

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**  
**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Genética de poblaciones y prevalencia del hongo patógeno *Batrachochytrium*  
*dendrobatidis* en anfibios de Papallacta y Guamaní, Ecuador**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en  
Ciencias Biológicas**

**VERÓNICA SÁENZ CALDERÓN**

**Quito, 2011**

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Verónica Sáenz Calderón ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Santiago Ron

Director de la Disertación

Quito, diciembre 2011

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres quienes no sólo me brindaron el apoyo moral durante estos años sino también el apoyo económico para la realización de esta tesis. Agradezco muy especialmente al Dr. Juan Manuel Guayasamin y al Dr. Santiago Ron, quienes me han guiado con mucha sabiduría y dedicación en el desarrollo de esta tesis.

Les agradezco de manera muy especial la Dra. María Eugenia Ordoñez y al Lcdo. Andrés Merino por sus consejos valiosos en la corrección de la disertación.

Quiero agradecer a Myriam Rivera por los materiales prestados durante la realización de la tesis y por permitirme utilizar el laboratorio. También a María Eugenia Ordoñez y a Charlie Barnes por la ayuda prestada en el laboratorio.

Agradezco de manera especial a Ailín Blasco quien me enseñó los métodos para la realización de la histología.

Gracias a SENESCYT por el equipamiento del laboratorio en el marco del proyecto “Inventario y caracterización Genética y Morfológica de la Diversidad de Anfibios, Reptiles y Aves de los Andes del Ecuador”.

A la PUCE y a mis padres por haber permitido la realización del viaje al congreso que se realizó en Australia sobre enfermedades emergentes de anfibios.

Agradezco a todas las personas que han trabajado en el laboratorio durante el desarrollo de esta investigación. Gracias Andrea Manzano, Diana Flores, Gaby R, Santy, Eli, Nory.

Quiero agradecer a Allan Pessier del Zoológico de San Diego por la ayuda prestada en la identificación de placas histológicas.

Agradezco también a mis amigas Ana Lucia Salgado y Diana Pazmiño por haberme ayudado en las salidas de campo.

Gracias a Diego Páez, Gaby Pozo y a Eduardo Toral por toda la ayuda en la utilización de programas de computación.

A Salomón Ramírez y a Jennifer García por el préstamo de las muestras de *Gastrotheca riobambae* de Cuendina y *Pristimantis curtipes* de Chimborazo para el análisis de la presencia de Quitridiomycosis.

También quiero agradecer a Joyce Longcore por el envío de los controles positivos de *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Finalmente al hospital Carlos Andrade Marín por los equipos prestados para la realización de los análisis histológicos.

## TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	III
TABLA DE CONTENIDOS.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABLAS.....	IX
LISTA DE ANEXOS.....	X
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1. POSIBLES CAUSAS DE LAS DECLINACIONES DE ANFIBIOS.....	5
3.2. BIOLOGÍA DE <i>BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS</i> .....	5
3.3. EFECTOS DE <i>Bd</i> EN ANFIBIOS.....	7
3.4. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	8
3.5. <i>BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS</i> COMO UNA ENFERMEDAD EMERGENTE.....	8
3.6. DECLINACIONES DE ANFIBIOS DEL GÉNERO <i>ATELOPUS</i> .....	10
3.7. OBJETIVOS.....	11
3.7.1. OBJETIVO GENERAL.....	11
3.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
4.1 MUESTREOS RETROSPECTIVOS DE <i>BATRACHOCHYTRIUM</i> <i>DENDROBATIDIS</i> .....	13
4.1.1. MONTAJE HÚMEDO.....	13
4.1.2. HISTOLOGÍA.....	14
4.2. MUESTREOS RECIENTES DE <i>BATRACHOCHYTRIUM</i> <i>DENDROBATIDIS</i> .....	15

4.2.1 COLECCIÓN DE ESPECÍMENES.....	15
4.2.2. FASE DE LABORATORIO.....	17
4.2.2.1 COLECCIÓN DE MUESTRAS PARA LA PCR.....	17
4.2.2.2. EXTRACCIÓN DE ADN.....	17
4.2.2.3.REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	18
4.2.2.4.ELECTROFORESIS.....	21
.	
4.2.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS Y DE REDES DE HAPLOTIPOS DEL GEN DEL ITS.....	21
4.2.4 GENÉTICA DE POBLACIONES.....	23
5. RESULTADOS.....	25
5.1. MUESTREOS RETROSPECTIVOS DE <i>BATRACHOCHYTRIUM</i> <i>DENDROBATIDIS</i> .....	25
5.1.1. MONTAJE HÚMEDO.....	25
5.1.2. DIAGNÓSTICO UTILIZANDO HISTOLOGÍA.....	26
5.2. MUESTREOS RECIENTES DE <i>BATRACHOCHYTRIUM</i> <i>DENDROBATIS</i> .....	27
5.3. ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS.....	28
5.4. FILOGEOGRAFÍA.....	29
5.4.1. ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS A NIVEL MUNDIAL.....	30
6. DISCUSIÓN.....	31
6.1. PREVALENCIA DE QUITRIDIOMICOSIS EN LA ACTUALIDAD.....	32
6.2. VARIACIONES GENÉTICAS ENCONTRADAS EN PAPALLACTA Y LA VIRGEN.....	35
6.3. ANÁLISIS DE VARIACIONES EN ALELOS A NIVEL MUNDIAL.....	36

7. CONCLUSIONES.....	39
8. LITERATURA CITADA.....	40
9. FIGURAS.....	52
10. TABLAS.....	62
11. ANEXOS.....	75

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Mapa de distribución de las poblaciones muestreadas para detectar la presencia/ausencia de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en Ecuador.....	53
Figura 2.	Pieles que se desprenden de <i>Atelopus ignescens</i> . A) Piel sin infección (KU 109226). B) Piel infectada con huevos de un parásito desconocido (KU 201122).....	54
Figura 3.	Pieles que se desprenden de <i>Atelopus ignescens</i> KU 111480. A) Piel tomada sin contraste de fases. B) Piel tomada con contraste de fases.....	55
Figura 4.	Cortes histológicos de <i>Atelopus ignescens</i> A) Piel normal de anfibio (KU109201). B) Piel con hiperplasia (KU 111487).....	56
Figura 5.	Disco oral de boca de renacuajo de <i>Gastrotheca peustes</i> A) Disco oral completo (QCAZ 50000). B) Disco oral con pérdida de pigmentación (QCAZ 50413).....	57
Figura 6.	Productos de PCR en gel de agarosa de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> amplificados con los iniciadores externos Bd18SF1 y Bd28SR1 en la primera amplificación de la PCR anidada y con los iniciadores internos Bd1a y Bd2a en la segunda amplificación.....	58
Figura 7.	Red de haplotipos de la región del ITS1-58s-ITS2 de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> de las localidades muestreadas en Ecuador.....	59
Figura 8.	Filogenia de la región ITS1-58s-ITS2 de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	60

Figura 9.	Red de haplotipos de la región del ITS1-58s-ITS2 de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> que incluye haplotipos ecuatorianos y haplotipos a nivel mundial.....	61
-----------	---	----

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Grado de infección de los renacuajos de <i>Gastrotheca pseustes</i> . . . . .	63
Tabla 2.	Especímenes usados para el análisis filogenético y para la red de haplotipos. . . . .	64
Tabla 3.	Promedio de los parámetros del modelo de evolución del análisis bayesiano. . . . .	70
Tabla 4.	Análisis de presencia/ausencia de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> con montaje húmedo e histología. . . . .	71
Tabla 5.	Probabilidad de encontrar al menos un sapo infectado con histología. . . . .	71
Tabla 6.	Prevalencia de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> por especie de hospedero en mestras ecuatorianas. . . . .	72
Tabla 7.	Prevalencia de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en localidades muestreadas en Ecuador. . . . .	72
Tabla 8.	Frecuencias absolutas de los haplotipos ecuatorianos basados en secuencias de ITS en las diferentes localidades muestreadas . . . . .	73
Tabla 9.	Análisis de varianza molecular AMOVA de las variaciones genéticas entre poblaciones y dentro de poblaciones de las secuencias de Ecuador de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> . . . . .	73
Tabla 10.	Distancias genéticas basadas en los primers Bd1a y Bd2a para los individuos muestreados a nivel mundial. . . . .	74

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Protocolo modificado de Berger <i>et al</i> (2009) para la toma muestra para la realización del montaje húmedo.....	76
Anexo 2.	Proceso de deshidratación e inclusión de la maquina Shandon Excelsior.....	77
Anexo 3.	Protocolo para la tinción de placas con eosina y hematoxilina tomado de Méndez (2010).....	78
Anexo 4.	Protocolo de tinción para hongos Grocott's Methenamine Silver (GMS), utilizando el protocolo modificado de Grocott (Luna, 1968).....	78
Anexo 5.	Método de diagnóstico de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> modificado del protocolo de Berger <i>et al.</i> (1999).....	79
Anexo 6.	Tabla 3 del artículo de Hyatt., 2007.....	80
Anexo 7.	Protocolo del laboratorio de molecular de anfibios PUCE QCAZ para el uso del espectrofotómetro nanodrop y la cuantificación de la concentración del ADN extraído.....	81
Anexo 8.	Secuencias de los haplotipos encontrados en Ecuador.....	82
Anexo 9.	Diagnóstico de quitridiomycosis realizado con montaje húmedo y con histología.....	83
Anexo 10.	Análisis de presencia/ausencia de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> utilizando una PCR anidada.....	95

## RESUMEN

Las declinaciones de anfibios a nivel mundial han sido atribuidas, en gran medida, a *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) el hongo causante de la quitridiomycosis. Dos hipótesis surgieron para explicar la aparición de esta enfermedad: (i) *Bd* ha sido recientemente introducido a nivel mundial o (ii) *Bd* es endémico, pero se ha tornado más patogénico por causa de cambios ambientales.

Para investigar el rol de *Bd* en la extinción del jambato *Atelopus ignescens* se utilizaron dos métodos para detectar la presencia de la enfermedad. El primero, el análisis histológico de la piel de especímenes y, el segundo, la amplificación con PCR de la región del transcrito interno (ITS) del casete del RNA ribosomal. La primera metodología se aplicó a *A. ignescens* depositados en museos de historia natural y colectados entre 1962 y 1987. La segunda metodología, se aplicó en anfibios colectados en 2010 y 2011, en dos localidades históricas de *A. ignescens*. También se comparó la diversidad de haplotipos de la región del ITS de Italia, Japón, Estados Unidos y Ecuador realizando una red de haplotipos.

El análisis de histología resultó negativo para las 107 muestras de *A. ignescens* analizadas. Esto podría deberse a: (i) una baja diversidad genética de *Bd* debido al poco tiempo que el hongo tenido para diversificarse, y (ii) la ausencia de *Bd* en Ecuador antes de las declinaciones. Los resultados obtenidos en el presente estudio se inclinan más hacia la hipótesis del patógeno exótico puesto que hubo poca diferenciación genética entre haplotipos ecuatorianos. También se encontraron varios haplotipos ecuatorianos esto podría haberse generado por varios eventos de llegada o un solo evento con varios haplotipos. Tampoco se encontraron especímenes positivos para el hongo en fechas anteriores a la declinación de *Atelopus ignescens* lo cuál también sería consistente con esta hipótesis.

Por otro lado, la baja estructura geográfica encontrada entre los haplotipos sugeriría que *Bd* tiene una buena capacidad de dispersión. Dado que *Bd* ha sido registrado en África, Asia y América del Norte desde hace más de 100 años, es probable que su distribución haya sido amplia en todo el mundo mucho antes del inicio de las declinaciones de anfibios. La ausencia de *Bd* en los diagnósticos histológicos en Ecuador podría deberse a la alta tasa de falsos negativos característica de esa metodología.

Los muestreos recientes revelaron una alta prevalencia entre individuos de *Pristimantis festae*, *P. thymelensis*, *P. curtipes*, *Pristimantis* sp. y *Gastrotheca pseustes* colectados en Papallacta y Guamaní, ambas localidades históricas de *A. ignescens*. La diferencia en prevalencia entre los muestreos recientes y retrospectivos podría deberse a las diferencias de sensibilidad en técnicas de detección o a un aumento de *Bd*.

Palabras clave: Anfibios - *Atelopus ignescens* - *Batrachochytrium dendrobatidis* - haplotipos- histología

## ABSTRACT

Global amphibian declines have been attributed to *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid fungus that is responsible for the chytridiomycosis disease, has been attributed to either (i) a recent spread of this fungus around the world (as an introduced species) or (ii) *Bd* as an endemic pathogen that increased in virulence due to environmental change.

In order to determine if *Bd* has a role in the extinction of the jambato toad *Atelopus ignescens* we used two methods to determine its presence. The first was an histological method using the skin of extant frogs and the second, the amplification of the internal transcribed spacer (ITS) region of a ribosomal RNA cassette. The first one was used in *A. ignescens* preserved in different museums of natural history and collected between 1962 y 1987. The second method was used in amphibians collected in 2010 and 2011 in places where *A. ignescens* was present in the past. We also used a haplotype network to compare the diversity of haplotypes from Italy, Japan, United States and Ecuador using the ITS region.

We did not find positive specimens before the date of decline of *Atelopus ignescens* in the 107 frogs analyzed. The possible reasons for this are: (i) a low genetic diversity of *Bd* due to the short time for its diversification, and (ii) the absence of *Bd* in Ecuador before the declination time. The results found support hypothesis (i) because we found a low genetic differentiation between haplotypes. We also found a great diversity of Ecuadorian haplotypes possibly due to many introduction events or to one introduction with many haplotypes. Moreover, we did not find any positive *A. ignescens* before its declination time which could be consistent with hypothesis (ii).

The lack of a geographic pattern between the haplotypes also suggests that the fungus has a high dispersion rate. Given the fact that old positive specimens have been discovered in Africa, Asia and North America for a hundred years, it is possible that its distribution

has been high all over the world before the declines of amphibians started. The absence of positive samples using the histology in Ecuador could be due to the high rate of false negatives usually found with the method used.

We found a high prevalence of *Bd* in *Pristimantis festae*, *P.thymelensis*, *P.curtipes*, *Pristimantis* sp. and *Gastrothecapseustes* recently sampled in Papallacta and Guamani, two places where *A. ignescens* was present in the past. The difference in the prevalence between recent and previous samples can be explained by the use of new more sensitive methods or by a recent increase of *Bd*.

Key Words: Amphibian-*Atelopus ignescens*- *Batrachochytrium dendrobatidis*-- histological method-haplotypes.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. POSIBLES CAUSAS DE LAS DECLINACIONES DE ANFIBIOS

Los anfibios han sufrido declinaciones y/o extinciones que han afectado a alrededor del 32% de sus especies (Gewin, 2008; Stuart *et al.*, 2004); esto los convierte en el grupo de vertebrados más amenazado en el planeta (Amphibian Conservation Summit, 2005). Las primeras hipótesis propuestas para explicar las declinaciones observadas fueron la destrucción del hábitat, la presencia de depredadores exóticos y la contaminación (Blaustein y Wake, 1990). Posteriormente, se hipotetizaron tres posibles causas adicionales: los efectos del cambio climático (Herman y Scott, 1992; Pounds y Crump, 1994), enfermedades combinadas a factores climáticos (Carey, 1993; Blaustein *et al.*, 1994a; Pounds *et al.*, 2006) y el incremento en la radiación ultravioleta (Blaustein *et al.*, 1995). La posibilidad de que una enfermedad, por si sola, sea la causante de extinciones masivas fue sugerida por Laurance *et al.* (1996) para explicar las declinaciones observadas en el este de Australia. Poco tiempo después, se propone a la quitridiomycosis como la enfermedad responsable de las disminuciones poblacionales y extinciones en cientos de especies de anfibios (Berger *et al.*, 1998, Bosch *et al.*, 2001; Stuart *et al.*, 2004).

#### 3.2. BIOLOGÍA DE *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS*

El patógeno causante de la quitridiomycosis es *Batrachochytrium dendrobatidis*, (*Bd*) (Longcore *et al.*, 1999), un hongo que pertenece al Phylum Chytridiomycota, Clase Chytridiomycetes y Orden Chytridiales (Berger *et al.*, 1998; Longcore *et al.*, 1999). Este hongo es único ya que es uno de los dos Chytridiomycota que parasitan vertebrados y el único que parasita anfibios (Pessier *et al.*, 1999). Este hongo degrada la queratina,

invadiendo el *stratum corneum* y *granulosum* de la epidermis en anfibios postmetamorfos y los dentículos en renacuajos y es el único que tiene una zoospora flagelada móvil (Berger *et al.*, 1999).

El pH óptimo para el crecimiento de *Bd* es de 6.0 a 7.5, pero también puede crecer en un pH entre 5–8 (Piotrowski *et al.*, 2004). El hongo se desarrolla entre los 4° y 25° C y se reproduce con mayor rapidez a 17–25° C. Temperaturas mayores a 30° C matan al hongo (Longcore *et al.*, 1999). Woodhams *et al.* (2008) demostraron que a pesar de que el crecimiento es más lento bajo 17° C, el número de zoosporas producidas por talo aumenta, y por lo tanto el crecimiento de la población en el huésped puede mantenerse entre 10 y 25° C. También encontraron que cuando la temperatura disminuye bruscamente se estimula la liberación de zoosporas. Berger (2001) y Johnson *et al.*, (2003) sostienen que dado que las zoosporas no tienen pared pueden sucumbir por desecación. Por esta razón *Bd* requiere agua para su reproducción y para estar activo.

El ciclo de vida es una progresión desde la zoospora hasta el talo que produce un único zoosporangio. El ciclo tiene dos estadios: la zoospora móvil, acuática de corta vida, para la dispersión, y el talo estacionario, el cual se desarrolla en zoosporangio para la reproducción asexual. Después del periodo de motilidad (24h) las zoosporas se enquistan, reabsorben el flagelo, forman un germling (esporangio joven), y aparecen rizoides de una o más áreas. El talo se hace más largo y se convierte en esporangio maduro a los 4 o 5 días. Dentro del talo ahora ya llamado zoosporangio se forman zoosporas mientras se forma el tubo de descarga, después las zoosporas son liberadas (Longcore *et al.*, 1999). La duración del ciclo de vida *in vitro* es de 4 a 5 días a 22° C y se asume que es el mismo en la piel de los anfibios (Berger *et al.*, 2005). *Batrachochytrium dendrobatidis* podría reproducirse también por fertilización cruzada o por recombinación sexual (Fisher *et al.*, 2009). La reproducción sexual inicia la producción de esporangios resistentes que le permitirían

dispersión a larga distancia y mantenerse un mayor tiempo fuera del huésped (Morgan *et al.*, 2007).

### 3.3. EFECTOS DE *Bd* EN LOS ANFIBIOS

El hongo no se distribuye en toda la superficie del cuerpo de los anfibios infectados. Se lo encuentra en el *stratum corneum* de los dedos, en la parte ventral (los muslos y la región inguinal) y con menor frecuencia en la región dorsal (Berger *et al.*, 1998, Pessier *et al.*, 1999). Los síntomas clínicos de la quitridiomycosis se manifiestan de tres maneras en adultos: cambios comportamentales, señales neurológicas (letargia, falta de apetito, postura anormal) y lesiones en la piel (Berger *et al.*, 1999; Lips, 1999). Produce hiperplasia de la epidermis, desorden en la posición de las células, y desprendimiento de piel, pero rara vez se observan lesiones visibles a simple vista (Berger *et al.*, 2005). Las infecciones más severas se han encontrado generalmente en el parche pélvico y en las membranas entre los dedos (Longcore *et al.*, 1999; Pessier *et al.*, 1999). La quitridiomycosis generalmente no mata a los renacuajos; los síntomas solo se visualizan en la parte queratinizada localizada en la región oral. Fellers *et al.* (2001) encontraron anomalías incluyendo despigmentación y pérdida de los discos orales, despigmentación de la mandíbula superior e inferior y una hinchazón de las papilas labiales.

Para explicar como un hongo que está restringido a la superficie de la epidermis tiene la capacidad de matar a los sapos Voyles *et al.*, (2009) afirma que *Bd* impide la función osmorreguladora provocando un desbalance de electrolitos causando finalmente un paro cardíaco (Voyles *et al.*, 2009).

