba [1,2,3] (Medicina)

[1]Sociedad Ecuatoriana de Alergología, Inmunología y Ciencias Afines

[2]Universidad Central del Ecuador; [3]Centro médico AXXIS, Quito

La Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas (REMCB) (ISSN 0034-9313) es un órgano de difusión científica auspiciada por la Casa de la Cultura Ecuatoriana Benjamín Carrión, la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y la Sociedad Ecuatoriana de Biología, núcleo de Pichincha. La REMCB se encuentra incluida en el Citation Index Expanded, se publica anualmente y está dirigida a científicos nacionales e internacionales así como a estudiantes de las Ciencias de la Vida. Para solicitud de sobretiros o cualquier correspondencia relacionada con la revista, favor dirigirse a: Dr. Carlos A. Soria, Quito-Ecuador. E-mail: revecuatorianamedycb@gmail.com o en la sección de contacto en la página web http://www.puce.edu.ec/revistaciencia.

El contenido de los artículos científicos y de las publicaciones que aparecen en la revista son responsabilidad exclusiva de sus autores o de los auspiciantes y no representan necesariamente el sentir de los editores de la REMCB, quienes no se responsabilizan por errores o por las consecuencias surgidas por el uso del material que aparece publicado en la misma.

Estructuración genética de muestras del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* en Ecuador

María del Carmen Vizcaíno[1], Charles W. Barnes[2] y María Eugenia Ordóñez[1]

[1] Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito

[2] Centro de Investigación de la Biodiversidad y Cambio Climático, Universidad Tecnológica Indoamérica, Quito.

meordonez@puce.edu.ec

Recibido: 30, 06, 2013; aceptado: 10, 09, 2013

RESUMEN.- El hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), causante de la quitridiomicosis, ha ocasionado severos impactos en las poblaciones de anfibios a nivel mundial. El objetivo de la presente investigación fue estudiar la variabilidad genética de muestras del hongo tomadas de hospederos de diferentes localidades en el Ecuador, para determinar si *Bd* ha sido introducido recién o si es nativo en el Ecuador. Se analizó la región ITS1-5.8S-ITS2 de ADN ribosomal (ADNr) del hongo. Se identificaron 11 haplotipos en el Ecuador, de los cuales 6 fueron únicos para el país; lo cual sugiere que estos podrían ser endémicos. Los análisis de diversidad genética indican que existe poca variabilidad genética en las muestras de *Bd* analizadas. Esto sugiere una introducción reciente del patógeno al Ecuador. A pesar que no se observó un patrón de diferenciación geográfico o de hospedero entre los diferentes haplotipos, la diversidad de haplotipos encontrada sugiere que pudo haber múltiples eventos de introducción del hongo al país, relativamente recientes.

PALABRAS CLAVES: *Batrachochytrium dendrobatidis*, diversidad genética, quitridiomicosis, región ITS ADNr

ABSTRACT.- The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), which causes chytridiomycosis, has contributed to the decline of amphibian populations worldwide. The objective of this research was to study the genetic variability of this fungus from samples from different localities to determine if *Bd* has been recently introduced or is native to Ecuador. We analyzed the ITS1-5.8S-ITS2 ribosomal DNA (rDNA) of the fungus. Eleven haplotypes were found for Ecuador; of which six were unique to the country, suggesting that they may be endemic. Analyses of genetic diversity indicate that there was little genetic variability in the *Bd* samples analyzed, which would suggest a recent introduction of the pathogen. However, while there was no geographic pattern of

differentiation or host association between haplotypes, the diversity found suggests that there may have been multiple independent introductions of the fungus into the country, but relatively recently.

KEYWORDS: *Batrachochytrium dendrobatidis*, chytridiomycosis, genetic diversity, ITS region rDNA

INTRODUCCIÓN

La quitridiomicosis, causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) (Longcore *et al.*, 1999), ha sido catalogada como la enfermedad emergente más devastadora en los anfibios a nivel mundial (Morgan *et al.*, 2007). Fue identificado por primera vez en 1998 y descrito en 1999 y confirmó la hipótesis que un patógeno era el causante de muertes masivas de anfibios en Australia, Estados Unidos, Costa Rica y Panamá (Collins y Crump, 2009; James *et al.*, 2009; Longcore *et al.*, 1999). Hasta el momento se han reportado 350 especies infectadas por este hongo, de las cuales 200 han declinado o se han extinguido por esta causa, incluso en lugares remotos y prístinos (Skerratt *et al.*, 2007; Fisher *et al.*, 2009).

Se han planteado dos hipótesis sobre el origen de *Bd*. La primera, conocida como hipótesis del patógeno nuevo o de la dispersión del patógeno, sugiere que este es de aparición reciente en los sitios vulnerables (Berger *et al.*, 1999). La segunda, la hipótesis del patógeno endémico, sugiere que este ha estado presente con su hospedero, ya sea como comensal o simbionte y se ha vuelto virulento debido a cambios ambientales que afectan la dinámica patógeno-hospedero (Rachowicz *et al.*, 2006). Sin embargo, Goka *et al.* (2009) basados en secuencias de la región ITS del ADN ribosomal, sugieren que una combinación de ambas hipótesis estaría explicando la pandemia actual del hongo.