### 3.4. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

*Batrachochytrium dendrobatidis* está distribuido en todos los continentes excepto la Antártica (Fisher *et al.*, 2009). A pesar de que la quitridiomycosis puede ser mortal, hay especies de anfibios que no presentan síntomas a pesar de estar infectadas (Garner *et al.*, 2006). La quitridiomycosis puede ser transmitida por contacto directo con un animal infectado (Berger *et al.*, 1998); además, las esporas de *Bd* pueden persistir en el suelo húmedo por tres meses, en el agua hasta por siete semanas, en las plumas de pájaro por 3 horas y detritus de plantas, usando sustratos como la quitina y la queratina (Johnson t Speare, 2005). En la mayoría de especies, la enfermedad afecta solamente a adultos, sin embargo, las larvas pueden subsistir con el hongo en partes de la boca que están queratinizadas, durante meses sin ser afectadas (Berger *et al.*, 1999). Existen también hospederos adultos como *Rana catesbeiana* (Daszak *et al.*, 2004) y *Xenopus laevis* (Weldon *et al.*, 2004) que portan *Bd* pero no mueren por esta enfermedad. También se ha propuesto que el tráfico de anfibios para colecciones de zoológicos (Pessier *et al.*, 1999) y comercio (Mutschmann *et al.*, 2000) podrían haber facilitado la dispersión de *Bd* en todo el mundo.

### 3.5. *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS* COMO UNA ENFERMEDAD EMERGENTE

Las razones para la aparición relativamente reciente de la quitridiomycosis se centran en dos hipótesis, (i) la hipótesis del patógeno exótico y (ii) la hipótesis del patógeno endémico (Rachowicz *et al.*, 2005). La hipótesis del patógeno exótico establece que la enfermedad se ha extendido recientemente hacia áreas geográficas nuevas, infectando

huéspedes que nunca han estado expuestos al patógeno y que, por lo tanto, no presentan defensas contra éste (Alford *et al.*, 2001). Se ha planteado que el medio de dispersión ha sido antropogénico (Fisher *et al.*, 2009). La hipótesis del patógeno endémico sugiere que *Bd* ha estado presente en el ambiente, pero que cambios ecológicos, posiblemente asociados con el cambio climático, aumentan la patogenicidad y el rango de huéspedes (Rachowicz *et al.*, 2005). En efecto, en Costa Rica la sequía provocó la aglomeración de sapos en menos cuerpos de agua facilitando la propagación de la enfermedad (Pounds *et al.*, 1999). El cambio de temperatura también podría haber afectado la expresión de un comportamiento de los anfibios impidiendo que seleccionen micro hábitats donde podrían estar más protegidos (Rachowicz *et al.*, 2005). También existe evidencia de que *Bd* estuvo presente en África y Canadá décadas antes de que los anfibios empezaran a declinar (Weldon *et al.*, 2004; Ouellet *et al.*, 2005). Al momento, existe evidencia de que en algunas zonas del mundo *Bd* ha ampliado su distribución recientemente y se ha ido expandiendo a zonas cercanas (e.g., oeste Australia, Mesoamérica, Sierra Nevada de Estados Unidos, en los Pirineos; véase Fisher *et al.*, 2009 y las referencias allí citadas). La distribución contemporánea de *Bd*, parece haberse extendido considerablemente durante la primera mitad del siglo XX; este patrón de distribución apoya la hipótesis del patógeno nuevo. Adicionalmente, estudios moleculares han demostrado que las diferencias genéticas de *Bd* provenientes de distintas partes del mundo son mínimas, lo que también apoya un origen reciente y rápida dispersión, acorde a lo predicho por la hipótesis del patógeno exótico (James *et al.*, 2006).

### 3.6. DECLINACIONES DE ANFIBIOS DEL GÉNERO *ATELOPUS*

Las declinaciones de anfibios han involucrado a varios géneros de anfibios, sin embargo, éstas han sido catastróficas en las ranas arlequines (*Atelopus* spp). De las 113 especies que han sido descritas o son candidatas para ser descritas, 42 han reducido sus tamaños poblacionales en aproximadamente un 50%, 30 especies no han sido vistas en al menos 8 años y solamente 10 tienen poblaciones estables (La Marca *et al.*, 2005). En Ecuador, varias especies de las zonas altas han declinado (Coloma, 1995, 1997; Lötters, 1996; Coloma *et al.*, 2000, 2010). Posiblemente, el ejemplo más dramático es el del jambato, *Atelopus ignescens*, que no ha sido registrado desde marzo de 1988 (Coloma *et al.*, 2000; Ron *et al.*, 2003), a pesar de haber sido uno de los sapos más comunes y más ampliamente distribuidos en las zonas altas del Ecuador (Rivero, 1963; Peters, 1973). Su rango geográfico abarcaba las provincias de Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Napo, Chimborazo y Bolívar entre los 2800m y 4200m. Su distribución incluye bosques montanos, valles interandinos y páramos del Ecuador en donde *A. ignescens* era endémico (Coloma *et al.*, 2000). Poco antes de las declinaciones, *A. ignescens* alcanzaba densidades de hasta 47 individuos en 120 pers/min en el Páramo de Guamaní (Ron *et al.*, 2003)

Las causas de la declinación podrían ser la degradación del hábitat, la introducción de especies exóticas como la trucha *Onchorhynchus mykiss* y, la aparición del patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* encontrado por primera vez en un *Atelopus bomolochos* en Cañar en 1980 (Merino-Viteri, 2001). El hongo, podría ser el causante de la extinción de *A. ignescens* ya que estas dos especies son parapátricas a *A. ignescens*. A esto se suman otras dos posibles causas de la extinción, el cambio climático y el cambio en la radiación UV (Ron y Merino, 2000; Ron *et al.* 2003). Se ha visto también que períodos secos y calientes, como los reportados en 1987, han coincidido con las declinaciones de esta

especie. La radiación podría haber afectado más a esta especie porque, al habitar los páramos estaría expuesta a un mayor nivel radiación por rayos UV-B. En efecto, los rayos UV-B provocan estrés embrionario, debilita las defensas (Kiesecker y Blaustein 1995) y la pérdida de sensibilidad hacia depredadores, no permitiéndoles defenderse rápidamente (Kats *et al.*, 2000). Se podría también pensar que no sólo se trata de la influencia de un factor sino también de la interacción de varios factores (Ron *et al.*, 2003).

### **3.7. OBJETIVOS**

#### **3.7.1. OBJETIVO GENERAL**

Realizar un análisis retrospectivo de *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Atelopus ignescens* y determinar la prevalencia y filogeografía de las poblaciones actuales en Papallacta y Guamani.

#### **3.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar si *Batrachochytrium dendrobatidis* estuvo presente en las poblaciones de *Atelopus ignescens* de los páramos de Papallacta y Guamaní, antes de que éstas se extinguieran.
- Obtener los haplotipos de *Bd* presentes en Papallacta, Guamaní, Cuendina y Palmira.
- Comparar genéticamente los haplotipos de *Bd* presentes en el Ecuador con los de otras regiones del mundo.

- Determinar la prevalencia de *Bd* en Papallacta y Guamaní en el presente y compararla con prevalencias de Ecuador y de otros países.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 MUESTREOS RETROSPECTIVOS DE *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS*

Para determinar la localidad que iba a ser muestreada en este estudio se colectaron muestras de la piel de individuos de *Atelopus ignescens* ecuatorianos colectados en el museo The University of Kansas Natural History Museum (KU). Estas muestras abarcaron diferentes localidades y fueron colectadas antes de 1986. Se examinaron estas muestras con el método de montaje húmedo hasta encontrar algún espécimen posiblemente infectado con *Bd*. Al encontrar una muestra con posible contaminación con el hongo y para evitar el corte de un número mayor de especímenes, se decidió muestrear únicamente los especímenes pertenecientes a la misma localidad del espécimen infectado y a los lugares cercanos a esta.

Adicionalmente se analizaron especímenes del Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (QCAZ) y se solicitó el préstamo de más especímenes de la misma localidad del Smithsonian Institution Natural Museum of Natural History (USNM).

#### 4.1.1. MONTAJE HÚMEDO

El examen de la piel que se desprende es un método rápido de diagnóstico que se puede realizar en especímenes frescos, congelados o fijados. El diagnóstico, en caso de tener una infección severa, es igual de eficaz que una histología (Berger, 2001). Es común encontrar esporangios vacíos del tamaño del núcleo de la célula de la epidermis del sapo, la pared refractiva del esporangio es una característica para poder identificar al quítrido

(Berger *et al.*, 2009). Cuando el anfibio desprendía piel se la retiró con una pinza, por el contrario, cuando el sapo no desprendía piel se realizó un raspado con agujas de insulina. Generalmente, el raspado contiene varias capas de epidermis lo que impide distinguir las estructuras características del hongo. Las muestras fueron tomadas de lugares diferentes del cuerpo del sapo según la parte que se desprendía, pero en su mayoría las muestras provenían del parche pélvico, las manos y los pies por ser lugares en donde se encuentra el hongo en mayor cantidad. La piel que se desprendió fue analizada usando un protocolo modificado de Berger *et al* (2009) (Anexo 1).

#### **4.1.2. HISTOLOGÍA**

Dado que ciertas estructuras pueden confundirse si existe más de una capa de epidermis en el montaje húmedo, se debe realizar una histología para confirmar lo encontrado. El procesamiento de las muestras para la histología fue realizado en el Hospital Carlos Andrade Marín.

De cada espécimen se tomó una muestra de epidermis de la membrana entre el dedo 3 y 4 del pie izquierdo si el espécimen medía más de 3 cm de largo, o una muestra de 5 x 5 mm del parche pélvico si el individuo medía menos de 3 cm. De cada espécimen se prepararon dos placas portaobjetos con cuatro segmentos de piel cada una.

Para el proceso de deshidratación e inclusión se utilizó el protocolo del Hospital Carlos Andrade Marín (Anexo 2). Los cortes fueron realizados en un micrótomos y el grosor del corte fue de 3µm. Se siguió el protocolo de Méndez (no publicado) para la tinción de placas (Anexo 3). Las placas fueron observadas en un microscopio óptico a 40x y a 100x. En los casos en los que la presencia del quítrido fuese dudosa, se empleó una

tinción con plata específica para hongos llamada Grocott's Methenamine Silver (GMS), utilizando el protocolo modificado de Grocott (Luna, 1968) (Anexo 4).

Se utilizó el método de diagnóstico de Berger *et al.* (1999) para determinar la presencia o ausencia de quitridiomycosis en cortes histológicos (Anexo 5).

Siendo la histología una técnica poco sensible para detectar el hongo (Boyle *et al.*, 2004), se verificó el posible error cometido. Se usaron los datos de la tabla 3 de Hyatt *et al.* (2007) (Anexo 6) para calcular el porcentaje de falsos negativos que podría haber según los días de infección 21 y 42 de. No se usó el día 7 porque en este había 100 % de falsos negativos. Se usaron diferentes prevalencias incluyendo la prevalencia encontrada en la actualidad en Papallacta y Guamaní. En el análisis de poder se incluyeron 26 especímenes de las mismas localidades encontrados negativos por Merino-Viteri (2001), por lo que se trabajó con un número de muestra de 133. Para determinar la probabilidad de encontrar al menos un sapo infectado sabiendo el porcentaje de falsos negativos, el tamaño de la muestra y la prevalencia, se utilizó el programa Probability. Los falsos negativos fueron calculados en el artículo de Hyatt *et al.*, (2007) como el número de individuos que fueron infectados con *Bd* menos el número que detectó la histología.

## **4.2. MUESTREOS RECIENTES DE *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS***

### **4.2.1 COLECCIÓN DE ESPECÍMENES**

Para determinar si *Bd* se encuentra infectando en el presente a las comunidades de anfibios en donde *Atelopus ignescens* estaba distribuido, se realizaron dos salidas de campo al Páramo de Guamaní localizado en la provincia de Napo (78.19969°O, 0.34627°S). La primera fue realizada del 21 al 23 de octubre y la segunda del 29 al 30 de enero.

Se colectaron once *Pristimantis curtipes*, 26 *Pristimantis festae*, cuatro *Pristimantis thymelensis* y un *Pristimantis* sp. (CRAUGASTORIDAE), una *Gastrotheca pseustes* adulta y doce renacuajos de *Gastrotheca pseustes* (HEMIPHRACTIDAE). Estos especímenes habitan en el presente en el Páramo de Guamaní. Adicionalmente se trabajó con muestras de *Gastrotheca riobambae* (HEMIPHRACTIDAE) colectadas en Cuendina (78,4725°O, 0,415118 °S) y muestras de *P. curtipes* (CRAUGASTORIDAE) del Chimborazo (Desierto de Palmira) (78,72319°O, 2,02687°S). Éstas muestras ya habían sido procesadas con PCR de punto final y en este análisis se las volvió a analizar utilizando la PCR anidada (Goka et al., 2009). Las localidades se encuentran en la Fig 1.

Se colectó los animales directamente con la funda en la que iban a permanecer colectados. Cada espécimen fue colectado en una funda separada para evitar contaminación cruzada de quítrido entre especímenes. Se realizó un transecto de 600 m en el camino antiguo desde La Vigen a Papallacta y se muestreó el área levantando todas las piedras a lo largo del transecto durante 2 horas de 12 a 2 pm entre dos personas. Se realizaron frotis de cada uno de los especímenes utilizando nuevos swabs esterilizados (MW&E) y guantes cada vez que se tomó la muestra, evitando de esta manera una contaminación cruzada. Se realizó el frotis de la parte inferior de los sapos pasando diez veces por el parche pélvico, por el dorso, los brazos, pies y manos. Para la colección de renacuajos de *Gastrotheca* se utilizaron redes de malla con agujeros de 0.5 cm. Los renacuajos que fueron encontrados en pozas diferentes fueron colocados en fundas separadas para evitar la contaminación cruzada.

## **4.2.2. FASE DE LABORATORIO**

Se midió el largo en mm de cada renacuajo desde la boca hasta la cola y se determinó el estadio de cada uno. Para determinar el estadio, se lo observó bajo un estéreo microscopio el desarrollo de los dedos de los pies. Sólo renacuajos de estadio entre 37 y 40 fueron analizados (Gosner, 1960), se escogieron estos estadios debido que el renacuajo posee el aparato bucal más desarrollado y con mayor cantidad de queratina (Berger *et al.*, 1999). Se calificó el grado de infección según los parámetros descritos en la Tabla 1.

### **4.2.2.1 COLECCIÓN DE MUESTRAS PARA LA PCR**

Las muestras de los swabs fueron conservadas a 4 grados para evitar la degradación del ADN hasta la realización de la extracción.

Se sacrificó los renacuajos sumergiéndolos en un recipiente distinto con alcohol al 95%, se extrajo el disco bucal debido a que la infección se limita a la zona queratinizada. Para retirar el disco bucal, cada individuo fue sumergido en un recipiente con etanol al 95%. Se revisó si el renacuajo había perdido dientes o filas de dientes y se lo fotografió. Para cortar el aparato bucal se utilizó tijeras previamente esterilizadas. Las muestras del aparato bucal extraídas fueron conservadas en tubos previamente esterilizados con alcohol al 70 %.

### **4.2.2.2. EXTRACCIÓN DE ADN**

La extracción de ADN de swabs y de boca de renacuajos fue realizada a partir del protocolo modificado de Hyatt *et al.*, (2007). Las modificaciones consistieron en la

utilización de 0.002 a 0.003 g de perlas de zirconia (en lugar de 0.003 a 0.004) y en el aumento del tiempo de homogenización y de centrifugación.

En primer lugar se pesó de 0.002 a 0.003 g de perlas de zirconia en tubos de 1.5 ml, se añadió 50 µl de buffer de extracción Prepman Ultra (Sample Preparation Reagent. Applied Biosystems). Cuando el material a extraerse provenía de renacuajos, se cortó el aparato bucal en pedazos y se los colocó en tubos. En el caso de los swabs, se colocó el swab cortado en los tubos después de haberlos rotulados con el número de museo correspondiente. La muestra fue homogenizada con vortex durante dos minutos permitiendo que el swab o la muestra entre en contacto con las perlas de zirconia. Se centrifugó durante dos minutos a 13000 rpm, se repitió la homogenización y la centrifugación, se incubó las muestras en un termobloque a 92° C durante 10 min, se dejó enfriar la muestra durante cinco minutos a temperatura ambiente, se centrifugó durante ocho minutos a 13000 rpm. Finalmente se transvasó el sobrenadante del tubo en un tubo nuevo y se lo almacenó a -80° C.

Se cuantificó la concentración del ADN extraído en ng de ADN/µl, utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (Anexo 7).

#### **4.2.2.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

Existen varias técnicas moleculares para la detección de *Batrachochytrium dendrobatidis*. Una de estas es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de punto final que emplea un par de iniciadores, el Bd1a y el Bd2a, que son específicos para *Bd* y producen un fragmento de aproximadamente 300 pb de la regiones del ITS1 e ITS2 (internal transcribed spacer) del rRNA. Esta técnica tiene la capacidad de detectar un mínimo de 10 zoosporas (Annis *et al.*, 2004).

Los anfibios en estado silvestre generalmente tienen bajos niveles de infección de hongos ya que no han estado expuestos por largos períodos a un mismo ambiente como los anfibios en cautiverio. Los frotis tomados de estos individuos generalmente están cubiertos de tierra y microorganismos sometidos al calor y humedad del campo, lo cual degrada y contamina el ADN del hongo. Esto puede producir falsos positivos o falsos negativos en una PCR (Kriger *et al.*, 2006). Para analizar la secuencia de fragmentos de ADN es esencial obtener productos de PCR más concentrados y específicos. Para lograr este objetivo, Goka *et al.* (2009) desarrollaron una PCR anidada. Se ha demostrado que la PCR anidada es un método con el poder de detectar una región de DNA objetivo con alta especificidad y sensibilidad a pesar de que haya contaminación y ejemplares degradados (Ma *et al.*, 2003). Una PCR anidada utiliza dos pares de iniciadores para un único locus. El primer par también llamado par externo amplifica el locus objetivo para la primera etapa de la PCR; el segundo par de iniciadores, también llamados iniciadores anidados, se unen en el primer producto de PCR y produce un segundo producto de PCR, pero más corto. Si los locus incorrectos fueran amplificados por error en el primer producto de PCR la probabilidad de que esta sea amplificada una segunda vez por un segundo par de iniciadores es menor. Además, al repetir la amplificación, se incrementa la cantidad del gen de DNA objetivo mejorando así la sensibilidad de detección (10x más que la PCR en tiempo real) (Goka *et al.*, 2009).

Con el ADN de cada swab y boca de renacuajo extraído y cuantificado, se procedió a realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada según Goka *et al.* (2009). Se trabajó con una concentración ajustada a 50 ng/ de ADN por reacción de PCR.

El iniciador de sentido positivo utilizado fue Bd18SF1 (5'-TTTGTACACA CCGCCCGTCGC-3') localizado en la región final del gen18S del rRNA y el iniciador de

sentido negativo llamado Bd28SR1 (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3') en la región de inicio de 28S rRNA del hongo.

Después de amplificar con estos iniciadores, se utilizó los iniciadores anidados Bd1a (5'- CAGTGTGCCATATGTCACG- 3') y Bd2a (5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3') que fueron diseñados para las regiones conservadas ITS1 e ITS2 respectivamente para *Bd*.

Las amplificaciones se realizaron con un volumen final de 25  $\mu$ l (0.2 mM de dNTP, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1.25 unidades de Taq DNA polimerasa, 0.5 mM de cada primer, 2.5  $\mu$ l de Buffer PCR 5X, 1  $\mu$ l de ADN y 17.05  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O). Las condiciones para la primera amplificación fueron la denaturación inicial por 9 min a 95° C; 30 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 50° C y 2 min a 72° C y la extensión final por 7 min a 72° C. La mezcla para la segunda reacción de PCR contiene 0.5 mM de dNTP, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.25 unidades de Taq DNA polimerasa, 0.5 mM de cada primer, 2.5  $\mu$ l de Buffer PCR 5X, 1  $\mu$ l de ADN y 18.25  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O. Las condiciones para la segunda amplificación fueron una desnaturalización por 10 min a 93°C; 35 ciclos de 45 s a 93°C, 45 s a 60°C y 1 min a 72°C y la extensión final por 10 min a 72°C. El control positivo fue enviado por Joyce Longcore (University of Maine) del aislado JEL 423 de *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Los reactivos utilizados durante la preparación de los reactivos de las amplificaciones se conservaron en un bloque frío para que no se degraden con los cambios de temperatura en especial la Taq Polimerasa. Se realizó una reacción de PCR con cada uno de los individuos colectados, empleando en cada reacción un control positivo y un control negativo compuesto por los reactivos sin el ADN. En la segunda amplificación se utilizó el primer control negativo como control negativo y otro control negativo con el los reactivos de la segunda amplificación preparado con los iniciadores Bd1a y Bd2a sin ADN. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador My Cycler, Thermal Cycler. El

producto de PCR se almacenó a una temperatura de 4° C para evitar la degradación del ADN y poder proceder a la electroforesis.