Estudios de diversidad genética en muestras de *Bd* procedentes de América del Norte, África y Australia, han encontrado niveles extremadamente bajos de diferencias en las secuencias de ADN nuclear y mitocondrial entre cepas del hongo (James *et al.*, 2009; Morehouse *et al.*, 2003). Esta poca diferenciación genética sugiere que las cepas de distintos continentes tienen un reciente ancestro común y no han evolucionado separadamente por mucho tiempo (Whittaker y Vredenburg, 2010). Los datos moleculares existentes hasta el momento sugieren un único origen de *Bd* con evidencia de dispersiones locales e internacionales, que apoyan la hipótesis del patógeno nuevo. Los descubrimientos de que *Bd* es un organismo diploide, de baja diversidad genética y alta heterocigosidad, sugieren que la globalización de este linaje es producto del apareamiento entre cepas parentales no idénticas, pero cercanamente relacionadas y heterotálicas (Fisher *et al.*, 2009).

Ecuador es uno de los países con mayor diversidad de anfibios a nivel mundial, con 535 especies registradas, de las cuales 42 % son endémicas (Ron *et al.*, 2013). Sin embargo, también es uno de los países con mayor número de especies amenazadas, pues alcanza un 31.3 % (Ron *et al.*, 2013). Estudios previos sobre *Bd* en Ecuador se han limitado a determinar su presencia y es muy poco lo que se conoce sobre su origen o mecanismos de transmisión. El objetivo del presente estudio fue determinar la variabilidad genética de la región ITS1-5.8S-ITS2 de ADN ribosomal (ADNr) de muestras del hongo tomadas de hospederos de diferentes localidades en el Ecuador, para indicar si *Bd* ha sido introducido recién o si es nativo en el Ecuador. Si *Bd* ha sido introducido recién se esperaría obtener una baja diversidad genética y poca diferenciación en las poblaciones analizadas, mientras que si este patógeno lleva un largo período en el Ecuador, la variabilidad genética y la diferenciación serían altas debido a una mayor asociación evolutiva con el área (Morgan *et al.*, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de *B. dendrobatidis*.- Se analizaron un total de 62 muestras de ADN de *Bd* que representan 11 provincias del país; de estas, 46 muestras son procedentes de anfibios infectados de 16 localidades del Ecuador, entre el 2008 y 2009, que se encontraban almacenadas a -20 °C en el Laboratorio de Biología Molecular del Museo de Zoología QCAZ de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (Tabla 1); y 16 provienen de dos estudios realizados por Manzano (2010) y Sáenz (2011). La distribución de las muestras analizadas se encuentra en la Figura 1.

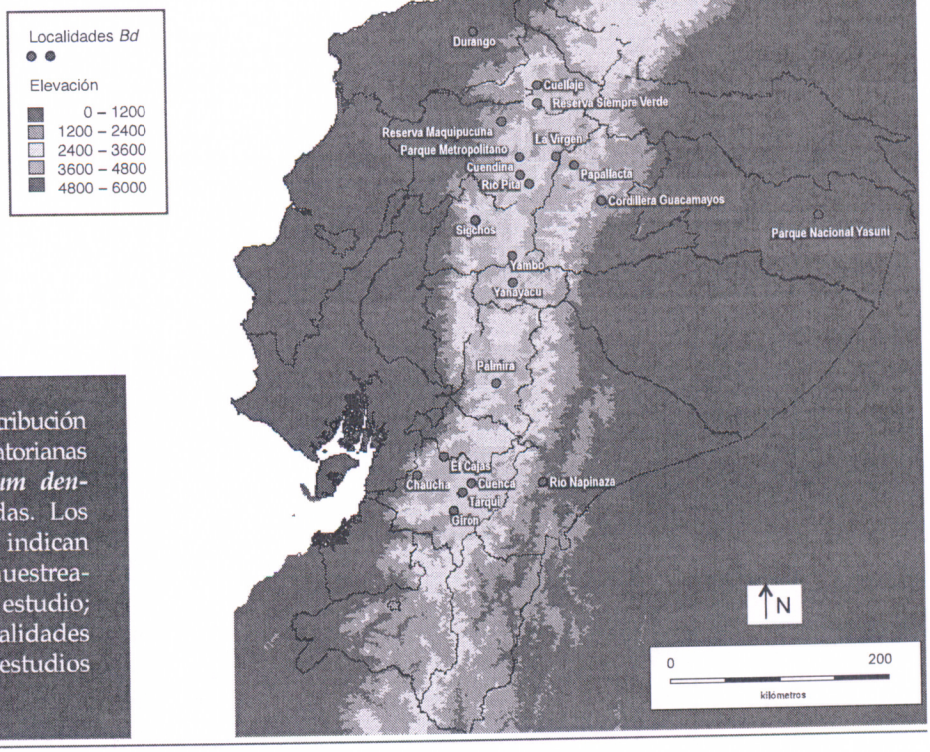


Figura 1. Mapa de distribución de las muestras ecuatorianas de ***Batrachochytrium dendrobatidis*** analizadas. Los círculos morados indican las localidades muestreadas en el presente estudio; los azules, las localidades muestreadas en estudios anteriores.

Tabla 1

Muestras ecuatorianas de *Batrachochytrium dendrobatidis* utilizadas en el estudio[Δ]

Especie	No.	Haplotipo	Provincia	Localidad	Procedencia	Modo de reproducción v	
						Puesta	Larva
Agalychnis spurrelli	1	H1	Esmeraldas	Durango	Silvestre	Arborícola	Charcas, troncos, huecos
Atelopus exiguus	1	H1	Azuay	Girón	Cautiverio	Acuática	Arroyo
Atelopus sp.	4	H1	Morona Santiago	Río Napinaza	Silvestre	Acuática	Arroyo
Bolitoglosssa peruviana	1	H1	Orellana	PNY	Silvestre	Arborícola	Desarrollo directo
*Engystomops petersi**	1	H1	Orellana	PNY	Silvestre	Terrestre	Charcas, arroyos lentos
Gastrotheca litonedis	1	H1	Azuay	Cuenca	Cautiverio	Marsupio	Charca
Gastrotheca pseustes	12	H1, H5	Azuay, Chimborazo, Cotopaxi, Pichincha	Girón, PNC, Sigchos, Palmiraw, La Virgenw	Cautiverio, silvestre	Marsupio	Charca
Gastrotheca riobambae	15	H1, H2, H3	Azuay, Cotopaxi, Pichincha	Cuenca, Yambo, PM∞, Cuendinaw	Cautiverio, silvestre	Marsupio	Charca
Gastrotheca sp.	2	H1	Azuay	Chaucha, PNC	Cautiverio	Marsupio	Charca
Hyloxalus jacobuspetersi	1	H1	Pichincha	Río Pita	Silvestre	Terrestre	Arroyo
*Leptodactylus discodactylus**	2	H1	Orellana	PNY	Silvestre	Terrestre	Charca
*Leptodactylus pentadactylus**	4	H7, H8, H9, H10	Orellana	PNY	Silvestre	Terrestre	Charca
*Leptodactylus rhodomystax**	1	H1	Orellana	PNY	Silvestre	Terrestre	Charca
Nelsonophryne aequatorialis	5	H1, H3	Azuay	Tarqui	Cautiverio	Terrestre	Charca
Osornophryne guacamayo	2	H1	Napo	Cordillera de los Guacamayos	Silvestre	Terrestre	Desarrollo directo
Pristimantis achatinus	2	H1	Pichincha	Reserva Maquipucuna	Silvestre	Terrestre	Desarrollo directo
*Pristimantis aureolineatus**	3	H1, H11	Orellana	PNY	Silvestre	Terrestre	Desarrollo directo
Pristimantis calcarulatus	1	H1	Indeterminada	Oso Verde	Silvestre	Terrestre	Desarrollo directo
Pristimantis conspicillatus	1	H4	Morona Santiago	Río Napinaza	Silvestre	Terrestre	Desarrollo directo
Pristimantis festae	7	H1, H2	Napo, Pichincha	Papallactaw, La Virgenw	Silvestre	Terrestre	Desarrollo directo
Pristimantis kirklandi	1	H1	Tungurahua	Yanayacu	Silvestre	Terrestre	Desarrollo directo
*Pristimantis lanthanites**	1	H1	Orellana	PNY	Silvestre	Terrestre	Desarrollo directo
Pristimantis leoni	1	H1	Imbabura	Reserva Siempre Verde	Silvestre	Terrestre	Desarrollo directo
*Pristimantis ockendeni**	1	H6	Orellana	PNY	Silvestre	Terrestre	Desarrollo directo
Pristimantis sp.	3	H1, H4	Morona Santiago	Río Napinaza	Silvestre	Terrestre	Desarrollo directo
*Pristimantis waoranii**	4	H1, H11	Orellana	PNY	Silvestre	Terrestre	Desarrollo directo
Raebo cf. *glaberrimus*	1	H1	Morona Santiago	Río Napinaza	Silvestre	Terrestre	Arroyo lento

ΔCuatro muestras con datos indeterminados no constan en la tabla.
*Secuencias de ADN procedentes del estudio de McCracken et al., 2009.
• Las muestras de cautiverio provienen de la Balsa de los Sapos de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
PNY: Parque Nacional Yasuní
PNC: Parque Nacional Cajas
PM∞: Parque Metropolitano, muestras procedentes del estudio de Manzano (2010).
wLocalidades de las muestras procedentes del estudio de Sáenz (2011).
vSegún Ron et al., 2012

Análisis de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosomal.- Para la amplificación del ADN ribosomal, se utilizó la técnica de PCR anidado según Goka *et al.* (2009). Las muestras amplificadas fueron secuenciadas por la compañía Macrogen (Seúl, Corea). Las secuencias obtenidas fueron alineadas y analizadas con el programa Geneious 5.4.6 (Drummond *et al.*, 2010) y comparadas con las secuencias internacionales disponibles en GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) de Bai *et al.* (2012), Kaiser y Pollinger (2012) y Schloegel *et al.* (2012), Tupper *et al.* (2011), Gaertner *et al.* (2009), Goka *et al.* (2009), Federici *et al.* (2009), McCracken *et al.* (2009), Rodriguez y Hirt (2009). La alineación final fue ajustada manualmente en el programa Mesquite 2.75 (Maddison y Maddison, 2011).

Se utilizó el programa TCS (Templeton, Crandall y Sing) versión 1.21 (Clement *et al.*, 2000) para realizar una red de haplotipos de las secuencias ecuatorianas y las secuencias internacionales. Se consideraron como poblaciones a las provincias y los países. Las secuencias incompletas fueron eliminadas para evitar falsos haplotipos debido a bases faltantes; sin embargo, se mantuvieron las secuencias incompletas compartidas entre poblaciones. Se calcularon las distancias genéticas de Nei entre las diferentes poblaciones con el programa GenAlEx V.6.41 (Peakall y Smouse, 2006). Igualmente, se realizó un análisis molecular de variancia (AMOVA), para determinar si existía subdivisión genética dentro y entre las poblaciones analizadas, mediante el mismo programa. En el análisis a nivel mundial las poblaciones fueron los países; y en el análisis local, fueron las provincias. Se buscaron diferencias a nivel global, entre los haplotipos encontrados en el Ecuador con los de otros países incluidos en este estudio y a nivel local, se analizaron los haplotipos encontrados en las diferentes provincias del país. En este último caso, los análisis se enfocaron en determinar si existen diferencias relacionadas con las diferentes localidades (provincias); regiones (norte-sur del país), se tomaron en cuenta como provincias del norte a: Esmeraldas, Pichincha, Napo, Orellana, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo; y como provincias del sur a: Azuay y Morona Santiago; procedencia (silvestre-cautiverio); hospederos; y modo de reproducción del hospedero, se tomó en cuenta la puesta de los huevos: acuática, terrestre, arborícola o marsupio; y el desarrollo larvario de cada género: arroyo, desarrollo directo y/o charca (Tabla 1). El nivel de significación de todos los estadísticos calculados se basó en 999 permutaciones.