#### **4.2.2.4. ELECTROFORESIS**

Los fragmentos de ADN amplificados fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa (AGR-LE-500. AXYGEN Bioscience) al 1 % en 0.5 X TBE (Tris, Borato, EDTA). Cada uno de los productos de PCR se mezcló con 1.2 µl de marcador de carga (Blue/Orange 6X. Loading Dye 1 ml. Promega), lo que permitió la visualización de las bandas en el gel de agarosa. El peso molecular de cada producto de PCR fue estimado utilizando una escalera [Trackit TM 100 bp DNA ladder. 100 appls (0.1µg/ µl). Invitrogen]. Para correr cada una de las muestras se utilizó una fuente de poder (Enduro Power Supplies 300v. Labnet international Inc). Para correr las muestras en el gel de agarosa se utilizaron 400 amperios y 90 voltios durante 40 minutos. Se utilizó un kit de purificación ExoSap-IT (GE Healthcare) para eliminar los residuos de primer y dNTPs no incorporados. Una vez purificados los productos, se realizó la secuenciación con los primers Bd 1a y Bd2a en la empresa Macrogen Inc. En Seúl Korea.

#### **4.2.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS Y DE REDES DE HAPLOTIPOS DEL GEN DEL ITS**

Los datos de las secuencias de la región del ITS1-5.8S-ITS2 fueron comparados para generar una secuencia consenso para cada fragmento de ADN utilizando el programa Geneious Pro 5.3.4 (Drummond *et al.*, 2010) (Biomatters Ltd, Copyright © 2005-2011). Las secuencias fueron alineadas con Mafft versión 6.240 (Katoh *et al.*, 2002).

Posteriormente, la alineación fue ajustada manualmente utilizando el programa Mesquite 2.74 (Maddison y Maddison, 2010).

Para realizar la filogenia y redes de haplotipos de *Batrachochytrium dendrobatidis*, se utilizaron las secuencias publicadas que se encuentran en DDBJ/EMBL/GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). La mayor parte de estas secuencias fueron anteriormente analizadas por Goka *et al.* (2009) y pertenecen a la región del ITS1-5.8S-ITS2. Esta filogenia fue realizada para comparar la variación genética de las muestras de Ecuador con las de otros países. Los números de acceso se encuentran en la Tabla 2. A estas secuencias se añadieron las muestras positivas de este estudio. Para el grupo externo, se utilizaron 3 secuencias de Rhizophydiales australianos (AUS 012, AUS 009 y AUS 003) que están más relacionados a *Bd* que otras secuencias de Rhizophydiales

Los árboles filogenéticos fueron obtenidos utilizando inferencia Bayesiana. Los modelos para la evolución de los caracteres para el análisis Bayesiano fueron escogidos usando JModelTest 0.1.1 (Posada, 2008) utilizando el criterio de información de Akaike. Se aplicó el modelo F81 + G seleccionado por AICc para los cálculos basados en los resultados de JModeltest (Posada, 2008). Los análisis filogenéticos fueron realizados en MrBayes 3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003).

Cada análisis corrió por  $5 \times 10^6$  generaciones. Para los análisis, la cadena fue muestreada cada 1000 generaciones. El 50% de las muestras fueron descartadas y el resto fueron utilizadas para obtener el árbol de consenso Bayesiano, probabilidades posteriores y otros parámetros. Para determinar si hubo convergencia y mezcla de los parámetros en el análisis se utilizó el programa Tracer v 1.4 (Rambaut y Drummond, 2007).

Adicionalmente, se realizó un análisis de máxima verosimilitud utilizando el programa GARLI v 1.0 (Zwickl, 2006). Se realizó una búsqueda estocástica para encontrar

el mejor árbol. El soporte de los nodos fue realizado mediante un bootstrap no paramétrico en GARLI usando 100 réplicas.

Las redes de haplotipos han sido usadas para inferir genealogías a nivel de poblaciones cuando las divergencias entre las secuencias son bajas (Georgiadis *et al.*, 1994; Routman *et al.*, 1994; Gerber y Templeton, 1996; Hedin, 1997; Schaal *et al.*, 1998; Vilá *et al.*, 1999, Gómez-Zurita *et al.*, 2000) como en el caso de las secuencias del ITS1-5.8S-ITS2 que presentan poca variabilidad. Para determinar las diferencias y relaciones entre las secuencias, se utilizó el programa Templeton, Crandall and Sing (TCS) versión 1.21 (Clement *et al.*, 2000) para realizar una red de haplotipos tanto para las secuencias ecuatorianas como también para las secuencias existentes a nivel mundial. Éste construye los árboles más cortos y simples empleando el método de máxima parsimonia para realizar una red de haplotipos.

#### **4.2.4 GENÉTICA DE POBLACIONES**

Para los análisis estadísticos de las secuencias pertenecientes a las localidades ecuatorianas se utilizó el programa Arlequin versión 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005). Se calculó el número de haplotipos, la frecuencia de haplotipos y los haplotipos compartidos entre poblaciones. En este estudio, las poblaciones fueron las localidades (Fig. 1). Se eliminaron las secuencias más cortas para evitar falsos haplotipos que podrían producirse por tener bases faltantes. También se incluyeron las secuencias de Yasuní tomadas de DDBJ/EMBL/GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), el número de acceso se encuentra en la Tabla 2.

Se realizó también un Análisis de Variación Molecular (AMOVA por sus siglas en inglés), para distinguir en donde se ubica la mayor variación genética de *Bd* en las

muestras del Ecuador analizadas. Se hicieron 1000 permutaciones para conocer la significancia del AMOVA (Excoffier *et al.*, 2005).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. MUESTREOS RETROSPECTIVOS DE *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS*

De las 121 muestras colectadas en KU se encontró 1 espécimen con posible infección con *Bd* de Papallacta (KU 111480) y se escogieron sapos únicamente de la localidad del espécimen infectado (Papallacta) y de lugares cercanos como La Virgen.

Con montaje húmedo se analizaron 121 especímenes de KU y 28 especímenes de USNM. Con histogía se diagnosticaron 76 especímenes de KU colectados entre 1967 y 1984. 20 de USNM de 1962 y 11 del QCAZ colectados entre 1984 y 1987.

#### 5.1.1. MONTAJE HÚMEDO

Cuando se analizó la piel que desprendida 39 individuos de *Atelopus ignescens* anteriores a 1987 usando el método del montaje húmedo en la piel sin infección, se observaron células hexaédricas con un núcleo en el medio (Fig 2A). Cuando la piel está infectada, al interior de las células se pueden ver estructuras con paredes que refractan en el microscopio de contraste. En una muestra de 1967 KU 111480 (Anexo 9), se encontraron estructuras similares a zoosporangios septados y vacíos de aproximadamente 6-7 $\mu$ m (Fig. 3). En la Fig. 3A, los esporangios se ven sin contraste de fases y con contraste de fases en la Fig. 3B. Análisis adicionales con histología indicaron que el espécimen es negativo.

El resto de las muestras de piel analizadas con montaje húmedo no mostraban la presencia de zoosporangios en el *stratum corneum* que indiquen infección por

quitridiomycosis. La muestra de piel KU 109204D no fue positiva para el hongo, pero mostró contaminaciones externas similares a huevos de parásitos (Fig. 2B). No se pudo tomar la muestra de diez especímenes debido a que estaban mal preservados.

### 5.1.2. DIAGNÓSTICO UTILIZANDO HISTOLOGÍA

En total se analizaron 107 especímenes con el método de histología (Tabla 4). De estos, 20 especímenes fueron colectados en 1962, 64 de 1967 y 23 entre 1970 y 1987. No se encontró ningún espécimen con quitridiomycosis. Se pudo observar nueve especímenes (Anexo 10) con hiperplasia del *stratum intermedium* lo que es sintomático de quitridiomycosis, pero también puede ser causado por una respuesta a heridas en la epidermis o infecciones epidémicas como *Sarcoptes scabiei* (Skerratt *et al.*, 1999).

En la Fig. 4A se puede observar una fotografía de un segmento de piel normal en el que el tamaño del *stratum corneum* es de dos a tres capas de células (KU109201) y en la Fig. 3B se encuentra un segmento con hiperplasia del espécimen KU 111487. En este segmento, se pueden ver estructuras similares a esporangios del quítrido. En total se encontraron tres muestras dudosas que, además de presentar hiperplasia tenían estructuras similares a zoosporangios (Anexo 9). Al no disponer de tinciones específicas para el hongo, estas muestras fueron enviadas al Zoológico de San Diego para el análisis con la tinción GMS y resultaron negativas para esta prueba (A. Pessier, San Diego zoo com. pers.)

Al realizar el análisis de poder estadístico para ver cuál es la probabilidad de encontrar al menos un individuo infectado con la técnica de histología se encontró que cuando la prevalencia es baja (1%) la probabilidad de encontrar un individuo enfermo en los 133 es alrededor del 60% tanto para el día 21 como para el día 42. Conforme la prevalencia va aumentando (5%) la probabilidad de encontrar un individuo positivo es

casi del 100%. Si la prevalencia hubiera sido de 26.2% como en la actualidad la probabilidad de encontrar un individuo sería del 100% (Tabla 5).

## **5.2. MUESTREOS RECIENTES DE *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS*.**

En el transecto realizado se encontraron dos individuos de *Pristimantis thymelensis* y diez de *Pristimantis festae*. En los tres días que duró la salida, solo se encontró una *Gastrotheca pseustes* y siete renacuajos de la misma especie. El resto de sapos colectados fueron *Pristimantis*. Se encontró una abundancia relativa de *Pristimantis thymelensis* de 0.5 ind/hora/per y de *Pristimantis festae* de 2.5 ind/hora/per.

Las fotos de los discos orales de los renacuajos mostraron que cuatro individuos no tenían las filas de dientes completas, pero tampoco mostraban pérdida completa de filas de dentículos (Fig. 5B). Los demás renacuajos no presentaron pérdida de dentículos y el disco oral no tenía ninguna deformidad. (Fig. 5A).

La primera amplificación de la PCR anidada, realizada con los iniciadores externos Bd18SF1 y Bd28SR1, amplificó una banda de aproximadamente 500pb, algunas veces esta banda estaba acompañada por bandas no específicas. La segunda amplificación con los iniciadores Bd1a y Bd2a amplificó una sola banda de aproximadamente 300 pb (Fig. 6).

En total se obtuvieron 29 muestras positivas para la presencia de *Bd* entre las 77 muestras analizadas (Anexo 10). Todos los renacuajos de *Gastrotheca pseustes* estuvieron infectados por el quítrido, 0.27 (7/26) *Pristimantis festae*, 0.25 (1/4) *P. thymelensis*, 0.05 (1/20) *P. curtipes* y un *Pristimantis* sp (Tabla 6). *Gastrotheca riobambae* de Cuendina presentó una prevalencia de 0.53 (7/13) sapos infectados (Tabla 7). La mayor prevalencia

de *Bd* se encontró en La Virgen (incluyendo los renacuajos de *G. pseustes*) seguido por Cuendina en donde el 50% de las *G. riobambae* estuvieron infectados; (Tabla 4).

De las 22 muestras negativas para la presencia de *Bd* en la PCR de punto final de Cuendina y Palmira, ocho resultaron positivas con el análisis con PCR anidada.

### 5.3. ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS

En las 37 muestras positivas para la presencia de *Bd* de las localidades ecuatorianas se encontraron ocho haplotipos, los cuales difieren en deleciones y sustituciones de bases (Fig. 7) (Tabla 2). Los haplotipos fueron asociados a códigos únicos (Anexo 8). El haplotipo (H1) fue el más común, 28/37 secuencias presentaron este haplotipo (Tabla 8) y todas las poblaciones menos Palmira comparten esta misma secuencia. Tres secuencias: de Cuendina, Palmira y Papallacta comparten el haplotipo (H6) que fue el segundo haplotipo más común.

No se encontró ningún haplotipo único entre grupos geográficos de una misma localidad o cercanos. Existe poca distancia genética entre haplotipos de las localidades ecuatorianas. El haplotipo (H7) perteneciente a la especie *Pristimantis festae*, es el más diferenciado con respecto al haplotipo con mayor frecuencia (H1). La mayor distancia genética ( $p$ ) no corregida fue de 0.01 entre el haplotipo H7 y H2. También podemos observar en la Tabla 2 que *Leptodactylus pentadactylus* tuvo mayor diversidad de haplotipos, las cuatro muestras forman tres haplotipos diferentes. Para el resto de muestras no se encontró un patrón en la diversidad de haplotipos con relación a la especie.

Los resultados del AMOVA se presentan en la Tabla 9. La variación genética se encuentra en un 99,55% dentro de las poblaciones y en un 0.45% entre poblaciones. Las diferencias no son significativas entre poblaciones.

#### 5.4. FILOGEOGRAFÍA

De acuerdo con el criterio de Akaike corregido para muestras pequeñas AICc, el mejor modelo fue F81+G. Los valores de los parámetros de este modelo para el análisis Bayesiano (tasa de pares de bases y frecuencia de las bases) se encuentran en la Tabla 3. El análisis Bayesiano y de Bootstrap de 102 muestras con 309 pares de bases de la región del ITS1- 5.8 S- ITS 2 de *Batrachochytrium dendrobatidis*, tuvo como resultado un árbol con un soporte fuerte de Bootstrap (100).

El árbol resultante del análisis de máxima verosimilitud (Fig. 8) presenta dos clados basales dentro del grupo interno, uno de ellos no tiene resolución y el otro con tres individuos de Japón de *Andrias japonicus* tiene un alto soporte bayesiano 0.97. Dentro del clado basal, que tiene poca resolución y generalmente bajos valores de soporte, .hay dos sub clados uno con dos muestras de Japón con una probabilidad posterior de 0.95 que incluye secuencias de *Rana catesbeiana* (especie importada de Norte América y muestreada en el mercado de mascotas de Japón) y *Afrixalus fornasini* (importada de África del zoológico de mascotas en Japón). Las secuencias ecuatorianas no forman un grupo monofilético. La mayoría de muestras están agrupadas en una politomía en uno de los dos clados basales de la filogenia. Solamente siete muestras están fuera de esta politomía, una de ellas pertenece a un clado conformado por una muestra de Texas (FJ373881) y (FJ232009) de Yasuní con un soporte moderado (pb = 61) y otra (FJ 232020) forma un clado con dos muestras de Japón (AB435231 y AB469199) con un soporte moderado (pb=61) las otras muestras ecuatorianas se encuentran en un clado sin soporte.

### 5.4.1 ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS A NIVEL MUNDIAL

El análisis de la red de haplotipos mostró 23 haplotipos dentro de las 99 muestras a nivel mundial. El haplotipo con mayor frecuencia (H1) presentó una frecuencia de 65/99 (0.65) y se encuentra en todos los países muestreados. Todas las secuencias de Italia se encuentran dentro de este haplotipo. Se puede observar que no existe relación entre lugares geográficos cercanos y un mismo haplotipo. Los haplotipos japoneses son los que más se diferencian respecto al resto de secuencias. La mayor distancia genética no corregida (p) se encontró entre dos haplotipos japoneses H19 y H15 esta fue de  $p=0.06$ . El haplotipo con mayor divergencia fue el de *Afrivalus fornasinii* (H19) (importado de África y conservado en un zoológico en Japón) con una distancia  $p=0.037$  al haplotipo H1, y con una distancia de 0.04 al haplotipo más divergente de Ecuador (H7) (Tabla 10). También hay divergencia en dos haplotipos de *Rana catesbeiana* H15 y H16 (importados de Norte América y vendidos en tiendas de mascotas en Japón) (Fig. 9), especie que también tuvo el mayor número de haplotipos. Yasuní comparte un haplotipo con *Xenopus laevis* (H2) (importado de Sud África y vendido en tiendas de mascotas en Japón) y con *Fejervarya limnocharis* (nativa de Japón y colectada en el campo). Los haplotipos de Norte América no presentan tanta variación como los japoneses. El que más diverge tiene dos bases de diferencia con el haplotipo de mayor frecuencia (H1). Ecuador comparte el haplotipo H1 y el haplotipo H4 con Estados Unidos (Fig. 9). Dentro de las secuencias ecuatorianas analizadas se encontraron cinco haplotipos que no se habían encontrado anteriormente en otros países.

## 6. DISCUSIÓN

No se encontró *Bd* en 107 especímenes analizados de *A. ignescens* anteriores a 1987. Merino-Viteri (2001) analizó 89 especímenes colectados entre 1983 y 1988 y obtuvo el mismo resultado. Esta especie no ha sido encontrada desde 1988 y no se sabe exactamente las causas de su extinción (Ron *et al.*, 2003). Se cree que el hongo *Bd* es un posible causante de su extinción. Existe controversia sobre el origen de *Bd*, podría tratarse de un patógeno endémico o de un patógeno exótico que recientemente ha expandido su rango de distribución a nivel mundial.

Aunque no se puede concluir que no existió la infección antes de 1988, se puede sugerir que por lo menos no había una prevalencia alta de *Bd*. En efecto, el análisis de poder estadístico indica que si la prevalencia del hongo en esa época hubiera sido baja (> 5 %) la probabilidad de encontrar un individuo positivo usando la histología en 133 sapos es menor a 1. Por el contrario, si la prevalencia hubiera sido mayor a 5%, como es en la actualidad, la probabilidad de encontrar al menos un positivo es 1. Por lo tanto, si el patógeno hubiera sido endémico con baja prevalencia, con histología no se podría detectar, y podría haber falsos negativos, lo que apoyaría la hipótesis del patógeno endémico. La histología no detecta los primeros estadios de la infección porque el hongo tiene que tener el tiempo suficiente para entrar al *stratum corneum* y al *stratum granulosum* donde se forman los esporangios. En los estadios menos avanzados de la enfermedad la hiperqueratosis no es evidente (Berger *et al.*, 2005b).

Además, cuando las infecciones de *Bd* son leves, el quítrido puede no encontrarse en la sección de piel analizada. Una proporción de sapos que podrían ser negativos con histología podrían en realidad estar infectados con el hongo, existiendo una alta posibilidad de falsos negativos (Retallick, 2004). El porcentaje de falsos negativos podría aumentar

aún más si se toma en cuenta que en los análisis de falsos negativos en laboratorio, como el de Hyatt *et al.*, (2007) se inoculó a los sapos con  $10^4$  zoosporas, y los anfibios en el campo no están expuestos a largos períodos de tiempo a tan alto número de zoosporas (Berger *et al.*, 2004, Daszak *et al.* 2004). Por otra parte, pocos especímenes fueron recolectados durante las declinaciones, siendo difícil encontrar sapos muertos ya que estos se descomponen rápidamente (Laurance *et al.*, 1996), siendo imposible determinar si el hongo estuvo en esos especímenes.

Sin embargo, cuando la prevalencia es leve generalmente no hay una alta infección y el quítrido no mata al sapo. Por lo tanto, no podría causar la extinción de una población tan numerosa. Se sabe que las declinaciones de *Rana sierrae* y *R. muscosa* no fueron evidentes sino hasta que el nivel de infección llegó a 10000 zoosporas por swab (Vredenburg *et al.*, 2009).

La presencia de parásitos encontrados en el análisis con montaje húmedo, no sería la causa de la muerte del anfibio porque se ve que es muy superficial y no se encuentran causando daño dentro de las células (Pessier, San Diego Zoo. com. pers.).

## **6.1. PREVALENCIA DE QUITRIDOMICOSIS EN LA ACTUALIDAD**

La prevalencia de quitridiomicosis en el páramo de Papallacta y de Guamaní fue considerablemente alta. En efecto, se encontró que, el 26.2% de adultos y 100% de renacuajos de *Gastrotheca pseustes* de tres posas diferentes estaban infectados con el hongo.

En estudios retrospectivos realizados en Ecuador por Merino-Viteri (2001) y a nivel mundial no se ha encontrado una prevalencia elevada. Merino-Viteri encontró quitridiomicosis utilizando la histología en 26 especímenes depositados en museos y

pertenecientes a los Andes del Ecuador. Tres *Atelopus pastuso*, seis *Atelopus bomolochos*, quince *Gastrotheca pseustes*, un *Hyloscirtus psarolaimus* y un *Telmatobius niger*. Solo tres especímenes de los 26 positivos eran adultos. La prevalencia encontrada fue de 15% tomando en cuenta los renacuajos. Puschendorf *et al.* (2006) realizaron un análisis retrospectivo de 202 especímenes de *Incilius periglenes* y solo encontraron una prevalencia del 6%. Esto nos muestra una vez más que con histología en especímenes de museo no se han encontrado prevalencias altas de quitridiomycosis.