RESULTADOS

En total se encontraron 11 haplotipos (H1 – H11) en las muestras ecuatorianas, los cuales difieren en deleciones y sustituciones de bases (Figura 2). El haplotipo H1 tiene una frecuencia de 0.82 y está compartido por al menos una muestra en cada una de las provincias ecuatorianas incluidas en este estudio, además de las muestras procedentes del terrario y de datos indeterminados (Tabla 1). El haplotipo H3, presente en tres muestras, tuvo una frecuencia de 0.036 y es compartido por las

provincias de Morona Santiago, Pichincha y Azuay. Los haplotipos H2, H4 y H11 tuvieron una frecuencia de 0.024. De estos, el primero fue compartido por las provincias de Napo y Pichincha; el haplotipo H4 corresponde a dos muestras de Morona Santiago, y el haplotipo H11 estuvo compartido por dos muestras de la provincia de Orellana. Los seis haplotipos restantes (H5, H6, H7, H8, H9 y H10) tuvieron una frecuencia de 0.012 y son únicos para cada muestra, cinco pertenecen a la provincia de Orellana y uno a la provincia de Pichincha (Tabla 1).

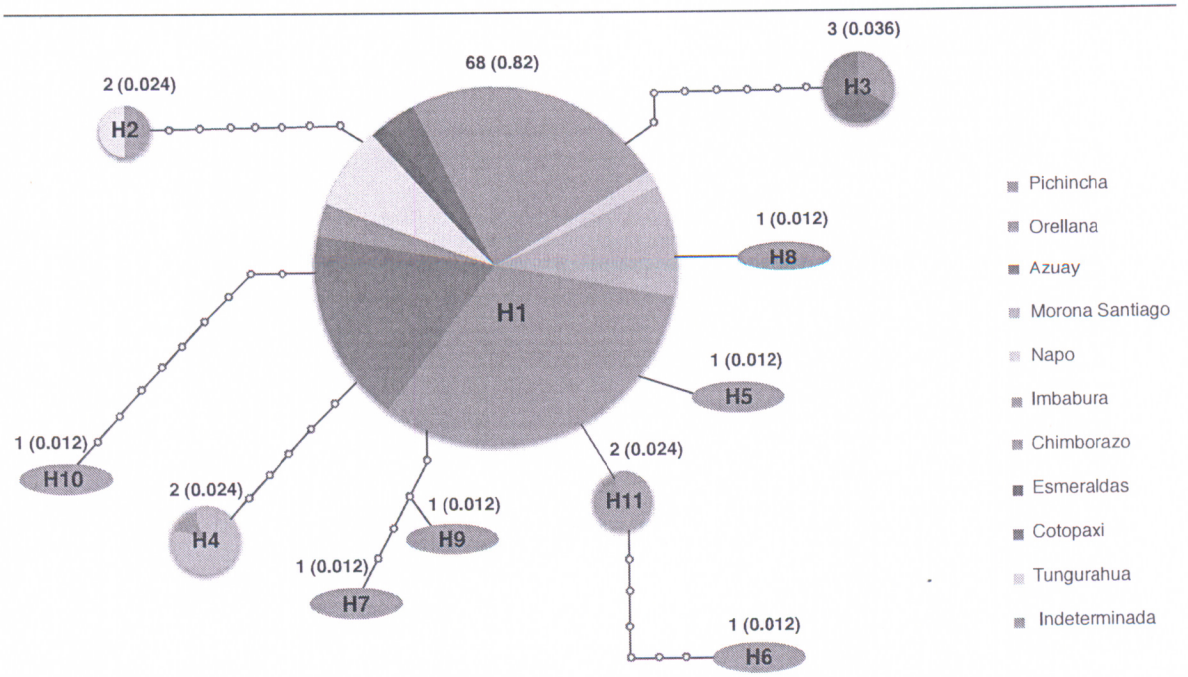


Figura 2. Red de haplotipos de la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal de muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis* procedentes de diferentes localidades del Ecuador. La forma y tamaño de las figuras están dados por la frecuencia de cada haplotipo. Los números dentro de cada figura simbolizan a los diferentes haplotipos. Los números sobre las figuras indican las frecuencias absolutas y relativas de cada haplotipo. Las localidades de las cuales provienen los haplotipos se encuentran en la Tabla 1.

En el análisis de haplotipos internacionales estuvieron representados 9 países además del Ecuador: Bélice, Brasil, China, Estados Unidos, Italia, Japón, Panamá, Perú y Sudáfrica. Se encontraron 99 haplotipos en las 260 secuencias incluidas en el análisis (Figura 3). El haplotipo con mayor frecuencia fue H1 con 109/260 (0.42) y se encuentra en todos los países analizados. Los haplotipos compartidos entre Ecuador y otros países son: H1 (compartido con todos los países), H2 (con Estados Unidos), H6 (con China y Japón), H8 (con China) y H11 (con Bélice, China y Sudáfrica) (Figura 3a). Los haplotipos H3, H4, H5, H7, H9, y H10 son únicos para Ecuador (Figura 3b). De los demás haplotipos, 14 fueron compartidos entre algunos de los países analizados; y 85 fueron únicos para los diferentes países (Figura 3b).

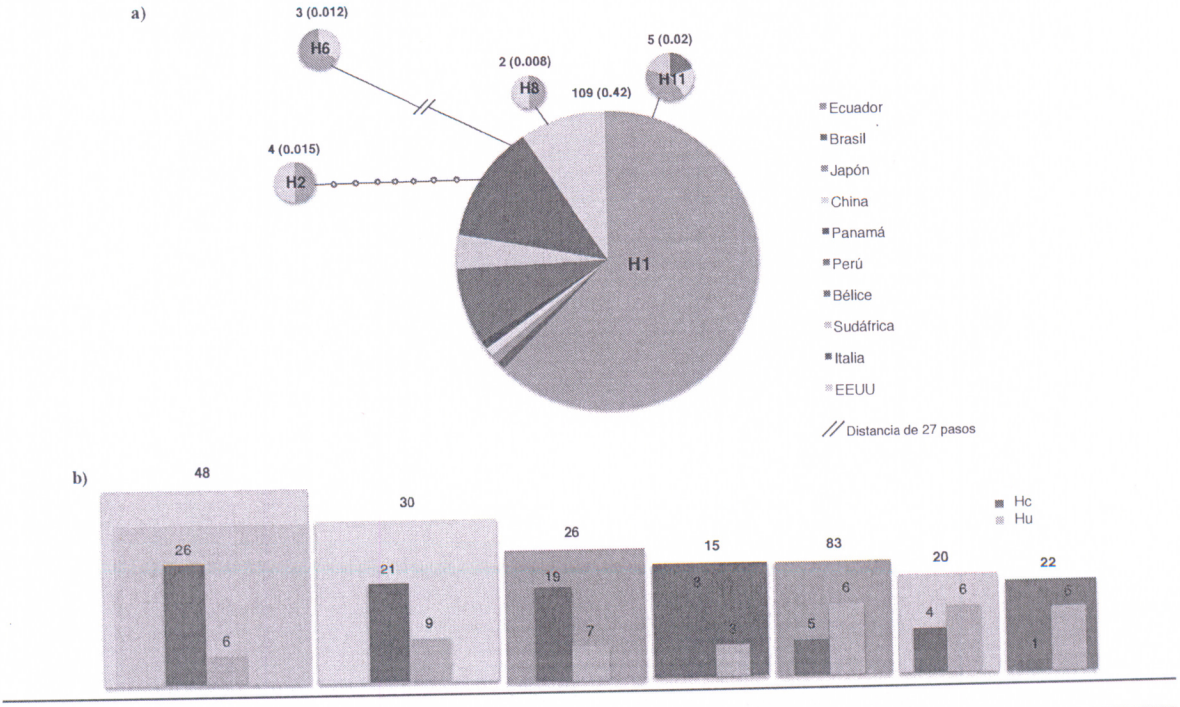


Figura 3. Red de haplotipos de la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal de muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis* a nivel mundial. a) Se indican únicamente los haplotipos compartidos entre Ecuador y los otros países incluidos en el estudio. La forma y tamaño de las figuras están dados por la frecuencia de cada haplotipo. Los números dentro de cada figura simbolizan a los diferentes haplotipos. Los números sobre las figuras indican la frecuencia absoluta y relativa de los haplotipos. b) Los cuadrados representan el total de haplotipos encontrados en cada país, el tamaño de cada uno es proporcional al número de haplotipos. Las barras dentro de los cuadrados representan los haplotipos de cada país: en gris oscuro, el número de haplotipos compartidos (Hc) de ese país, con otros países; y en gris claro, el número de haplotipos únicos (Hu) para cada país. Los números sobre los cuadrados indican el número de muestras de cada país. No se incluyeron las muestras de Italia (14), Panamá (1) y Perú (1) ya que presentaron únicamente un haplotipo (H1).

Los resultados del AMOVA realizado para evaluar diferenciación genética entre y dentro de las poblaciones del Ecuador, revelaron que no existen diferencias significativas entre las poblaciones analizadas en el Ecuador (Tabla 2). Al considerar diferencias entre dos regiones (norte-sur) del país (Φ_{PT} 0.032 P ≥ 0.051), entre provincias (Φ_{PT} 0.089 P ≥ 0.077), por procedencia del hospedero (silvestre-cautiverio) (Φ_{PT} 0.004 P ≥ 0.269), especie de hospedero (Φ_{PT} -0.003 P ≥ 0.496), y modo de reproducción del hospedero (terrestre con desarrollo directo, terrestre en nido de espuma, acuático, marsupial) (Φ_{PT} -0.072 P ≥ 0.865); el mayor porcentaje de la variación se encontró dentro de las poblaciones sin diferencias significativas entre ellas (Tabla 2).

El AMOVA realizado entre las muestras del Ecuador y las de los países incluidos en este estudio (tomados en cuenta como una población diferente)

reveló diferencias significativas (Φ_{PT} 0.199 $P \geq 0.002$) (Tabla 2), con el mayor porcentaje de variación dentro de las poblaciones (80 %). La variación entre países es mayor a la encontrada entre las muestras ecuatorianas (Tabla 2).