En búsquedas recientes en Ecuador, tampoco se han visto prevalencias elevadas. En 679 swabs tomados en 356 individuos de *Atelopus spumarius* no se encontró ni una sola muestra positiva de *Bd* utilizando la PCR de punto final (Tarvin *et al.*, no publicado). De 3991 muestras tomadas con swabs en sapos ecuatorianos, solo se encontraron 83 positivas es decir, un porcentaje de apenas el 2% (S. R. Ron, no publicado). En Asia, se encontró un porcentaje similar al encontrado por Ron (2.35%) analizando 3363 especímenes con diferentes técnicas (Swei *et al.*, 2011). En este se concluyó que la baja prevalencia podría deberse a que *Bd* no ha tenido tiempo de desarrollarse aún en Asia y a que la epidemiología de la enfermedad es diferente.

En el estudio realizado por Sánchez *et al.*, (2008) en la Cordillera de Mérida 8°30'N-71°37'O y 8°45'N-71°15'O entre los 80 y 2600 m encontraron *Bd* en 323 sapos de los 649 muestreados es decir una prevalencia del (49.8 %). En este caso la prevalencia del hongo también es muy alta y podría ser debido a que emplearon PCR cuantitativa y no la PCR de punto final.

Es así que podemos decir que los niveles de prevalencia de *Bd* son mucho mayores que los reportados por Merino-Viteri (2001), Ron (no publicado) y Tarvin *et al.* (no publicado). Las diferencias en la prevalencia entre el presente estudio y los reportes de la

literatura para el Ecuador podrían tener dos explicaciones (i) La sensibilidad de la PCR anidada, (ii) La prevalencia en el páramo podría haber aumentado en los últimos años.

El diagnóstico de quitridiomycosis se ha basado en su mayoría en exámenes histológicos. La sensibilidad y especificidad de esta técnica no logra detectar una gran proporción de animales infectados debido a que solo se examina una porción pequeña de piel y sólo se puede detectar zoosporangios y no zoosporas como en una PCR cuantitativa (Boyle *et al.*, 2004). La PCR anidada puede detectar menos de una zoospora y es de 10 a 100 veces más sensible que la PCR de punto final y que el PCR cuantitativo (Goka *et al.*, 2009). En efecto, ocho muestras previamente clasificadas como negativas con PCR de punto final fueron positivas con PCR anidada en este estudio. Esto nos permite evidenciar que la PCR anidada si tiene mayor sensibilidad.

Para averiguar si la prevalencia de *Bd* está aumentando en el páramo de Guamaní se necesitaría un muestreo regular cada año, realizando mas transectos utilizando la misma técnica y en especímenes de la misma especie. En el caso de que la prevalencia sea mayor en la actualidad, no parece estar afectando drásticamente a las poblaciones. En efecto, Bustamante *et al.*, 2005 encontró una abundancia relativa de *Pristimantis tymelensis* de 0.2 ind/hora/per y de *Pristimantis festae* de 0.35 ind/hora/per y en este estudio se encontró una abundancia relativa mayor. Lo que muestra que las poblaciones se mantienen estables a pesar de haber estudiado solamente un transecto.

Ningún espécimen colectado presentó signos de la enfermedad cuando fue observado en el campo. Tampoco se puede descartar el hecho de que algunas poblaciones actuales de Papallacta y Guamaní están menos expuestas al hongo. De hecho, los *Pristimantis* tienen desarrollo directo, no están en contacto con el agua. Podría ocurrir también que los sapos colectados tengan varios mecanismos de defensa como bacterias simbiotas o mayor

cantidad de péptidos que no permiten que el nivel de infección del hongo sea elevado (Harris *et al.*, 2006; Harris *et al.*, 2009).

## **6.2. VARIACIONES GENÉTICAS ENCONTRADAS EN PAPALLACTA Y LA VIRGEN**

Al realizar la red de haplotipos utilizando únicamente secuencias de Ecuador, se encontraron ocho haplotipos en las 37 muestras analizadas. Existe un haplotipo con una frecuencia de 0.76 que está presente en todas las localidades menos Palmira. Podemos ver que la variación es muy baja en los haplotipos ecuatorianos, la distancia máxima fue de  $p = 0.01$ . Este nivel de diferenciación es bajo y es consistente con la predicción de baja diversidad genética de la hipótesis del patógeno exótico. Esto podría apoyar la hipótesis que indica que el hongo es un patógeno reciente en Papallacta y La Virgen. La diversidad de haplotipos no estaría de acuerdo con un evento de llegada como propuesto por Lips *et al.* (2008) o al menos no una introducción con un clon. Esta diversidad podría explicarse por varios eventos de llegada o un solo evento con varios haplotipos.

De acuerdo con el AMOVA, la mayor parte de la variancia (99,55%) se encuentra dentro de las poblaciones. También señala que solamente el 0,45% de la variancia es interpoblacional. Este resultado apoya los análisis anteriores, ya que se muestra que hay muy poca diferenciación genética de la población de *Bd* en el Ecuador. Los resultados obtenidos nos estarían indicando que hay poco polimorfismo. El AMOVA también podría evidenciar la alta capacidad de dispersión que tiene el hongo.

Para explicar los bajos niveles de polimorfismo genético de *Bd* existen por lo menos cuatro posibilidades (Morehouse *et al.*, 2003): (1) el tamaño de la población efectiva de *Bd* es pequeña, (2) la tasa de mutaciones en *Bd* es baja, (3) hubo un cuello de botella reciente

en el tamaño de la población, y (4) la especie emergió recientemente de un genotipo favorecido por selección natural. No se puede decir que el tamaño de la población de *Bd* sea pequeña porque *Bd* está distribuido en todos los continentes excepto en Antártica (Fisher *et al.*, 2009). En cuanto al punto 2, no se puede decir que la tasa mutaciones de *Bd* sea baja porque no existe evidencia que apoye este supuesto (Morehouse *et al.*, 2003). Entonces, se podría sugerir que podría haber ocurrido un cuello de botella o que la especie emergió recientemente.

### **6.3. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA A NIVEL MUNDIAL**

Los resultados de la red de haplotipos mostraron que el haplotipo H1 tuvo una frecuencia de 0.65 y fue compartido por todos los países, esto indicaría que existe un mismo origen compartido y que este haplotipo ha sido conservado por selección natural debido a un mayor éxito reproductivo.

En las muestras ecuatorianas encontramos que a veces están más relacionados a haplotipos de Japón o Norte América que a haplotipos ecuatorianos. Japón y Ecuador comparten un mismo haplotipo (H12) a parte del haplotipo (H1). Es decir, no existe un patrón geográfico de los haplotipos y no existe especificidad de huésped. La falta de patrón geográfico podría deberse a la alta capacidad de dispersión que tiene el hongo (Lips *et al.*, 2008). Estos datos no soportan la hipótesis que *Bd* emergió de una relación pre existente entre el hongo y los anfibios por cambio climático u otros factores abióticos. Estudios de la distribución mundial de *Bd* sugieren que ha tenido una distribución amplia, por lo menos por más de un siglo. *Bd* ha sido reportado en África en 1930 (Weldon *et al.*, 2004), Asia en 1902 (Goka, no publicado), Canada en 1895 (Global *Bd* database) y en Venezuela en 1925 (Global *Bd* database).

Así mismo, se puede ver poca tasa de diferenciación de las muestras de Texas igual que en la filogenia, pero se percibe nuevamente que un mayor número de mutaciones ha ocurrido en las muestras de *Bd* provenientes del Japón. Los bajos niveles de variación genética entre secuencias de *Bd* de las muestras de Italia y Ecuador podrían indicar que el tiempo de coalescencia es relativamente reciente y que el hongo se ha dispersado geográficamente durante una escala de tiempo en la cual pocas mutaciones han ocurrido.

En cuanto a las muestras japonesas, existe gran distancia genética, la mayor distancia genética encontrada fue entre dos muestras japonesas (H19) y (H15), esta distancia fue del 6%. Se ha visto que una variación mayor al 5% ya es de nivel interespecífico. En efecto, variaciones mayores al 5% se han visto entre copias del ITS dentro de seis cultivos de tres especies (*Laetiporus cincinnatus*, L. sp. y *Wolfiporia dilatolypha*) (Linder y Banik, 2011). En este caso la diferenciación genética parece ser lo suficientemente alta como para ser inconsistente con la predicción de baja diversidad genética de la hipótesis del patógeno exótico. Una muestra de *Afrivalus fornasinii* es la más divergente, esta muestra fue importada de África a Japón, esta divergencia apoyaría el posible origen africano de la quitridiomycosis.

Para tener más certeza acerca del origen del quítrido se deberían usar más muestras a nivel mundial y amplificar varias regiones del ADN.

En la filogenia, los resultados fueron semejantes a los encontrados en Goka *et al.* (2009). A pesar de haber encontrado un bajo soporte bayesiano en el árbol, las tres muestras de la salamandra *Andrias japonicus* difieren genéticamente del resto de las secuencias y están cercanamente relacionados entre ellas con un soporte Bayesiano de 0.97 (Fig 8). En general, la baja resolución de la filogenia es producto de la baja diversidad genética de las muestras de *Bd*. La diversidad genética de *Bd* en Japón es mayor que en otros países.

Se puede observar mayor número de haplotipos de las muestras japonesas de *R. catesbeiana*. A pesar de haber incrementado el número de muestras de Ecuador y Estados Unidos se observa poca variación en las muestras de Ecuador, Italia y EEUU. Como las muestras asiáticas muestran mayor diversidad alélica que los otros tres países, se podría especular que la enfermedad tiene un origen más antiguo en Japón que en Ecuador. En Goka *et al.* (2009) se hace referencia al hallazgo de *Batrachochytrium dendrobatidis* en una muestra antigua (1902) de *A. japonicus*.

## 7. CONCLUSIONES

*Batrachochytrium dendrobatidis* no fue encontrado en las poblaciones de *Atelopus ignescens* estudiadas de los páramos de Papallacta y Guamaní, antes de que éstas se extinguieran. Esto podría deberse a que se trata de un patógeno exótico, o a que no fue encontrado debido a la baja sensibilidad de la técnica usada.

Se sugiere que el hongo podría haber estado presente, pero con una prevalencia muy baja y podría haber sido por este motivo que no se encontró el hongo en los especímenes de museo analizados.

La poca variación genética encontrada en Ecuador sugeriría que se trata de un patógeno exótico. La diversidad de haplotipos encontrados en este país sugiere que podría haberse generado por varios eventos de llegada del hongo o un solo evento con varios haplotipos.

La falta de estructura filogeográfica y de especificidad de huésped en las secuencias de *Bd* del mundo, apoya la hipótesis de que *Bd* es un patógeno que ha ampliado su distribución recientemente.

La diferenciación genética en las secuencias de *Bd* del mundo es lo suficientemente alta como para no ser consistente con la hipótesis del patógeno exótico.

A pesar de que no se puede descartar la posibilidad de que la prevalencia haya aumentado en el páramo de Guamaní y Papallacta, se podría decir que la alta prevalencia encontrada en éste páramo podría deberse más a la sensibilidad de la técnica empleada.

## 8. LITERATURA CITADA

- Amphibian Conservation Summit. 2005. Amphibian Conservation Action Plan (ACAP). Washington, DC.
- Annis, S.L., Dastoor, F.P., Ziel, H., Daszak, P. y Longcore, J.E. 2004. A DNA based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases* 40(3) pp. 420–428.
- Alford, R.A., Dixon, P.M. y Pechmann, J.H.K. 2001. Ecology-Global amphibian population declines. *Nature* 30:133–165.
- Berger, L., Hyatt, A.D., Speare, R. y Longcore, J.E. 2005. Life cycle stages of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of aquatic organisms* 68:51–63.
- Berger, L., Speare, R. y Hyatt, A. 1999. Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. In: Campbell A, editor, Declines and disappearances of Australian frogs. Canberra. *Environment Australia* pp 23–33.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E., Cunningham, A.A., Goggin, L., Slocombe, R., Ragan, M.A., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Hines, H.B., Lips, K.R., Marantelli, G. y 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 of the United States of America* 95:9031–36.
- Berger, L. 2001. Diseases in Australian Frogs [PhD thesis]. Townsville, Australia. James Cook University: Townsville.
- Berger, L., Longcore, J., Speare, R., Hyatt, A., y Skerratt, L. F. 2009 Fungal diseases in amphibians. In: Amphibian Decline: diseases, parasites, maladies and pollutions. Amphibian Biology, 8. Surrey Beatty & Sons, Australia, pp. 2986.

- Berger, L., Marantelli, G., Skeratt, L.F. y Speare, R. 2005b. Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. *Diseases of Aquatic Organisms* 68: 47-50.
- Berger, L., Speare, R., Hines, H.B., Marantelli, G., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Skerratt, L.F., Olsen, V., Clarke, J.M., Gillespie, G., Mahony, M., Sheppard, N., Williams, C. y Tyler, M.J. 2004. Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Australian Veterinary Journal* 82: 31-36.
- Blaustein, A.R., Romansic, J.M., Scheessele, E.A., Han, B.A., Pessier, A.P. y Longcore, J.E. 2005. Interspecific variation in susceptibility of frog tadpoles to the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology* 19: 1460–1468.
- Blaustein, A.R. y Wake, D.B. 1990. Declining amphibian population: a global phenomenon. *Trends in Ecology & Evolution* 5: 203–204.
- Blaustein, A.R., Wake, D.B. y Sousa, W.P. 1994a. Amphibian declines: Judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation Biology* 8: 60–71.
- Bosch, J., Martínez-Solano, I. y 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. *Conservation Biology* 15:331–337.
- Boyle, D.G., Boyle, D.B. Olsen, V., Morgan, J. A. T. y Hyatt, A.D. 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic organisms* 60: 141–148.
- Carey, C. 1993. Hypothesis concerning the causes of the disappearance of boreal toads from the mountains of Colorado. *Conservation Biology* 7: 355–362.

- Coloma, L. A. 1995. Ecuadorian frogs of the Genus *Colostethus* (Anura: Dendrobatidae). Miscellaneous Publications of the Natural History Museum, University of Kansas 87:1–72.
- Coloma, L. A. 1997. Morphology, Systematics, and Phylogenetic Relationships Among Frogs of the Genus *Atelopus* (Anura: Bufonidae). PhD Dissertation, University of Kansas, Lawrence, Kansas.
- Coloma, L. A., Lötters, S. y Salas A.W. 2000. Taxonomy of the *Atelopus ignescens* complex (Anura: Bufonidae): designation of a neotype of *Atelopus ignescens* and recognition of *Atelopus exiguus*. *Herpetologica* 56:303–324.
- Coloma, L. A., W. E. Duellman, A. Almendáriz, S. R. Ron, A. T. Valdez, J. M. Guayasamin. 2010. Five new (extinct?) species of *Atelopus* (Anura: Bufonidae) from Andean Colombia, Ecuador, and Peru. *Zootaxa* 2574: 1–54.
- Clement M, Posada D y Crandall K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1660 DOI [10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x).
- Daszak, P., Strieby, A., Cunningham, A. A., Longcore, J. E., Brown, C.C. y Porter, D. 2004. Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetologica* 14: 201–207.
- Excoffier, L. Laval, G. y Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47–50.
- Drummond, A.J., 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 5.3, Available from <http://www.geneious.com/>
- Fellers, G. M., Green, D. E. y Longcore, J.E. 2001. Oral chytridiomycosis in the mountain yellow legged frog (*Rana muscosa*). *Copeia* 2001: 945–953.
- Fisher, M. C., Garner, T. W. J., y Walker, S. F. 2009. Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time, and Host. *Annual Review of Microbiology* 63:291–310.
- Garner, T.W.J., Perkins, M.W., Govindarajulu, P., Seglie, D. Walker, S. Cunningham, A.A. y Fisher, M.C. 2006. The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biology letters* 2, 455–459
- Georgiadis, N., L., Bishof, A.R. Templeton, J. Patton, W. Karesh and D. Western. 1994. Structure and history of African elephant populations: I. eastern and southern Africa. *Journal of Heredity* 85: 100-104.
- Gewin, V. 2008. Riders of a modern-day ark. *PLoS Biology* 6:e24.
- Gerber, A.S. y Templeton, A.R. 1996 Population sizes and within-deme movement of *Trimerotropis saxatilis* (Acrididae), a grasshopper with a fragmented distribution. *Oecologia* 105: 343 – 350
- Goka, G., 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.
- Gómez-Zurita, J., Petitpierre, E. y Juan, C. 2000. Nested cladistic analysis, phylogeography and speciation in the *Timarcha goettingensis* complex (Coleoptera, Chrysomelidae). *Molecular Ecology* 9: 557 – 570.

- Gosner, K.L. 1960. A simple table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16:183–190.
- Harris, R.N., James, T.Y., Lauer, A., Simon, M.A. y Patel, A. 2006. Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. Is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. *EcoHealth* 3: 53-56.
- Harris, R.N., Brucker, R.M., Walker, J.B., Becker, M.H., Schwantes, C.R., Flaherty, D.C., Lam, B.A., Woodhams, D.C., Briggs, C.J., Vredenburg, V.T. y Minbiole, K.P.C. 2009. Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. *The International Society for Microbial Ecology Journal* 3: 818-824.
- Hyatt, A., Boyle, D., Olsen V., Boyle, D., Berger, L., Obendorf D., Dalton A., Kriger, K., Hero, M., Hines, H, Phillott, A., Campbell, R., Marantelli, G., Gleason, F. Colling, A. 2007. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 73: 175–192.
- Hedin, M.C. 1997. Speciation history in a diverse clade of habitat-specialized spiders (Araneae: Nesticidae: Nesticus): Inferences from geographic-based sampling. *Evolution*, 51: 1929–1945.
- Herman, T. y Scott, F. 1992. Assessing the vulnerability of amphibians to climatic warming. In: Bisho, C.A., Pettit KE, EDITORS. Declines in Canadian Wildlife Service, Ontario, Canada. pp. 46–49.
- James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C.L., Matheny, P.B., Hofstetter, V., Cox, C.C., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E., Miadlikowska, J., Lumbsch, H.T., Rauhut, A., Reeb, Arnold, E., Amtoft, A., Stajich, J.E., Hosaka, K., Sung, G., Johnson, D., O'Rourke, B., Crockett, M., Binder, M., Curtis, J.M., Slot, J.C., Wang, Z., Wilson, A.W., Schüßler, A., Longcore, J.E., O'Donnell, K., Mozley-Standridge, S., Porte, D., Letcher, P.M., Powell, M.J., Taylor, J.W., White, M.M., Griffith, G.W., Davies,

- D.R., Humber, R.A., Morton, J.B., Sugiyama, J., Rossman, A.Y., Rogers, J.D., Pfister, D.H., Hewitt, D., Hansen, K., Hambleton, S., Shoemaker, R.A., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., Spotts, R.A., Serdani, M., Crous, P.W., Hughes, K.W., Matsuura, K., Langer, E., Langer, G., Untereiner, W.A., Lücking, R., Büdel, B., Geiser, D.M., Aptroot, A., Diederich, P., Schmitt, I., Schultz, M. Yahr, R., Hibbett, D.S., Lutzoni, F., McLaughlin, D.J., Spatafora, J.W., y Vilgalys, R. . 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818–822.
- Johnson, M., Berger, L., Philips, L. y Speare, R. 2003. Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 57: 255–260.
- Johnson, M. L., y Speare, R. 2005. Possibles modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Diseases of Aquatic Organisms* 65: 181-186.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., y Miyata, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acid Res.*, 30:3059–3066.
- Kats, L.B., Kiesecker, J.M., Chivers, D.P. y Blaustein, A.R. 2000. Effects of UV-B Radiation on Anti-predator Behavior in Three Species of Amphibians. *Ethology* 106, 921-931.
- Kiesecker, J.M. y Blaustein, A.R. 1995. Synergism between UV-B radiation and a pathogen magnifies amphibian embryo mortality in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:11049-11052.
- Kruger, K.M., Hines, H.B., Hyatt, A.D., Boyle, D.G. y Hero, J.M. 2006.

Techniques for detecting chytridiomycosis in wild frogs: comparing histology with real-time Taqman PCR. *Diseases of Aquatic Organisms* 71:141–148.

La Marca, E., Lips, K.R., Lotters, S., Puschendorf, R., Ibanez, R., Rueda-Almonacid, J. V., Schulte, R. Marty, C. Castro, F., Manzanilla-Puppo, J., García-Pérez, J.L., Bolaños, f., Chaves, G., Pounds, J.A., Toral, E. y Young, B.E. 2005. Catastrophic population declines and extinctions in Neotropical harlequin frogs (Bufonidae: *Atelopus*). *Biotropica* 37:190–201.

Laurance, W.F., McDonald, K.R., Speare, R. 1996. Australian rain forest frogs: support for the epidemic disease hypothesis. *Conservation Biology* 10:406–13.