En relación con las distancias genéticas, Brasil presenta la mayor distancia genética de Nei comparado con Ecuador (0.035), seguida de Japón (0.013), Sudáfrica (0.012) y Estados Unidos (0.009). Por el contrario, no existe diferencia genética con Italia (Tabla 3).

Tabla 2

Análisis molecular de la varianza (AMOVA) de los haplotipos de la región ITS1-5.8S- ITS2 de ADN ribosomal de *Batrachochytrium dendrobatidis* encontrados en el Ecuador, agrupados por regiones, provincias, procedencia del hospedero, modo reproductivo del hospedero y poblaciones internacionales del hongo

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Φ_{PT}	P≥
Entre poblaciones (norte-sur*)	1	1.933	0.030	3	0.032	0.051
Dentro de poblaciones	81	74.899	0.925	97		
Total	**82**	**76.831**	**0.955**			
Entre poblaciones (provincias)	9	13.472	0.085	9	0.089	0.077
Dentro de poblaciones	73	63.360	0.868	91		
Total	**82**	**76.831**	**0.952**			
Entre poblaciones (silvestres-cautiverio)	1	0.980	0.004	0	0.004	0.269
Dentro de poblaciones	83	71.232	0.858	100		
Total	**84**	**72.212**	**0.862**			
Entre poblaciones (hospederos)	11	5.817	0.000	0	-0.003	0.496
Dentro de poblaciones	83	78.994	0.952	100		
Total	**94**	**84.811**	**0.952**			

Cont. tabla 2

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Φ_{PT}	P≥
Entre poblaciones (modo de reproducción$^{\Delta}$)	4	3.501	0.000	0	-0.072	0.865
Dentro de poblaciones	83	81.263	0.923	100		
Total	**94**	**84.763**	**0.923**			
Entre poblaciones internacionales	9	249.530	0.993	20	0.199	0.002
Dentro de poblaciones internacionales	251	1.001.853	3.991	80		
Total	**260**	**1.251.383**	**4.985**			

*Se tomaron en cuenta como provincias del norte a: Esmeraldas, Pichincha, Napo, Orellana, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo; las provincias del sur fueron Azuay y Morona Santiago.
Δ Para diferenciar el modo reproductivo se tomó en cuenta la puesta de los huevos: acuática, terrestre, arborícola, marsupio; y el desarrollo larvario de cada género: arroyo, desarrollo directo, charca.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la diversidad genética de la población de *Bd* basada en secuencias de la región ITS1-5.8S del ADN ribosomal en el Ecuador es baja. Se identificaron 11 haplotipos, mientras que en las poblaciones internacionales se encontraron 99 haplotipos. La diferenciación genética entre las muestras ecuatorianas no fue significativa, pues indicó que no hay una subestructuración dentro de la población de *Bd* en el Ecuador. La baja diferenciación genética sugiere que la población del *Bd* en el Ecuador es de origen reciente.

Cinco de los once haplotipos encontrados en el Ecuador son compartidos con otros países, lo cual denota la posibilidad de varios eventos de introducción del hongo al país. Los seis haplotipos restantes, únicos para Ecuador, podrían ser endémicos. En Brasil se ha sugerido la presencia de cepas endémicas de *Bd* (Schloegel *et al.*, 2012). En China, Bai *et al.* (2012) también concluyen que podría existir un linaje de *Bd* endémico en ese país, asociado a los hospederos locales. Esto podría ocurrir también en Ecuador, aunque se necesitan mayores estudios para comprobarlo.

La alta diversidad de haplotipos en China (Bai *et al.*, 2010) está relacionada con muestras tomadas del mercado de *Lythobates catesbeianus*. Estudios enfocados en esta rana toro norteamericana muestran que, no solo esta especie está ampliamente distribuida, sino que es portadora de una alta diversidad de genotipos de *Bd* y su invasión pudo contribuir y facilitar el flujo génico intercontinental del hongo (Schloegel *et al.*, 2012; Bai *et al.*, 2010; Goka *et al.*, 2009). En Ecuador los criaderos de esta especie de rana datan de los años ochenta (Villacís y Zurita, 2002), que coincide con el tiempo del primer registro del quítrido en el país, el cual data de 1980 de una muestra de piel infectada de un especímen de *Atelopus bomolochos* (Ron y Merino, 2000). Esto a su vez sugiere que *Bd* estuvo presente cuando el problema de declinaciones de anfibios en el Ecuador era evidente a finales de la década de los 80 (Coloma *et al.*, 2000; Ron y Merino, 2000; Coloma, 1996; Coloma, 1995; Stebbins y Cohen, 1995). No se descarta la posibilidad que *Bd* estuviera presente antes de su detección, posiblemente por que no se evidenciaron síntomas de la enfermedad en los hospederos. Esto podría dar soporte a la hipótesis que el patógeno es endémico al país y, tal vez, fueron los cambios ambientales producidos en la década de los ochenta (Merino, 2001) los que generaron una alteración en la dinámica patógeno-hospedero, permitiendo que los hospederos sean más vulnerables y se iniciara su declinación (Fisher *et al.*, 2009).