Linder, D.L. y Banik, M.T. 2011. Intragenomic variation in the ITS rDNA región obscures phylogenetic relationships and inflates estimates of operational taxonomic units in genus *Laetiporus*. *Mycologia* 103 (4), 2011, pp.731-740.

Lips, K. R. 1999. Mass mortality and population declines of anurans at an Upland site in Western Panama. *Conservation Biology* 13:117-125.

Lips, K.R., Diffendorfer, J., Mendelson, J.R. y Sears, M.W. 2008. Riding the Wave: Reconciling the Roles of Disease and Climate Change in Amphibian Declines. *PLoS Biology* 6(3): e72. doi:10.1371/journal.pbio.0060072.

Longcore, J. E., Pessier, A.P. y Nichols, D. K. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen et sp nov, a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91:219–27.

Lötters, S. 1996. The Neotropical toad genus *Atelopus*, Checklist-Biology-Distribution. M. Vences and F. Glaw Verlags, Köln, Germany.

Luna, L. 1968. Manual of Histologic Staining Methods of the AFIP. pp230-231.3rd Ed, McGraw-Hill, NY.

- Ma Z, Luo, y Michailides, T.J. 2003. Nested PCR assays for detection of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards and *Botryosphaeria dothidea* from pistachios in California. *Journal of Phytopathology* 151: 312–322.
- Maddison, W. P. y Maddison, D.R. 2010. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.73 <http://mesquiteproject.org>.
- Merino-Viteri, A. 2001. Análisis de posibles causas de las disminuciones de poblaciones de anfibios en los Andes del Ecuador. Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en ciencias Biológicas. Universidad Católica del Ecuador.
- Morehouse, E.A., James, T.Y., Ganley, A.R.D., Vilgaly, R., Berger, L., Murphys, P.J. y Longcore, J.E. 2003. Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone. *Molecular Ecology* 12: 395–403.
- Morgan, J.A.T., Vredenburg, V.T., Rachowicz, L.J., Knapp, R.A., Stice, M.J., Tunstall, T., Bringham, R.E., Parker, J.M., Longcore, J.E., Moritz, C., Briggs, C.J. y Taylor, J.W. 2007. Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Vol 104 34: 13845-13850.
- Mutschmann, F., Berger, L., Zwart, P., Gaedicke, C. 2000. Chytridiomycosis in amphibians first report in Europe. *Berl Munch Tieraerztl Wochenschr* 113:380–383.
- Ouellet, M., Mikaelian, I., Pauli B.D., Rodrigue, J. y Green, D.M. 2005. Historical evidence of widespread chytrid infection in North American amphibian populations. *Conservation Biology* 19:1431–1440.
- Pessier, A. P., Nichols, D. K., Longcore, J. E. y Fuller, M. S. 1999. Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *J. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11:194–99.

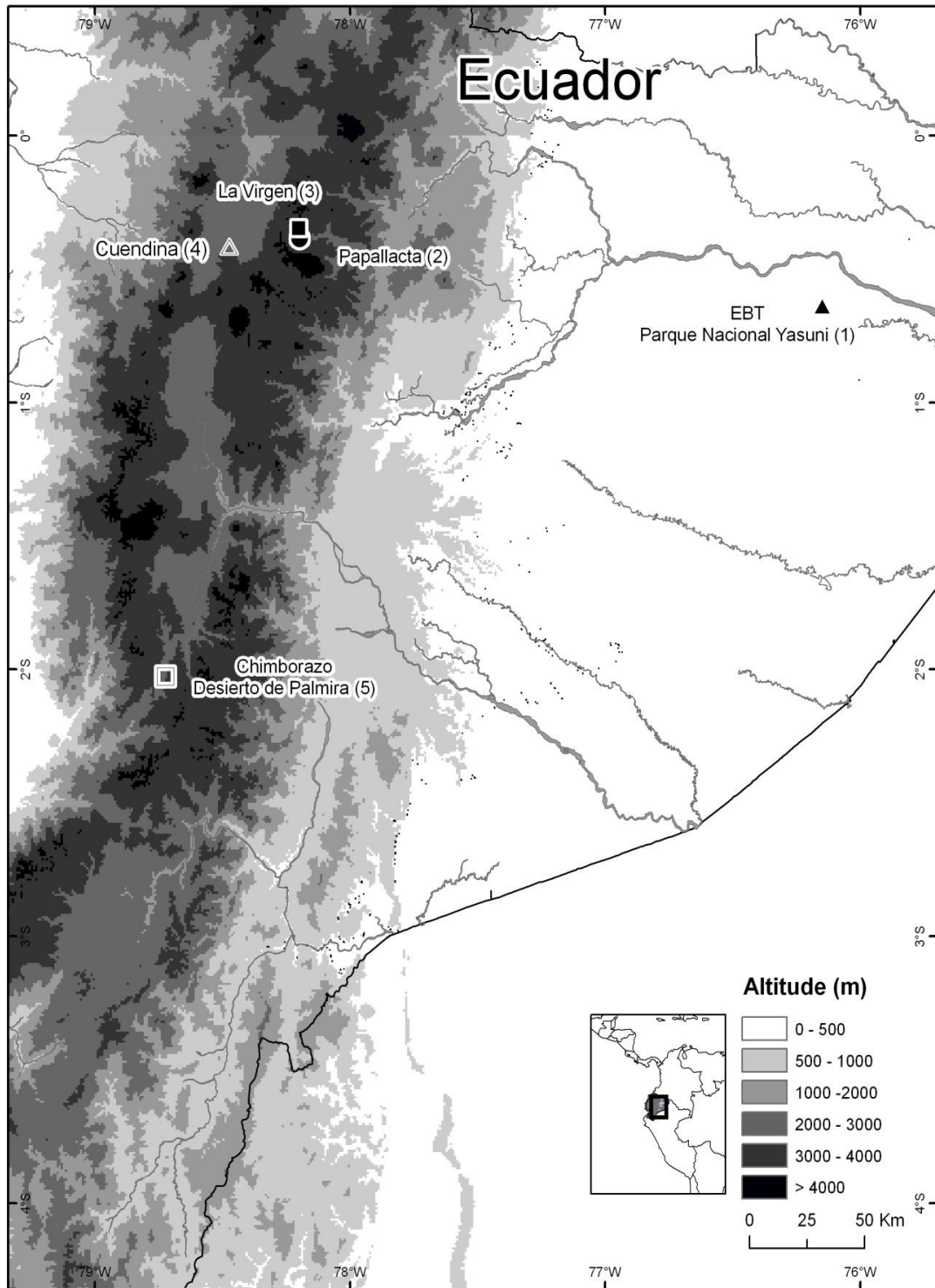
- Peters, J.A. 1973. The frog genus *Atelopus* in Ecuador (Anura: Bufonidae). *Smithsonian Contributions to Zoology* 145: 1–49.
- Piotrowski, J.S., Annis, S.L. y Longcore, J.E. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96: 9–15.
- Pounds, A.J. y Crump, M. 1994. Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Conservation Biology* 8:72–85.
- Pounds, A.J., Fogden, M.P.L. y Campbell, J.H. 1999. Biological response to climate change in a tropical mountain. *Nature* 398:611–615.
- Pounds, A.J., Bustamante, M.R., Coloma, L.A., Consuegra, J. A., Fogden, M.P.L., Foster, P.N., La Marca, E. Masters, K.L., Merino-Viteri, A., Puschendorf, R., Ron, S.R., Sánchez-Azofeifa, G.A., Still, C.J. y Young, B.E. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 439:161–67.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253–1256.
- Puschendorf, R., Bolaños, F. y Chaves, G. 2006. The amphibian chytrid fungus along an altitudinal transect before the first reported declines in Costa Rica. *Biological conservation* 132: 136-142.
- Rachowicz, L.J., Hero, J.M., Alford, R.A., Taylor, J.W., Morgan, J.A.T., Vredenburg, V.T., Collins, J.P. y Briggs, C.J. 2005. The novel and endemic pathogen hypotheses: competing explanations for the origin of emerging infectious diseases of wildlife. *Conservation Biology* 19:1441–48.
- Rambaut, A. y Drummond, A.J. 2007. Tracer v 1.4. Disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.
- Retallick, R.W.R., McCallum, H. y Speare R. 2004. Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community post-decline. *PLoS Biol* 2(11): e351.

- Rivero, J.A., 1963. Five new species of *Atelopus* from Colombia, with notes on other forms from Colombia and Ecuador. *Caribbean Journal of Science* 3: 103–124.
- Sánchez, Dinora; Andrés Chacón-Ortiz; Fabiola León; Barbara A. Hanc; Margarita Lampo. 2008. Widespread occurrence of an emerging pathogen in amphibian communities of the Venezuelan Andes, *Biological Conservation* 141, pp. 2898–2905.
- Ron, S. R. y Merino, A. 2000. Amphibian declines in Ecuador: overview and first report of chytridiomycosis from South America. *Froglog* 42:2–3.
- Ron, S. R., W. E. Duellman, L. A. Coloma, y M. Bustamante. 2003. Population decline of the jambato toad *Atelopus ignescens* (Anura: Bufonidae) in the Andes of Ecuador. *Journal of Herpetology* 37:116–126.
- Ronquist, F. y Huelsenbeck, J.P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Routman, E., Wu, R. y Templeton, A.R. 1994 Parsimony, molecular evolution, and biogeography: The case of the North American Giant Salamander. *Evolution*, 48, 1799 –180.
- Schaal, B.A., Hayworth, D.A., Olsen, K.M., Rouscher, J.T. y Smith, W.A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* 7: 465 – 474.
- Skerratt L.F., Middleton, D y Beveridge, I. 1999. Distribution of life cycle stages of *Sarcoptes scabiei* var. *wombati* and effects of severe manage on common wombats in Victoria. *Journal of Wildlife Diseases* 35: 633–646.
- Stuart, S. N., J. S. Chanson, N. A. Cox, B. E. Young, A. S. L. Rodríguez, D. L. Fishman, R. W. Waller. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306: 1783–1786.

- Swei, A., Rowley, J.J.L, Rödder, D., Diesmos, M.L.L., Diesmos, A.C, Cheryl J. Briggs, C.J., Brown, R., Cao, T.T., Cheng, T.L., Chong, R.A. Han, B., Hero, J.M.,Hoang, H.D., Kusriani, M.D. Le, D.T.T., McGuire, T.A. Meegaskumbura,M.,Min, M.S., Mulcahy, D.G., Neang,T., Phimmachak,S., Rao,D.Q. Reeder,N.M., Schoville, S.D. Sivongxay, N., Srei, N., Stöck, M. Stuart,B.L., Torres, L.S. Tran, D.T.A. Tunstall, T.S. Vieites, D., Vredenburg, V.T. 2011 Is Chytridiomycosis an Emerging Infectious Disease in Asia? *PLoS ONE* 6(8): e23179. doi:10.1371/journal.pone.0023179.
- Vilá, C., Amorim, I.R., Leonard, J.A., Posada, D. Castroviejo, J., Petrucci-Fonseca, F., Crandall, K.A., Ellegren, H. y Wayne, R.K. 1999. Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the Gray Wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology* 8: 2089 – 2103.
- Voyles, J., Young, S., Berger, L., Campbell, C., Voyles, W.df. Dinudom, A., Cook, D., Webb, R., Alford, R.A., Skerratt, L. y Speare, R. 2009. Pathogenesis of Chytridiomycosis, a cause of catastrophic Amphibian Declines. *Science* 326: 582–585.
- Vredenburg, V.T., Knapp, R.A. Tunstall, T.S. Briggs, C.J. 2009. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 9689–9694.
- Weldon, C., du Preez, L.H., Hyatt, A.D., Muller, R. y Speare, R. 2004. Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases* 10:2100–2105.
- Woodhams, D.C., Alford R.A., Briggs, C.J., Johnson, M. y Rollins-Smith, L.A. 2008. Life-history trade-offs influence disease in changing climates: strategies of an amphibian pathogen. *Ecology* 89(6), 1627–1639.

Zwickl, D. J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin.

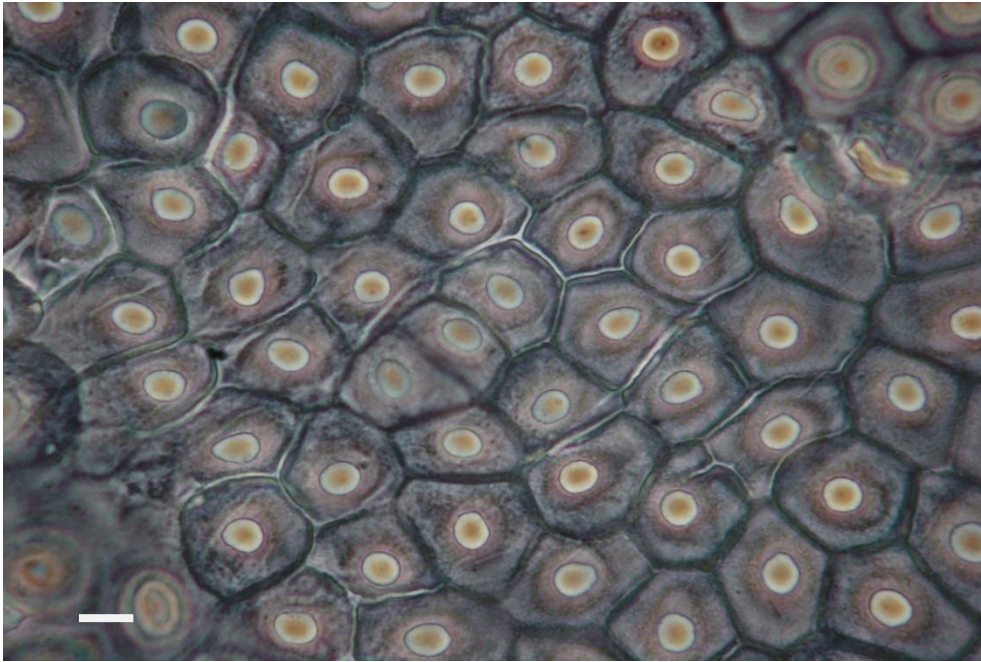
## **9. FIGURAS**



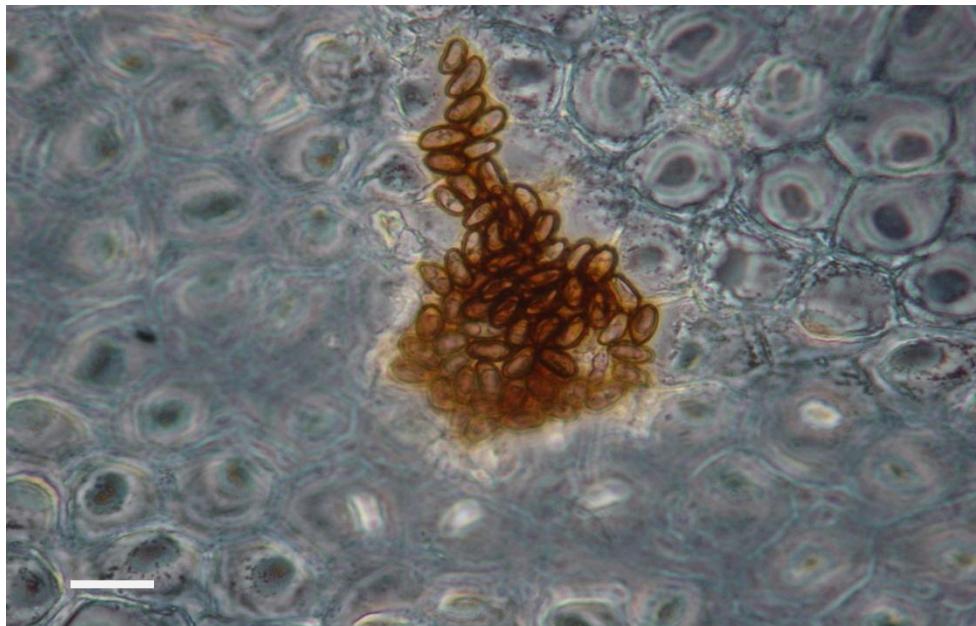
**Figura 1.** Mapa de distribución de las poblaciones muestreadas para detectar la presencia/ausencia de *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Los números entre paréntesis se encuentran en la Tabla 2.

A



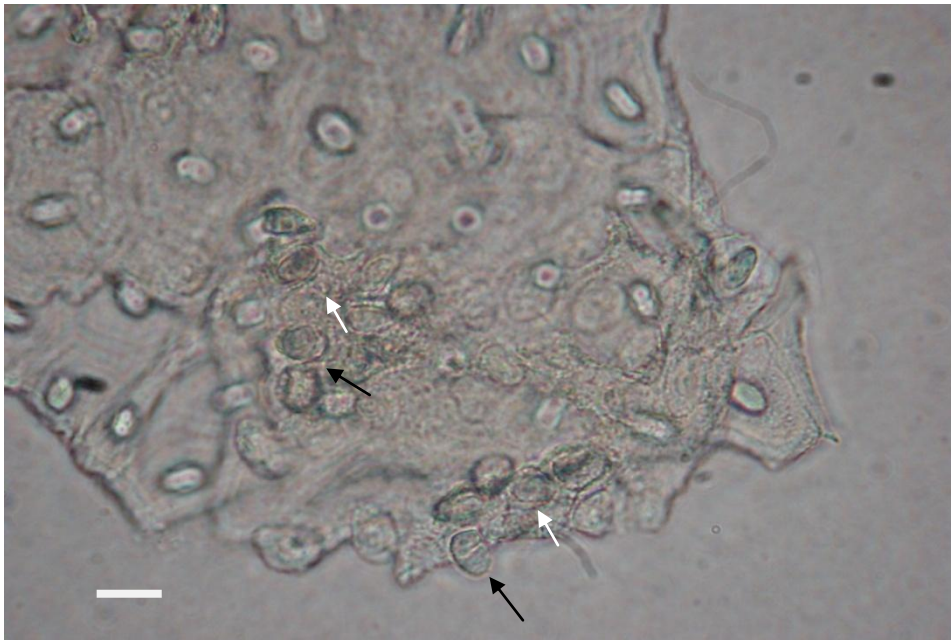
B



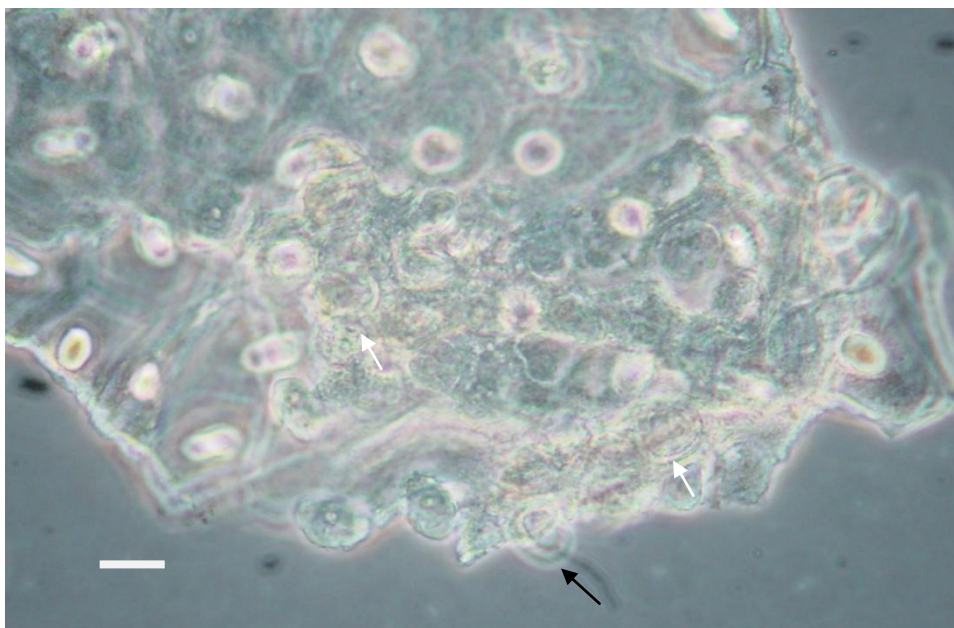
**Figura 2.** Pieles que se desprenden de *Atelopus ignescens*. A) Piel sin infección (KU 109226). B) Piel infectada con huevos de un parásito desconocido (KU 201122).

La barra representa 10 $\mu$ m. Foto: Verónica Sáenz.

A



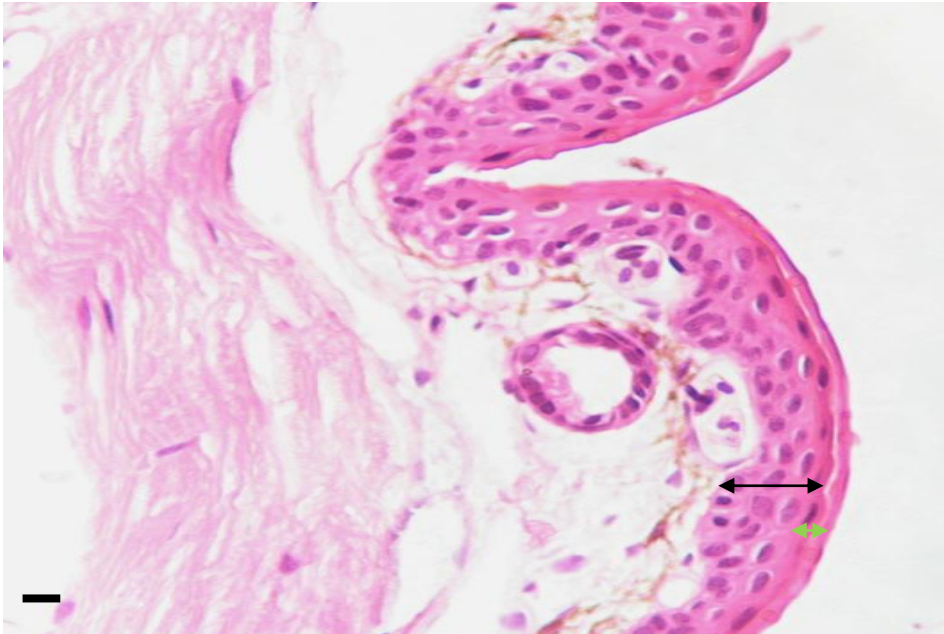
B



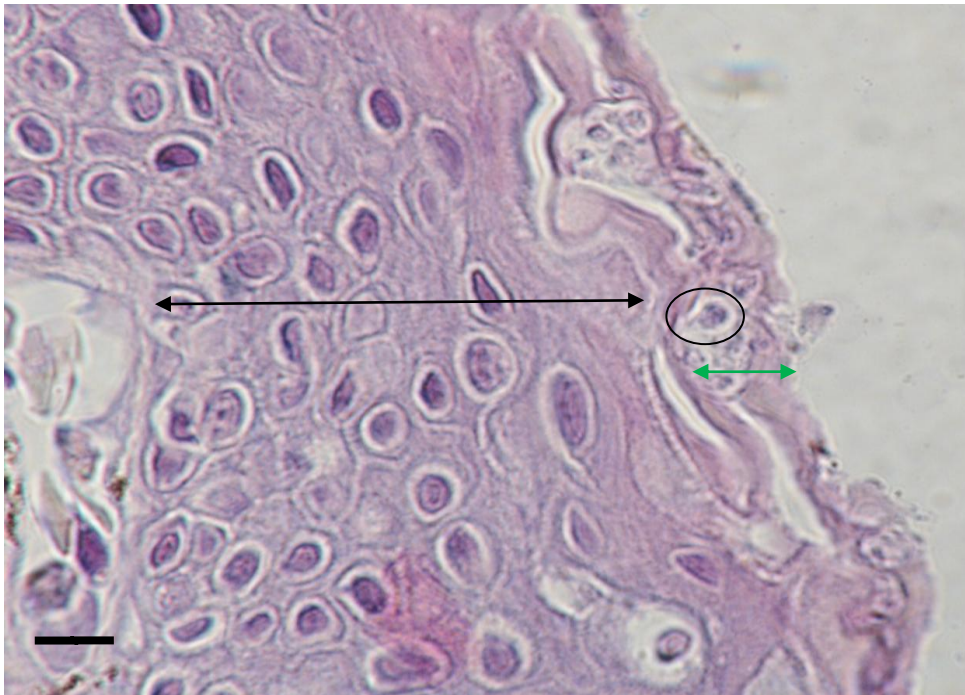
**Figura 3.** Pieles que se desprenden de *Atelopus ignescens* KU 111480. A) Piel tomada sin contraste de fases. B) Piel tomada con contraste de fases.

Las flechas blancas representan esporangios vacíos y las flechas negras esporangios septados. La barra representa 10 $\mu$ m. Foto: Verónica Sáenz.

A



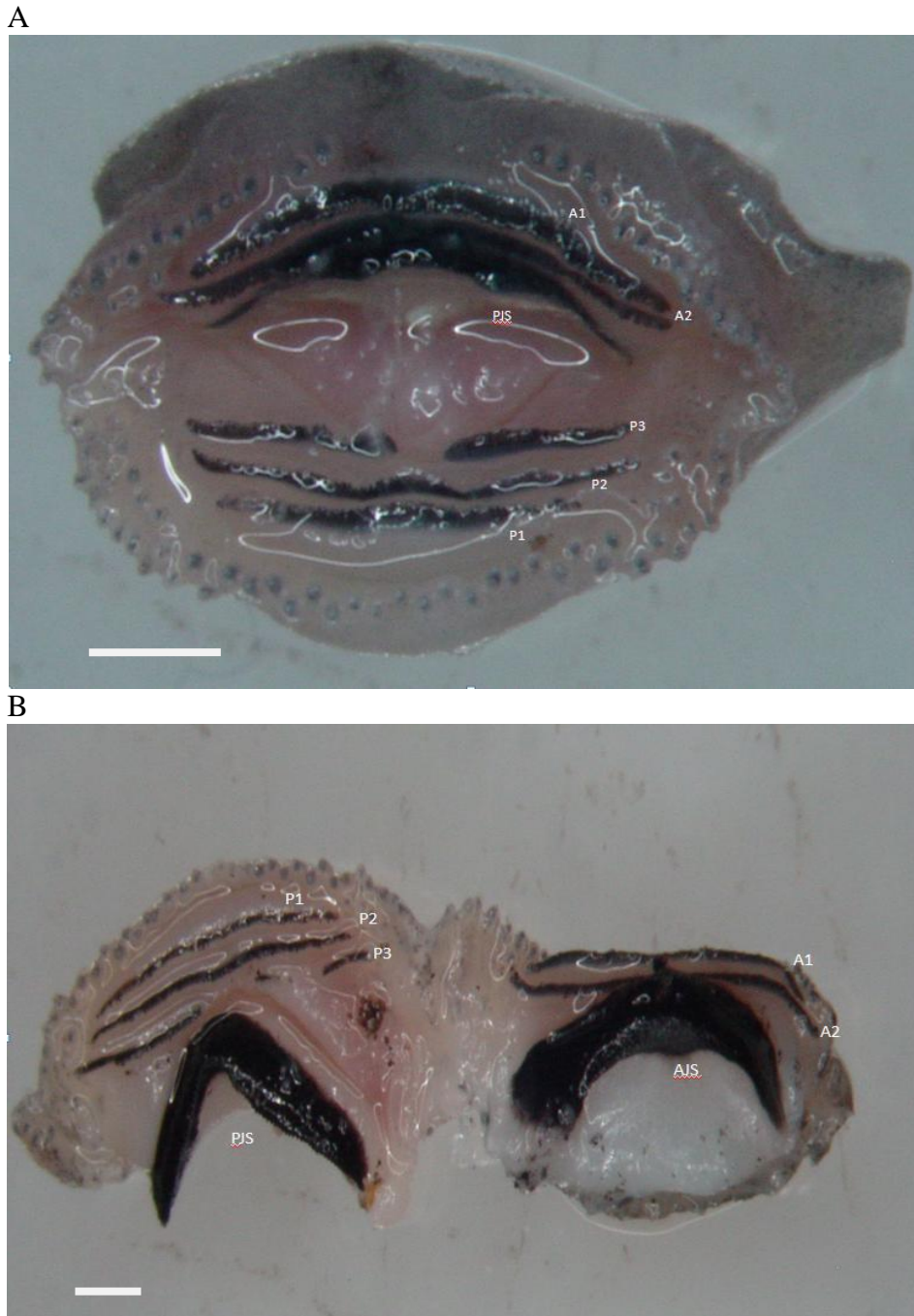
B



**Figura 4.** Cortes histológicos de *Atelopus ignescens*. A) Piel normal de anfibio KU109201.

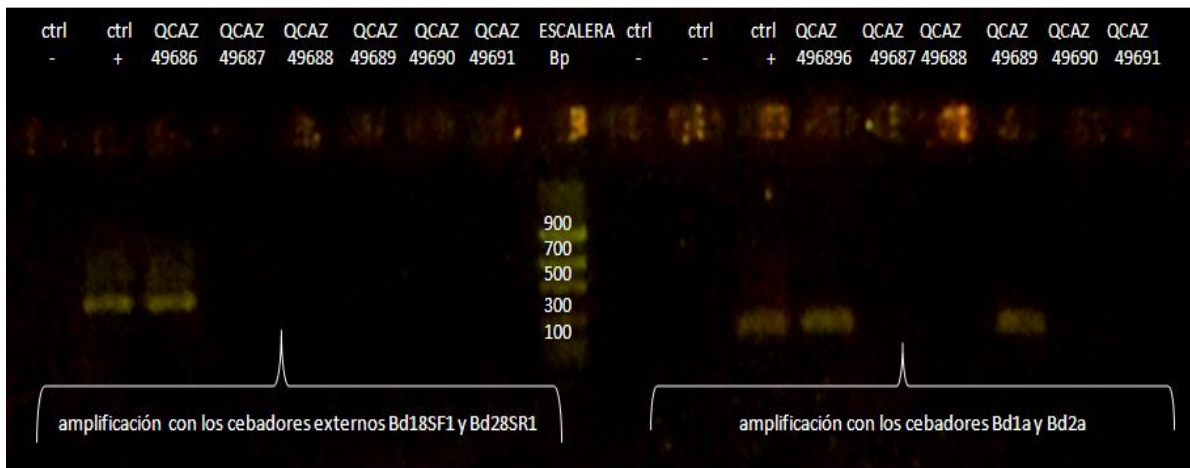
B) Piel con hiperplasia KU 111487.

La flecha negra representa el *stratum intermedium* y la flecha verde el *stratum corneum*. El círculo negro representa una estructura similar a un esporangio vacío. La barra representa 10 $\mu$ m. Foto: Verónica Sáenz.

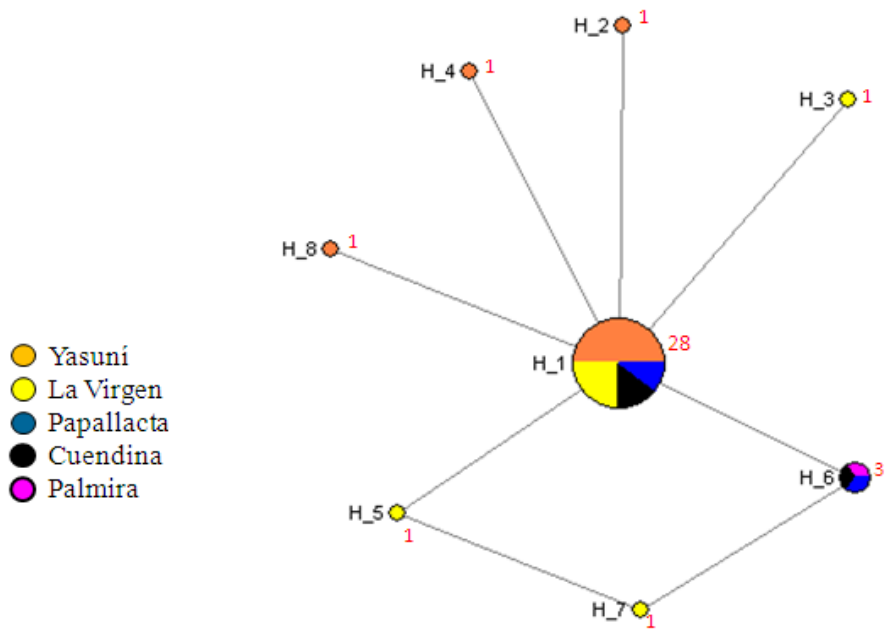


**Figura 5.** Disco oral de boca de renacuajo de *Gastrotheca pseustes*. A. se observa el disco oral completo (QCAZ 50000). B. se encuentra el disco oral con pérdida de pigmentación (QCAZ 50413).

A1 y A2 representan las filas de dientes anteriores. P1, P2 y P3 las filas de dientes posteriores. AJS- Mandíbula anterior y PJS-Mandíbula posterior. Las barras representan 0.5 mm. Fotos: Ailin Blasco.

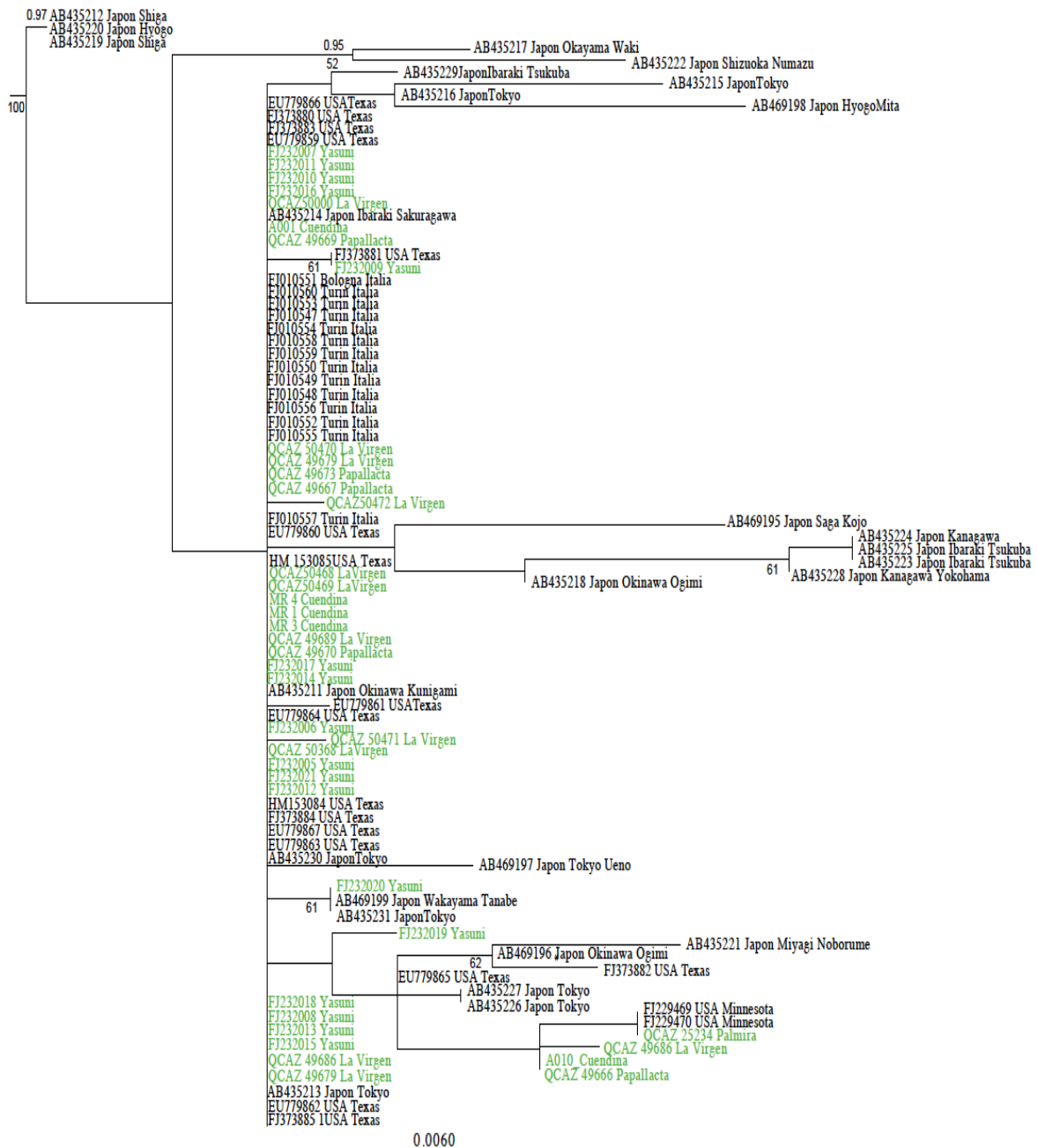


**Figura 6.** Productos de PCR en gel de agarosa de *Batrachochytrium dendrobatidis* amplificados con los iniciadores externos Bd18SF1 y Bd28SR1 en la primera amplificación de la PCR anidada (izquierda) y con los iniciadores internos Bd1a y Bd2a (derecha).



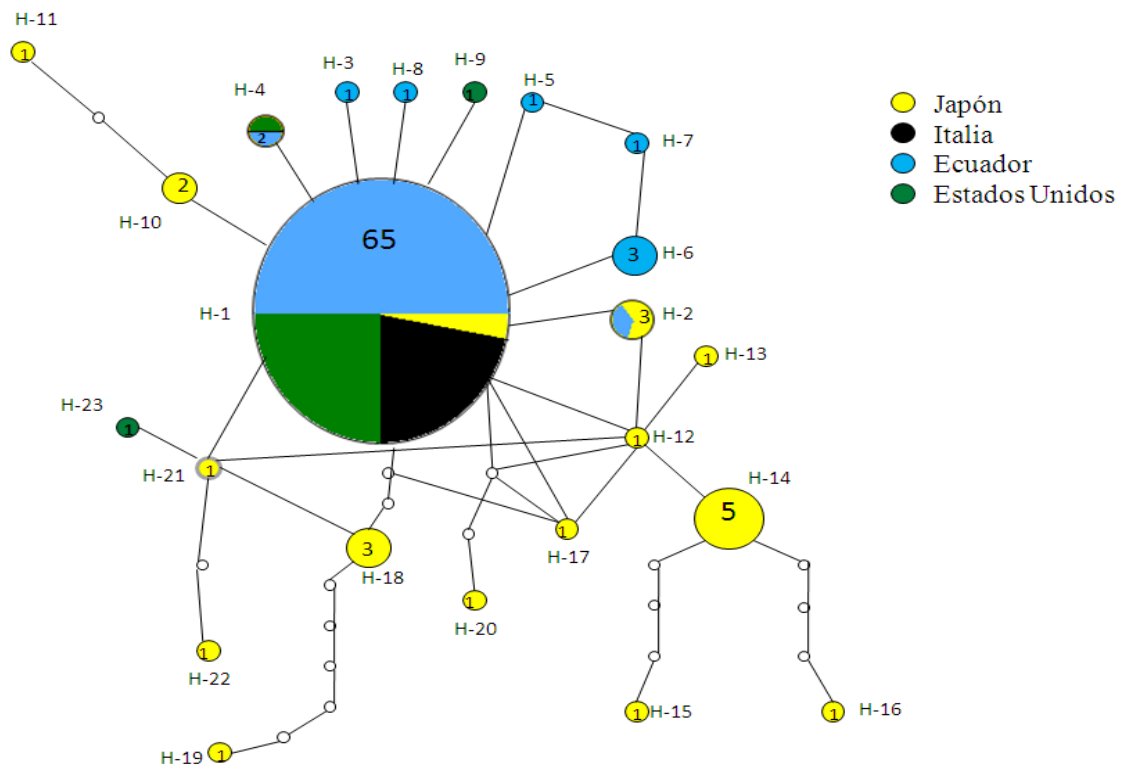
**Figura 7.** Red de haplotipos de la región del ITS1-58s-ITS2 de *Batrachochytrium dendrobatidis* de localidades ecuatorianas.

El tamaño de los círculos está dado por la frecuencia de cada haplotipo. Los números en rojo muestran la frecuencia de cada haplotipo y los números en negro indican el número asignado para cada haplotipo. Las poblaciones de las que provienen los haplotipos se encuentran en la Tabla 2 y las cadenas de los haplotipos en el Anexo 7.



**Figura 8.** Filogenia de la región ITS1-58s-ITS2 de *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Se utilizó muestras de *Bd* y muestras de Rhizophydiales como grupo externo que no se muestran en esta filogenia. Los valores (arriba) representan probabilidades Bayesianas y los valores (abajo) representan los valores de bootstrap. Solamente se incluyeron los valores Bayesianos  $> 0.90$  y los valores de Bootstrap  $> 50$ . Las muestras en verde representan muestras de Ecuador. La escala debajo de la filogenia indica el número de sustituciones.



**Figura 9.** Rede de haplotipos de la región del ITS1-58s-ITS2 de *Batrachochytrium dendrobatidis* que incluye haplotipos ecuatorianos y haplotipos a nivel mundial.

El tamaño de los círculos está dado por la frecuencia de cada haplotipo. Los números dentro de los haplotipos representan la frecuencia de cada haplotipo y los números en negro, indican el número asignado para cada haplotipo. Las poblaciones de las que provienen los haplotipos se encuentran en la Tabla 2.