El haplotipo H1 fue el más frecuente en el Ecuador y a nivel mundial. Este proviene de una cepa hipervirulenta y es parte del recientemente nominado linaje panzoótico global (GPL, por sus siglas en inglés) ya que ha emergido en al menos cinco continentes durante el siglo XX y está asociado con el inicio de la epizoótia en varios países en Norteamérica, Centroamérica, el Caribe, Australia y Europa (Farrer *et al.*, 2011). Al ser de introducción reciente ha causado fuertes estragos en las poblaciones locales de anfibios (Schloegel *et al.*, 2012; Farrer *et al.*, 2011). Este haplotipo, entonces, pudo haber tenido varios eventos de introducción en diferentes países o también pudo existir flujo génico entre estos. En la provincia de Orellana hay la presencia del haplotipo H1 hipervirulento; sin embargo, no se han registrado declinaciones debido a la infección del hongo en esa zona. Esto podría deberse a una alta defensa inmune por parte de los hospederos que no han sido afectados por cambios en su hábitat (Fisher *et al.*, 2009), como en el caso de los hospederos de tierras altas. Igualmente, podría deberse a un efecto en la patogenicidad del quítrido en tierras bajas, pues las condiciones para el desarrollo de la infección dentro del hospedero podrían ser limitadas. Sin embargo, estudios adicionales sería necesarios para poder confirmar esta aseveración.

Tres haplotipos ecuatorianos se encontraron restringidos al Parque Nacional Yasuní en la provincia de Orellana y fueron reportados por McCracken *et al.* (2009). Esta circunstancia podría ser resultado de un muestreo no representativo de otras provincias o que realmente en Orellana

hay una mayor diversidad de haplotipos. Si se toma en cuenta que las poblaciones de tierras bajas y húmedas no se han visto afectadas por la quitridiomicosis (James *et al.*, 2009; Bustamante *et al.*, 2005; Ron, 2005; La Marca y Lötters, 1997) es posible que existan haplotipos endémicos de *Bd* en esta región que no han sido detectados o descritos. Esto, una vez más, estaría dando soporte a la hipótesis del patógeno endémico, puesto que los anfibios podrían estar conviviendo con cepas del hongo sin que este los estuviera afectando, ya que los anfibios más vulnerables son los que habitan a una mayor altitud (Ron y Merino, 2000).

En Pichincha, Cotopaxi, Morona Santiago y Azuay (Figura 2) se encontraron haplotipos únicos. Al estar estas provincias principalmente ubicadas en tierras altas, en donde se ha visto la mayor vulnerabilidad de los anfibios (Ron y Merino, 2000), se puede sugerir que en estos lugares, otros factores han podido influir en el desarrollo de la quitridiomicosis en los hospederos. Es posible, entonces, que haya la presencia de más haplotipos endémicos en otros sitios del país.

Los resultados del análisis de diferenciación genética para las muestras internacionales presentan diferencias significativas entre países. En los estudios de Bai *et al.* (2012), en China, Kaiser y Pollinger (2012) en Bélice; Schloegel *et al.* (2012) en Brasil y Goka *et al.* (2009), en Japón, se reportan nuevos haplotipos para cada país, lo cual sugiere que existe una alta diversidad genética e inclusive especificidad de nicho entre los haplotipos (Kaiser y Pollinger 2012). La diversidad genética encontrada para *Bd* a nivel internacional pudiera estar relacionada con la rigurosidad de los muestreos que se realicen en cada país.

En general, la baja diversidad genética encontrada en las poblaciones del *Bd* en el Ecuador y la semejanza de haplotipos con poblaciones del hongo de otros países, apoya la hipótesis del patógeno de introducción reciente. Los datos reportados en varios estudios de genética de poblaciones de *Bd*, indican que puede existir un reciente cuello de botella correspondiente a una cepa ancestral diploide (James *et al.*, 2009; Morgan *et al.*, 2007; Morehouse *et al.*, 2003). Tanto la extremada baja variación, como la amplia dispersión de genotipos cercanamente relacionados, proveen un fuerte soporte para la hipótesis del patógeno nuevo. Sin embargo, no se ha encontrado en ninguna de las regiones muestreadas en estos estudios, evidencia del posible origen de la cepa ancestral (James *et al.*, 2009).

AGRADECIMIENTOS

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por la asignación de fondos de investigación PUCE 2010 y 2011. Al Laboratorio de Biología Molecular del Museo de Zoología QCAZ y La Balsa de los Sapos por su colaboración en la elaboración del proyecto. A Miguel Pinto por su asistencia con los programas biostadísticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bai Ch, Liu X, Fisher M, Garner T y Li Y. 2012. Global and endemic Asian lineages of the emerging pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* widely infect amphibians in China. *Diversity and Distributions*, **18**: 307–318.

Bai Ch, Trenton WJ, Garner T y Li Y. 2010. First evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in China: discovery of chytridiomycosis in introduced American bullfrogs and native amphibians in the Yunnan Province, China. *Ecohealth*, **7**(1): 127–134.

Berger L, Speare R y Hyatt A. 1999. Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications, and future directions. En: Campbell, A. (ed.) Declines and disappearances of Australian frogs. *Environment Australia*, pp. 23–33, *Canberra, Australia.*

Bustamante M, Ron S y Coloma L. 2005. Cambios en la diversidad en siete comunidades de anuros en Los Andes de Ecuador. *Biotropica*, **37**: 180–189.

Clement M, Posada D y Crandall K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**(10): 1657–1660.

Collins J y Crump M. 2009. Extinction in Our Times. *Oxford University Press*, Nueva York, EEUU. 273 pp.

Coloma L, Lötters S y Salas A. 2000. Taxonomy of the *Atelopus ignescens* complex (Anura:Bufonidae): designation of a neotipe of *Atelopus ignescens* and recognition of *Atelopus exiguus*. *Herpetologica*, **56**: 303–324.

Coloma L. 1996. Systematics, morphology and relationship of *Atelopus* (Anura:Bufonidae). En: Program notes and abstracts of the 39th *Annual Meeting of the Society for the Study of the Amphibians and Reptiles*, pp. 47. The University of Kansas, Lawrence, Kansas, USA.