## **9. TABLAS**

**Tabla1. Grado de infección de los renacuajos de *Gastrotheca pseustes*.**

QCAZ	Especie	Largo del renacuajo (mm)	Estadio <sup>a</sup>	Grado de infección <sup>b</sup>
50413	<i>Gastrotheca pseustes</i>	77.91	Estadio 39	1
50000	<i>Gastrotheca pseustes</i>	79.12	Estadio 39	0
12477	<i>Gastrotheca pseustes</i>	67.7	Estadio 40	1
50416	<i>Gastrotheca pseustes</i>	64.29	Estadio 38	0
24884	<i>Gastrotheca pseustes</i>	68.23	Estadio 38	0
50368	<i>Gastrotheca pseustes</i>	66.61	Estadio 40	0
50468	<i>Gastrotheca pseustes</i>	78.63	Estadio 37	0
50469	<i>Gastrotheca pseustes</i>	72.1	Estadio 40	1
50470	<i>Gastrotheca pseustes</i>	70.6	Estadio 39	0
50471	<i>Gastrotheca pseustes</i>	75.25	Estadio 39	0
50472	<i>Gastrotheca pseustes</i>	73.15	Estadio 37	1
50473	<i>Gastrotheca pseustes</i>	84.65	Estadio 40	0

<sup>a</sup>El estadio 37 indica que los cinco dedos se han separado. El 38 que el tubérculo del metatarso ya se formó. El 39 que la superficie ventral de los dedos está sin pigmentación, lugar en donde los tubérculos subarticulares se van a desarrollar y el estadio 40 que los tubérculos subarticulares están formados, cloaca presente en la cola.

<sup>b</sup>El grado de infección 0 indica que no hay infección 1 que presenta pérdida de dientes y 2 pérdida de la fila entera de dientes.

**Tabla 2. Especímenes usados para el análisis filogenético y para la red de haplotipos.**

Espece	Número de identificación	Número de acceso GenBank	Pais-ciudad/estado	Referencia	N <sup>a</sup>	H <sup>b</sup>
<i>Pristimantis aureolineatus</i>	MF22879	FJ232005	Ecuador, Parque Nacional Yasuní	Mccracken <i>et al.</i> , 2009	1	H1
<i>Pristimantis ockendeni</i>	MF20242	FJ232006	Ecuador, Parque Nacional Yasuní	Mccracken <i>et al.</i> , 2009	1	H1
<i>Pristimantis waoranii</i>	MF22913	FJ232007	Ecuador, Parque Nacional Yasuní	Mccracken <i>et al.</i> , 2009	1	H1
<i>Pristimantis waoranii</i>	MF22944	FJ232008	Ecuador, Parque Nacional Yasuní	Mccracken <i>et al.</i> , 2009	1	H1
<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	MF20330	FJ232009	Ecuador, Parque Nacional Yasuní	Mccracken <i>et al.</i> , 2009	1	H4
<i>Pristimantis waoranii</i>	MF22924	FJ232010	Ecuador, Parque Nacional Yasuní	Mccracken <i>et al.</i> , 2009	1	H1
<i>Pristimantis lanthanites</i>	MF22858	FJ232011	Ecuador, Parque Nacional Yasuní	Mccracken <i>et al.</i> , 2009	1	H1
<i>Leptodactylus rhodomystax</i>	MF20259	FJ232012	Ecuador, Parque Nacional Yasuní	Mccracken <i>et al.</i> , 2009	1	H1
<i>Leptodactylus discodactylus</i>	MF20271	FJ232013	Ecuador, Parque Nacional Yasuní	Mccracken <i>et al.</i> , 2009	1	H1
<i>Leptodactylus discodactylus</i>	MF20261	FJ232014	Ecuador, Parque Nacional Yasuní	Mccracken <i>et al.</i> , 2009	1	H1
<i>Engystomops petersi</i>	MF20224	FJ232015	Ecuador, Parque Nacional Yasuní	Mccracken <i>et al.</i> , 2009	1	H1
<i>Pristimantis aureolineatus</i>	MF20308	FJ232016	Ecuador, Parque Nacional Yasuní	Mccracken <i>et al.</i> , 2009	1	H1
<i>Pristimantis aureolineatus</i>	MF20310	FJ232017	Ecuador, Parque Nacional Yasuní	Mccracken <i>et al.</i> , 2009	1	H1
<i>Pristimantis waoranii</i>	MF20311	FJ232018	Ecuador, Parque Nacional Yasuní	Mccracken <i>et al.</i> , 2009	1	H1
<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	MF22818	FJ232019	Ecuador, Parque Nacional Yasuní	Mccracken <i>et al.</i> , 2009	1	H8
<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	MF20301	FJ232020	Ecuador, Parque Nacional Yasuní	Mccracken <i>et al.</i> , 2009	1	H2
<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	MF22817	FJ232021	Ecuador, Parque Nacional Yasuní	Mccracken <i>et al.</i> , 2009	1	H1
<i>Pristimantis festae</i>	QCAZ 49666		Ecuador, Papallacta	Analizados en esta tesis	2	H6
<i>Pristimantis</i> sp.	QCAZ 49667		Ecuador, Papallacta	Analizados en esta tesis	2	H1
<i>Pristimantis festae</i>	QCAZ 49669		Ecuador, Papallacta	Analizados en esta tesis	2	-

Tabla 2. Continuación

Espece	Número de identificación	Número de acceso GenBank	Pais-ciudad/estado	Referencia	N <sup>a</sup>	H <sup>b</sup>
<i>Pristimantis festae</i>	QCAZ 49670		Ecuador, Papallacta	Analizados en esta tesis	2	H1
<i>Pristimantis festae</i>	QCAZ 49673		Ecuador, Papallacta	Analizados en esta tesis	2	H1
<i>Pristimantis festae</i>	QCAZ 49679		Ecuador, La Virgen	Analizados en esta tesis	2	H1
<i>Pristimantis festae</i>	QCAZ 49680		Ecuador, La Virgen	Analizados en esta tesis	3	H1
<i>Pristimantis festae</i>	QCAZ 49686		Ecuador, La Virgen	Analizados en esta tesis	3	H7
<i>Pristimantis festae</i>	QCAZ 49689		Ecuador, La Virgen	Analizados en esta tesis	3	H1
<i>Gastrotheca pseustes</i>	QCAZ 50000		Ecuador, La Virgen	Analizados en esta tesis	3	H1
<i>Gastrothecapseustes</i>	QCAZ 12477		Ecuador, La Virgen	Analizados en esta tesis	3	-
<i>Gastrothecapseustes</i>	QCAZ 50368		Ecuador, La Virgen	Analizados en esta tesis	3	H1
<i>Gastrothecapseustes</i>	QCAZ 50468		Ecuador, La Virgen	Analizados en esta tesis	3	H1
<i>Gastrothecapseustes.</i>	QCAZ 50469		Ecuador, La Virgen	Analizados en esta tesis	3	H1
<i>Gastrothecapseustes.</i>	QCAZ 50470		Ecuador, La Virgen	Analizados en esta tesis	3	H3
<i>Gastrothecapseustes</i>	QCAZ 50471		Ecuador, La Virgen	Analizados en esta tesis	3	H5
<i>Gastrothecapseustes</i>	QCAZ50472		Ecuador, La Virgen	Analizados en esta tesis	3	H1
<i>Gastrotheca riobambae</i>	MR 1		Ecuador, Cuendina	Analizados en esta tesis	4	H1
<i>Gastrotheca riobambae</i>	MR 3		Ecuador, Cuendina	Analizados en esta tesis	4	H1
<i>Gastrotheca riobambae</i>	MR4		Ecuador, Cuendina	Analizados en esta tesis	4	H1
<i>Gastrotheca riobambae</i>	A001		Ecuador, Cuendina	Analizados en esta tesis	4	H1
<i>Gastrotheca riobambae</i>	A010		Ecuador, Cuendina	Analizados en esta tesis	4	H6
<i>Pristimantis curtipes</i>	QCAZ40734		Ecuador, Palmira	Analizados en esta tesis	5	H6

Tabla 2. Continuación

Espece	Número de identificación	Número de acceso GenBank	Pais ciudad/estado	Referencia	N <sup>a</sup>	H <sup>b</sup>
<i>Cynops ensicauda</i>	Bd-01	AB435211	Japón: Okinawa, Kunigami	Goka <i>et al</i> , 2009		H1
<i>Andrias japonicus</i>	Bd-02	AB435212	Japón: Shiga	Goka <i>et al</i> , 2009		H18
<i>Ceratophrys ornata</i>	Bd-03	AB435213	Japón: Tokio	Goka <i>et al</i> , 2009		H1
<i>Rana</i> (Rugosa) <i>rugosa</i>	Bd-04	AB435214	Japón: Ibaraki, Sakuragawa	Goka <i>et al</i> , 2009		H1
<i>Rana catesbeiana</i>	Bd-05	AB435215	Japón: Tokio	Goka <i>et al</i> , 2009		H15
<i>Rana catesbeiana</i>	Bd-06	AB435216	Japón: Tokio	Goka <i>et al</i> , 2009		H14
<i>Rana catesbeiana</i>	Bd-07	AB435217	Japón: Okayama, Waki	Goka <i>et al</i> , 2009		H14
<i>Cynops ensicauda</i>	Bd-08	AB435218	Japón: Okinawa, Ogimi	Goka <i>et al</i> , 2009		H17
<i>Andrias japonicus</i>	Bd-09	AB435219	Japón: Shiga	Goka <i>et al</i> , 2009		H18
<i>Andrias japonicus</i>	Bd-10	AB435220	Japón: Hyogo	Goka <i>et al</i> , 2009		H18
<i>Rana catesbeiana</i>	Bd-11	AB435221	Japón: Miyagi, Noborume	Goka <i>et al</i> , 2009		H22
<i>Afrixalus fornasinii</i>	Bd-12	AB435222	Japón: Shizuoka, Numazu	Goka <i>et al</i> , 2009		H19
<i>Rana catesbeiana</i>	Bd-13	AB435223	Japón: Ibaraki, Tsukuba	Goka <i>et al</i> , 2009		H14
<i>Rana catesbeiana</i>	Bd-14	AB435224	Japón: Kanagawa, Yokohama	Goka <i>et al</i> , 2009		H14
<i>Rana catesbeiana</i>	Bd-15	AB435225	Japón: Ibaraki, Tsukuba	Goka <i>et al</i> , 2009		H14
<i>Ceratophrys cranwelli</i>	Bd-16	AB435226	Japón: Tokio	Goka <i>et al</i> , 2009		H10
<i>Ceratophrys ornata</i>	Bd-17	AB435227	Japón: Tokio	Goka <i>et al</i> , 2009		H10
<i>Rana catesbeiana</i>	Bd-18	AB435228	Japón: Kanagawa, Yokohama	Goka <i>et al</i> , 2009		H12

Tabla 2. Continuación

Especie	Número de identificación	Número de acceso GenBank	Pais-ciudad/estado	Referencia	N <sup>a</sup>	H <sup>b</sup>
<i>Rana catesbeiana</i>	Bd-19	AB435229	Japón: Ibaraki, Tsukuba	Goka <i>et al.</i> , 2009		H13
<i>Ceratophrys ornata</i>	Bd-20	AB435230	Japón: Tokio	Goka <i>et al.</i> , 2009		H1
<i>Xenopus laevis</i>	Bd-21	AB435231	Japón: Tokio	Goka <i>et al.</i> , 2009		H2
<i>Rana catesbeiana</i>	Bd-22D	AB469195	Japón: Saga, Kojo	Goka <i>et al.</i> , 2009		H11
<i>Cynops ensicauda</i>	Bd-23W	AB469196	Japón: Okinawa, Ogimi	Goka <i>et al.</i> , 2009		H21
<i>Ceratophrys ornata</i>	Bd-24X	AB469197	Japón: Tokio, Ueno	Goka <i>et al.</i> , 2009		H20
<i>Rana catesbeiana</i>	Bd-25Y	AB469198	Japón: Hyogo, Mita	Goka <i>et al.</i> , 2010		H16
<i>Fejervarya limnocharis</i>	Bd-26Z	AB469199	Japón: Wakayama, Tanabe	Goka <i>et al.</i> , 2011		H2
<i>Eurycea sosorum</i>	SS01	EU779859	USA, Texas	Gaertner <i>et al.</i> , 2009		H1
<i>Eurycea nana</i>	NAD4	EU779860	USA, Texas	Gaertner <i>et al.</i> , 2009		H1
<i>Eurycea tonkawae</i>	TK01	EU779861	USA, Texas	Gaertner <i>et al.</i> , 2009		H9
<i>Eurycea tonkawae</i>	TK04	EU779862	USA, Texas	Gaertner <i>et al.</i> , 2009		H1
<i>Eurycea neotenes</i>	TK09	EU779863	USA, Texas	Gaertner <i>et al.</i> , 2009		H1
<i>Eurycea tonkawae</i>	TK13	EU779864	USA, Texas	Gaertner <i>et al.</i> , 2009		H1
<i>Eurycea tonkawae</i>	TK09	EU779865	USA, Texas	Gaertner <i>et al.</i> , 2009		H14
<i>Eurycea pterophila</i>	PT12	EU779866	USA, Texas	Gaertner <i>et al.</i> , 2009		H1
<i>Eurycea tonkawae</i>	TK03	EU779867	USA, Texas	Gaertner <i>et al.</i> , 2009		H1
<i>Lithobates sylvaticus</i>	TG00378	FJ229469	USA, Minnesota, Itasca State Park	Rodriguez <i>et al.</i> , 2009		-
<i>Lithobates pipiens</i>	TG00412	FJ229470	USA, Minnesota, Itasca State Park	Rodriguez <i>et al.</i> , 2009		-
<i>Acris crepitans blanchardi</i>	DAO3_Bd_IG05_06	FJ373880	USA, Texas	Gaertner <i>et al.</i> , 2009		H1

Tabla 2. Continuación

Espece	Número de identificación	Número de acceso GenBank	Pais ciudad/estado	Referencia	N <sup>a</sup> H <sup>b</sup>
<i>Acris crepitans blanchardi</i>	AD27_Bd_IG77_78	FJ373881	USA, Texas	Gaertner <i>et al.</i> , 2009	H13
<i>Acris crepitans blanchardi</i>	DAO4_Bd_JG07_08	FJ373882	USA, Texas	Gaertner <i>et al.</i> , 2009	H23
<i>Acris crepitans blanchardi</i>	DNS01_Bd-JG01-02	FJ373883	USA, Texas	Gaertner <i>et al.</i> , 2009	H1
<i>Acris crepitans blanchardi</i>	AD25_Bd_JG73_74	FJ373884	USA, Texas	Gaertner <i>et al.</i> , 2009	H1
<i>Acris crepitans blanchardi</i>	DA15_Bd_JG89_90	FJ373885	USA, Texas	Gaertner <i>et al.</i> , 2009	H1
<i>Bufo houstonensis</i>	MF04876	HM153084	USA, Texas	Gaertner <i>et al.</i> , 2009	H1
<i>Bufo nebulifer</i>	MF19994	HM153085	USA, Texas	Gaertner <i>et al.</i> , 2009	H1
<i>Pelophylax esculentus</i>	MIB_zpl_00671	FJ010547	Italia, Turín, Cascina Belvedere	Federici <i>et al.</i> , 2009	H1
<i>Pelophylax esculentus</i>	MIB_zpl_00672	FJ010548	Italia, Turín, Cascina Belvedere	Federici <i>et al.</i> , 2009	H1
<i>Pelophylax esculentus</i>	MIB_zpl_00673	FJ010549	Italia, Turín, Tetti Brossa	Federici <i>et al.</i> , 2009	H1
<i>Pelophylax esculentus</i>	MIB_zpl_00674	FJ010550	Italia, Turin, Tetti Brossa	Federici <i>et al.</i> , 2009	H1
<i>Bombina pachypus</i>	MIB_zpl_00675	FJ010551	Italia, Bologna	Federici <i>et al.</i> , 2009	H1
<i>Pelophylax esculentus</i>	MIB_zpl_00676	FJ010552	Italia, Turín, Cantarana	Federici <i>et al.</i> , 2009	H1
<i>Pelophylax esculentus</i>	MIB_zpl_00677	FJ010553	Italia, Turín, Cascina Belvedere	Federici <i>et al.</i> , 2009	H1
<i>Pelophylax esculentus</i>	MIB_zpl_00678	FJ010554	Italia, Turín, Bric del Papa	Federici <i>et al.</i> , 2009	H1
<i>Pelophylax esculentus</i>	MIB_zpl_00679	FJ010555	Italia, Turín, Bric del Papa	Federici <i>et al.</i> , 2009	H1
<i>Pelophylax esculentus</i>	MIB_zpl_00680	FJ010556	Italia, Turín, Tetti Brossa	Federici <i>et al.</i> , 2009	H1
<i>Pelophylax esculentus</i>	MIB_zpl_00681	FJ010557	Italia, Turín, Tetti Brossa	Federici <i>et al.</i> , 2009	H1
<i>Pelophylax esculentus</i>	MIB_zpl_00682	FJ010558	Italia, Turín, Tetti Brossa	Federici <i>et al.</i> , 2009	H1
<i>Pelophylax esculentus</i>	MIB_zpl_00683	FJ010559	Italia, Turín, Tetti Brossa	Federici <i>et al.</i> , 2009	H1
<i>Pelophylax esculentus</i>	MIB_zpl_00684	FJ010560	Italia, Turín, Tetti Brossa	Federici <i>et al.</i> , 2009	H1

**Tabla 2. Continuación**

Especie	Número de identificación	Número de acceso GenBank	Pais ciudad/estado	Referencia	N <sup>a</sup>	H <sup>b</sup>
<i>Rhizophydium</i> sp.	PL-AUS-003	DQ485633	Australia, NSW	Letcher <i>et al.</i> , 2006		
<i>Rhizophydium</i> sp.	PL-AUS-009	DQ485637	Australia, NSW	Letcher <i>et al.</i> , 2007		
<i>Rhizophydium</i> sp.	PL-AUS-012	DQ485639	Australia, NSW	Letcher <i>et al.</i> , 2008		

El número de identificación corresponde al espécimen del cual el hongo fue aislado.

<sup>a</sup>Los números Números (N) son los encontrados en el mapa de distribución. El número de identificación corresponde al espécimen del cual el hongo fue aislado.

<sup>b</sup>H indica la letra del haplotipo usado para la realización de redes de haplotipos.

**Tabla 3. Promedio de los parámetros del modelo de evolución del análisis bayesiano.**

Mejor Modelo	Valor de AICc	Taza de pares de bases de la matriz									Frecuencia de las bases			
		I	G	K	AG	AC	AT	CG	CT	GT	A	C	G	T
F81+G	2821.1760	0	0.0330	206	0.8879	0	0.5982	0.9591	0.3919	1	0.3881	0.1481	0.1521	0.3118

Abreviaciones AIC. = Akaike information criterion, I = proporción de sitios invariables, G = forma del parámetro de la distribución gamma de la tasa de variación y k = tasa de transiciones y transversiones.

**Tabla 4.** Análisis de presencia/ ausencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* con Montaje Húmedo e Histología.

Año de colecta	Número de especímenes que desprenden piel	Número de especímenes +positivos para Montaje Húmedo	Especímenes con hiperplasia
1962	27	0	1
1967	11	1	6
1971	0	0	0
1975	0	0	0
1977	0	0	0
1984	1	0	2
1985	0	0	0
1986	0	0	0
1987	0	0	0
Total	39	1	9

**Tabla 5.** Probabilidad de encontrar al menos un sapo infectado con histología usando diferentes prevalencias tomando en cuenta los datos. de Hyatt *et al.*, 2007.

Día de infección basado en Hyatt <i>et al.</i> , 2007	Prevalencia	Porcentaje de falsos negativos basados en Hyatt <i>et al.</i> , 2007	Probabilidad de éxito	Probabilidad de que al menos 1 individuo esté infectado
Día 21	1%	72.4%	0.724%	62.21%
Día 42	1%	50%	0.5%	58.04%
Día 21	5%	72.4%	3.62%	97.74%
Día 42	5%	50%	2.5%	94.17%
Día 21	26.2%	72.4%	18.97	100%
Día 42	26.2%	50%	13.1	100%

El porcentaje de falsos negativos según el día de infección fueron tomados del artículo de Hyatt *et al.*, 2007. Para el total de la muestra se sumaron a las 107 analizadas en esta tesis, las 26 muestras negativas analizadas por Merino-Viteri, 2001.

**Tabla 6.** Prevalencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* por especie de hospedero en muestras ecuatorianas.