Coloma L. 1995. Ecuadorian frogs of the genus *Colostethus* (Anura:Dendrobatidae). *Miscellaneous publications of the Natural History Museum, University of Kansas*, No. 87.

Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C, Field M, Heled J, Kearse M, Markowitz S, Moir R, Stones–Havas S, Sturrock S, Thierer T y Wilson A. 2010. *Geneious* v 5.4.6. Página de Internet: http://www.geneious.com/ Consultada 12-diciembre-2012.

Farrer RA, Weinert LA, Bielby J, Trenton W, Garner J, Balloux F, Clare F, Bosch J, Cunningham AA, Weldon C, du Preez LH, Anderson L, KosakovskyPond SL, Shahar-Golan R, Henk DA y Fisher MC. 2011. Multiple emergences of genetically diverse amphibian infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**: 18732–18736.

Federici S, Clemenzi S, Favelli M, Tessa G, Andreone F, Casiraghi M y Crottini A. 2009. Identification of the pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibian populations of a plain area in the Northwest of Italy. *Herpetology Notes*, **1**: 33–37.

Fisher M, Garner T y Walker S. 2009. Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time and host. *Annual Review of Microbiology*, **63**: 291–310.

Gaertner J, Forstner M, O'Donnell y Hahn D. 2009. Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in endemic salamander species from central Texas. *EcoHealth*, **6**: 20–26.

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

James T, Litvintseva A, Vilgalys R, Morgan J, Taylor J, Fisher M, Berger L, Weldom C, Preez L y Longcore J. 2009. Rapid global expansion of the fungal disease chytridiomycosis into declining and healthy amphibians populations. *PLoS Pathogens*, 5(5): e10000458.

Kaiser K y Pollinger J. 2012. *Batrachochytrium dendrobatidis* shows high genetic diversity and ecological niche specificity among haplotypes in the Maya mountains of Belize. *Plos One*, **7**: e32113.

La Marca E y Lötters S. 1997. Monitoring of declines in Venezuela *Atelopus* (Amphibia: Anura: Bufonidae). *En* W. Bohme, W. Bischoff & T. Ziegler (eds.). *Herpetologia Bonnensis*. Bonn. Germany: Museum Alexander Koenig, pp. 207–213.

Longcore J, Pessier A y Nichols D. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycology*, **91**: 219–227.

McCracken S, Gaertner J, Forstner J y Hahn D. 2009. Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians from the forest floor to the upper canopy of an Ecuadorian amazon low land rainforest. *Herpetological Review*, **40**: 190–195.

Maddison W P y Maddison D R. 2010. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.73. Página de Internet: http://mesquiteproject.org/ Consultada 12-diciembre-2012.

Manzano A. 2010. Variación estacional en la prevalencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en una población larvaria de la rana marsupial *Gastrotheca riobambae* (Anura: Hemiphractidae) en Quito. *Tesis de Ingeniería en Biotecnología*, Escuela Politécnica del Ejército, Quito, Ecuador.

Merino-Viteri A. 2001. Análisis de las posibles causas de las disminuciones

de poblaciones de anfibios en Los Andes del Ecuador. Tesis de *Licenciatura en Ciencias Biológicas*, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Morehouse E, James T, Ganley A, Vilgaly R, Berger L, Murphy P y Longcore J. 2003. Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone. *Molecular Ecology*, **12**: 395–403.

Morgan J, Vredenburg V, Rachowicz L, Knapp R, Stice M, Tunstall T, Bingham R, Parker J, Longcore J, Moritz C, Briggs C y Taylor J. 2007. Population genetics of the frog–killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**: 13845–13850.

Peakall R y Smouse P. 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**: 288–295.

Rachowicz L, Knapp J, Morgan R, Stice M, Vredenburg V, Parker J y Briggs C. 2006. Emerging infectious disease as a proximate cause of amphibian mass mortality. *Ecology*, **87**: 1671–1683.

Rodriguez E y Hirt M. 2009. Presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* at the head waters of the Mississippi River, Itasca State Park, Minnesota, USA. *Herpetological Review*, **40**: 48–50.

Ron S, Guayasamin J, Yánez-Muñoz M y Merino-Viteri A. 2013. Amphibia-WebEcuador. Version 2013.1. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Página de Internet: http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/anfibios/AnfibiosEcuador Consultada 14-junio-2013.

Ron S R. 2005. Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica*, **37**: 209–221.

Ron S y Merino A. 2000. Amphibian declines in Ecuador: overview and first report of chytridiomycosis from South America. *Froglog*, **42**: 2–3.

Sáenz V. 2011. Genética de poblaciones y prevalencia del hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios de Papallacta y Guamaní, Ecuador. *Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas*, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

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 y James T. 2012. Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology*, **21**: 5162–5177.

Skerratt L, Berger L, Speare R, Cashins S, McDonald K, Phillott A, Hines

H y Kenyon N. 2007. Spread of Chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth*, **4**: 125–134.

Stebbins R y Cohen N. 1995. *A Natural History of Amphibians*. Princeton University Press, Princeton, New, Jersey, USA. pp. 317.

Tupper T, Streicher J, Greenspan S, Timm B y Cook R. 2011. Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Anurans of Cape Cod National Seashore, Barnstable County, Massachusetts, USA. *Herpetological Review*, **42**(1): 62–65.

Villacís S y 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.

Whittaker K y Vredenburg V. 2010. Information on amphibian biology and conservation, Berkeley, California. Página de Internet: http://amphibiaweb.org Consultada 15- noviembre-2010.