<b>Especie</b>	<b>Prevalencia Positivos/Total</b>
<i>Pristimantis festae</i>	7/26
<i>Pristimantis thymelensis</i>	1/4
<i>Pristimantis curtipes</i>	1/20
<i>Pristimantis</i> sp.	1/1
<i>Gastrotheca pseustes</i> (larvas)	12/12
<i>Gastrotheca riobambae</i>	7/13
<b>Total</b>	<b>29/ 77</b>

**Tabla 7.** Prevalencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en las localidades muestreadas en Ecuador.

<b>Especie</b>	<b>Localidad</b>	<b>Prevalencia Positivos/Total</b>
<i>Pristimantis festae</i>	Papallacta, Comudidad Valle del Tambo	3/5
<i>Pristimantis thymelensis</i>	Papallacta, Comudidad Valle del Tambo	1/1
<i>Pristimantis</i> sp.	Papallacta, Comudidad Valle del Tambo	1/1
<i>Pristimantis curtipes</i>	Papallacta, Comudidad Valle del Tambo	0/2
<i>Gastrotheca pseustes</i>	Papallacta, Comudidad Valle del Tambo	0/1
Subtotal de Papallacta		5/10
<i>Pristimantis festae</i>	La Virgen	4/21
<i>Pristimantis curtipes</i>	La Virgen	0/9
<i>Pristimantis thymelensis</i>	La Virgen	0/3
Renacuajos de <i>Gastrotheca pseustes</i>	La Virgen	12/12
Subtotal de La Virgen		16/45
<i>Pristimantis curtipes</i>	Desierto de Palmira, hacienda Tabrilla	1/9
<i>Gastrotheca riobambae</i>	Cuendina	7/13
<b>Total</b>		<b>29/77</b>

**Tabla 8.** Frecuencias absolutas de los haplotipos ecuatorianos basados en secuencias de ITS en las diferentes localidades muestreadas.

Haplotipo	Localidad					Total
	Yasuni	La Virgen	Cuendina	Papallacta	Palmira	
H1	14	7	4	3	0	28
H2	1	0	0	0	0	1
H3	0	1	0	0	0	1
H4	1	0	0	0	0	1
H5	0	1	0	0	0	1
H6	0	0	1	1	1	3
H7	0	1	0	0	0	1
H8	1	0	0	0	0	1
Total	17	10	5	4	1	37

**Tabla 9.** Análisis de varianza molecular AMOVA de las variaciones genéticas entre poblaciones y dentro de poblaciones de las secuencias de Ecuador de *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	4	1.188	0.00129	0.45
Dentro de poblaciones	32	9.244	0.28888	99.55
Total	36	10.432	0.29017	

Índice de fijación  $F_{ST} = 0.00446$

Valor  $P = 0.45161$

Se realizaron 1000 permutaciones.

**Tabla 10.** Distancias genéticas basadas en los primers Bd1a y Bd2a para los individuos muestreados a nivel mundial.

<b>Poblaciones</b>	<b>Distancia genética<sup>a</sup></b>
Japón (H19)- Japón (H15)	0.06
Ecuador (H7)-Japón (H19)	0.04
Ecuador(H7)-Italia (H1)	0.007
Ecuador (H7)-Estados Unidos (H23)	0.01
Japón (H19) -Estados Unidos (H9)	0.037
Japón (H19)-Italia (H1)	0.03
Estados-Unidos (H23)-Italia (H1)	0.007

<sup>a</sup> Distancia calculada con Mesquite v. 2.73

## **11. ANEXOS**

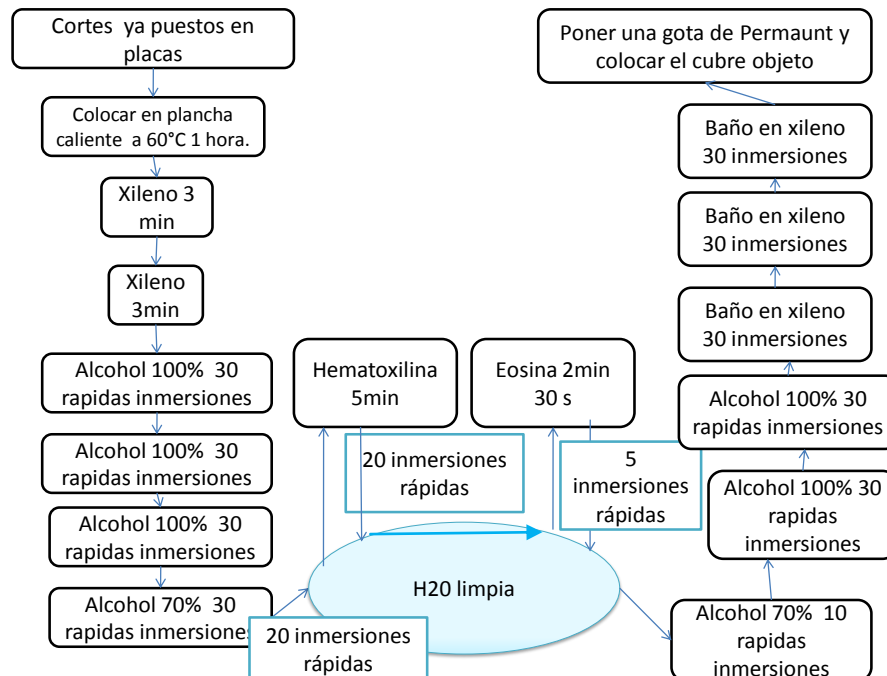
**Anexo 1.** Protocolo modificado de Berger *et al.* (2009) para la toma de muestras para la realización del montaje húmedo.

1. Se utilizó pinzas y agujas de insulina para retirar los pedazos de piel que se desprenden del sapo.
2. Se extendió el pedazo de piel en el porta objetos con una gota de agua mili-Q de manera que quede solo una capa de epidermis.
3. Se colocó el cubre objeto de 22 x 22 mm sobre la muestra.
4. Para la observación de las muestras se utilizó un microscopio de contraste de fases (Axioscop 2 plus) y se utilizó la magnitud de 400x para observar la presencia de zoosporangios
5. Se tomó fotos de piel de especímenes sanos y de aquellos que parecían tener el hongo.
6. De los especímenes en los que se encontró zoosporas se enviaron las fotos a Joyce Longcore para la confirmación del diagnóstico.
7. Se realiza la histología de todos los especímenes que presenten dudas en esta prueba para confirmación de los resultados.

**Anexo 2.** Proceso de deshidratación e inclusión de la maquina Shandon Excelsior.

Paso	Reactivo	Tiempo en min	Temperatura °C
1	Formol 10%	60	40
2	Formol 10%	60	40
3	Alcohol 100%	60	40
4	Alcohol 100%	60	40
5	Alcohol 100%	60	40
6	Alcohol 100%	60	40
7	100%	60	40
8	Xileno	60	40
9	Xileno	60	40
10	Xileno	60	40
11	Parafina	30	60
12	Parafina	30	60
13	Parafina	60	60
14	Parafina	60	60

**Anexo 3.** Protocolo para La tinción de placas con eosina y hematoxilina tomado de Mendez (2010).



**Anexo 4.** Protocolo de tinción para hongos Grocott's Methenamine Silver (GMS) , utilizando el protocolo modificado de Grocott (Luna, 1968).

1. Después de quitar la parafina de las placas con cortes ponerlas en agua durante 3min.
2. Oxidizar en 5% de ácido crómico por una hora.
3. Lavar en el chorro de agua de la llave por 10 minutos.
4. Poner en bisulfato de sodio 1 min para remover todo residuo de ácido crómico.
5. Sumergir en agua de la llave y en agua destilada una vez.
6. Poner las placas en la solución de plata a 60° C de 2 a 5 min.
7. Lavar en agua destilada
8. Poner en 0.1% de cloruro de oro por 5 min.
9. Lavar en agua destilada.
10. Remover los residuos de plata con 2% de trisulfato de sodio de 1-2 min.
11. Lavar rapidamente.
12. Contrastar con verde claro.
13. Esperar a que se seque y cubrir las placas.

**Anexo 5.** Método de diagnóstico de *Batrachochytrium dendrobatidis* modificado del protocolo de Berger *et al.* (1999).

1. Se examinó el estratum corneum a x200 o a x400 en el microscopio Axioscop 2 plus.
2. Se buscó en el estratum corneum estructuras redondas intracelulares y áreas de hiperqueratosis o lugares en donde la superficie de la epidermis es irregular.
3. Si se observa la presencia de las estructuras mencionadas anteriormente examinar usando el lente x400 o el de x1000.
4. Se realizó un diagnóstico usando una tabla en la que se anotó presencia o ausencia de zoosporangios, morfología (esférica, redonda, septada o esfera colapsada), tipo de pared (delgada, gruesa y uniforme) y el contenido (esporangios vacíos, con zoosporas o con bacterias).

**Anexo 6.** Tabla 3 del artículo de Hyatt et al., (2007). En esta tabla *Batrachochytrium dendrobatidis* fue inoculado en *Mixophyes fasciolatus*. Indica la sensibilidad del diagnóstico y los intervalos de confianza (95% CI) usando diferentes técnicas de diagnóstico con protocolos diferentes entre los días 0 y 42 post-infección. 150 muestras fueron tomadas (30 sapos en 5 períodos de tiempo). El día 0 fue excluido ya que no se encontró *Bd*. DSe: sensibilidad del diagnóstico; NA: no se aplica

Day p.i.	Test/sampling protocol	No. of results		DSe	Limit at 95% CI	
		Positive	Infected		Lower	Upper
0	TaqMan PCR/Wash	0	0	NA	NA	NA
	TaqMan PCR/Toe clip	0	0	NA	NA	NA
	H&E	0	0	NA	NA	NA
	IPX	0	0	NA	NA	NA
7	TaqMan PCR/Wash	17	30	57	0.4	0.7
	TaqMan PCR/Toe clip	4	30	13	0.0	0.3
	H&E	0	30	0	0.0	0.1
	IPX	0	30	0	0.0	0.1
14	TaqMan PCR/Wash	17	30	57	0.4	0.7
	TaqMan PCR/Toe clip	16	30	53	0.4	0.7
	H&E	2	30	7	0.0	0.2
	IPX	2	30	7	0.0	0.2
21	TaqMan PCR/Wash	26	30	87	0.7	1.0
	TaqMan PCR/Toe clip	15	30	50	0.3	0.7
	H&E	8	29	28	0.1	0.5
	IPX	9	29	31	0.2	0.5
35	TaqMan PCR/Wash	29	30	97	0.8	1.0
	TaqMan PCR/Toe clip	26	30	87	0.7	1.0
	H&E	19	30	63	0.4	0.8
	IPX	21	29	72	0.5	0.9
42	TaqMan PCR/Wash	26	30	87	0.7	1.0
	TaqMan PCR/Toe clip	26	30	87	0.7	1.0
	H&E	15	30	50	0.3	0.7
	IPX	17	30	57	0.4	0.7

**Anexo 7.** Protocolo del laboratorio de molecular de anfibios PUCE QCAZ para el uso del espectrofotómetro nanodrop y la cuantificación de la concentración del ADN extraído.

1. Iniciar el nanodrop y realizar un blanco con H<sub>2</sub>O grado PCR.
2. Realizar otro blanco con la solución final en la que se encuentra el ADN extraído (en nuestro caso Prepman Ultra).
3. Colocar de 1.5 a 1.8 µl de la muestra en el objetivo y cuantificar.
4. Una buena concentración (pureza) y calidad de ADN se considera cuando se evalúa los valores dados en las absorbancias de 260/230 y 260/280 respectivamente. Un valor óptimo que se lee en la absorbancia es de 1.8-2.
5. El reporte con cada una de las muestras cuantificadas se almacena automáticamente en el reporte correspondiente a cada muestra.

**Anexo 8.** Secuencias de los haplotipos encontrados en Ecuador. Los números corresponden a los haplotipos que se encuentran en la red de haplotipos de las Figuras 7 y 9.

Haplotipo H1

AGTCGAACAAAATTTATTTATTTTTTCGACAAATTAATTGGAAATTGAATAATTTAATTGAAAAA  
AATTGAAAATAAATATTTAAAAACAACCTTTTGACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCAACGATGAAGAA  
CGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAACCTTTGTGAATCATTAAATCTTTGAACGCAC  
ATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGAGAATTATAAAAATACATTGTCCGAATTGA

Haplotipo H2

AGTCGAACAAAATTTATTTATTTTTTCGACA----AATTGGAAATTGAATGATTTAATTG AAA-  
AAAATTGAAAATAAATATTTAAAAACAACCTTTTGACAACGGATCTCTTGGCTCT  
CGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAACCTTTGTGAATCATT  
AAATCTTTGAACGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGAGAATTATAAAAATACATTG  
TCCGAATTGA

Haplotipo H3

AGTCGAACAAAATTTATTTATTTTTTCGACAAATTAATTGGAAATTGAATAATTTAATTGAAA-  
AAAATTGAAAATAAATATTTAAAAACAACCTTTTGACAACGGATCTCTTGGCTCT  
CGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGGTACGTAATGTGAATTGCAAACCTTTGTGAATCATT  
AAATCTTTGAACGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGAGAATTATAAAAATACATTG  
TCCGAATTGA

Haplotipo H4

AGTCGAACAAAATTTATTTATTTTTTCGACAAATTAATTGGAAATTTAATAATTTAATTGAAA-  
AAAATTGAAAATAAATATTTAAAAACAACCTTTTGACAACGGATCTCTTGGCTCT  
CGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAACCTTTGTGAATCATT  
AAATCTTTGAACGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGAGAATTATAAAAATACATTG  
TCCGAATTGA

Haplotipo H5

GTCGAACAAAATTTATTTATTTTTTTGACAAATTAATTGGAAATTGAATAATTTAATTGAAA-  
AAAATTGAAAATAAATATTTAAAAACAACCTTTTGACAACGGATCTCTTGGCTCTC  
GCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAACCTTTGTGAATCATT  
AATCTTTGAACGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGAGAATTATAAAAATACATTGT  
CCGAATTGA

Haplotipo H6

AGTGGAACAAAATTTATTTATTTTTTCGACAAATTAATTGGAAATTGAATAATTTAATTGAAA-  
AAAATTGAAAATAAATATTTAAAAACAACCTTTTGACAAC  
GGATCTCTTGGCTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAA  
CCTTTGTGAATCATTAAATCTTTGAACGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGAGAATT  
ATAAAAATACATTGTCCGAATTGA

Haplotipo H7

AGTGGAACAAAATTTATTTATTTTTTTGACAAATTAATTGGAAATTGAATAATTTAATTGAAA-  
AAAATTGAAAATAAATATTTAAAAACAACCTTTTGACAACG  
GATCTCTTGGCTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAACC  
TTTGTGAATCATTAAATCTTTGAACGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGAGAATTAT  
AAAAATACATTGTCCGAATTGA

Haplotipo H8

AGTCGAACAAA-----ATTTTTTCGACAAATTAATTGGAAATTGAATAATTA AATTGAAA-  
AAAATTGAAAATAAATATTTAAAAACAACCTTTTGACAACGG  
ATCTCTTGGCTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAACCT  
TTGTGAATCATTAAATCTTTGAACGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGAGAATTAT  
AAAAATACATTGTCCGAATTGA

**Anexo 9.** Diagnóstico de quitridiomycosis realizado con montaje húmedo y con histología. The University of Kansas Natural History Museum (KU), Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (QCAZ) y Smithsonian Institution Natural Museum of Natural History (USNM).

Número	Fecha de colección	Provincia	Localidad	Elevación (m)	Parte de la piel analizada	Diagnóstico Montaje húmedo	Corte histológico	Síntomas	Diagnóstico histología
KU109201	26/03/67	Napo	Ladera Este Paso de Guamaní	3720	parche y piernas	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109202	26/03/67	Napo	Ladera Este Paso de Guamaní	3720	parche y piernas	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109203	26/03/67	Napo	Ladera Este Paso de Guamaní	3720	parche y piernas	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109204A	26/03/67	Napo	Ladera Este Paso de Guamaní	3720	pies y parche	Negativo	Parche	Piel sin infección	Negativo
KU109204B	26/03/67	Napo	Ladera Este Paso de Guamaní	3720	pies y parche	Negativo	Parche	Piel sin infección	Negativo
KU109204C	26/03/67	Napo	Ladera Este Paso de Guamaní	3720	pies y parche	Negativo	Parche	Piel sin infección	Negativo
KU109204D	26/03/67	Napo	Ladera Este Paso de Guamaní	3720	pies y parche	Negativo	Parche	Piel sin infección	Negativo
KU109204E	26/03/67	Napo	Ladera Este Paso de Guamaní	3720	pies y parche	Negativo	Parche	Piel sin infección	Negativo
KU109205	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	parche, pies y manos	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109206	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	parche, pies y manos	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109207	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	parche, pies y manos	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109208	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	parche, pies y manos	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109209	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109210	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109211	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	parche, pies y manos	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109212	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	parche, pies y manos	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109213	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	parche, pies y manos	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo

**Anexo 9.** Continuación

Número	Fecha de colección	Provincia	Localidad	Elevación (m)	Parte de la piel analizada	Diagnóstico Montaje húmedo	Corte histológico	Síntomas	Diagnóstico histología
KU109214	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	parche, pies y manos	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109215	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	parche, pies y manos	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109216	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	parche, pies y manos	Negativo	Membrana	hiperplasia	Negativo
KU109217	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	parche, pies y manos	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109218	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	parche, pies y manos	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109219	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109220	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	parche, pies y manos	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109221	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	parche, pies y manos	Negativo	Membrana	hiperplasia zoosporangios posibles	Negativo
KU109222	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	parche, pies y manos	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109223	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	parche, pies y manos	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109224	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	parche, pies y manos	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109225	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	parche, pies y manos	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109226	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU109227	26/03/67	Napo	Ladera Oeste Paso de Guamaní	3940	parche, pies y manos	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111462	13/07/67	Pichincha	20 km al Este de Pifo, Paso de Guamaní	3960	parche y pies	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111463	13/07/67	Pichincha	20 km al Este de Pifo, Paso de Guamaní	3960	parche y pies	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111464	13/07/67	Pichincha	20 km al Este de Pifo, Paso de Guamaní	3960	Manos	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111465	13/07/67	Pichincha	20 km al Este de Pifo, Paso de Guamaní	3960	no se pudo extraer	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo

**Anexo 9.** Continuación

Número	Fecha de colección	Provincia	Localidad	Elevación (m)	Parte de la piel analizada	Diagnóstico Montaje húmedo	Corte histológico	Síntomas	Diagnóstico histología
KU111466	13/07/67	Pichincha	20 km al Este de Pifo, Paso de Guamaní	3960	no se pudo extraer	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111467	13/07/67	Pichincha	20 km al Este de Pifo, Paso de Guamaní	3960	no se pudo extraer	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111468	13/07/67	Pichincha	20 km al Este de Pifo, Paso de Guamaní	3960	parche y pies	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111469	13/07/67	Pichincha	20 km al Este de Pifo, Paso de Guamaní	3960	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111470	13/07/67	Pichincha	20 km al Este de Pifo, Paso de Guamaní	3960	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111471	13/07/67	Pichincha	20 km al Este de Pifo, Paso de Guamaní	3960	brazos y parche	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111472	13/07/67	Pichincha	20 km al Este de Pifo, Paso de Guamaní	3960	parche y piernas	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111473	13/07/67	Pichincha	20 km al Este de Pifo, Paso de Guamaní	3960	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111474	13/07/67	Pichincha	20 km al Este de Pifo, Paso de Guamaní	3960	no se pudo extraer	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111475	13/07/67	Pichincha	20 km al Este de Pifo, Paso de Guamaní	3960	toda la piel ventral se desprende	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111476	13/07/67	Pichincha	20 km al Este de Pifo, Paso de Guamaní	3960	parche y piernas	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111477	13/07/67	Pichincha	20 km al Este de Pifo, Paso de Guamaní	3960	pies axilas y parche	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111478	13/07/67	Pichincha	20 km al Este de Pifo, Paso de Guamaní	3960	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111479	13/07/67	Pichincha	20 km al Este de Pifo, Paso de Guamaní	3960	no se pudo extraer	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111480	13/07/67	Napo	1 km al Oeste de Papallacta	3190	Parche	Esporangios septados y vacíos	Membrana	hiperplasia posibles zoosporangios	Negativo
KU111485	13/07/67	Napo	1 km al Oeste de Papallacta	3190	brazos y axilas	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo

**Anexo 9.** Continuación

Número	Fecha de colección	Provincia	Localidad	Elevación (m)	Parte de la piel analizada	Diagnóstico Montaje húmedo	Corte histológico	Síntomas	Diagnóstico histología
KU111486	13/07/67	Napo	1 km al Oeste de Papallacta	3190	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	Membrana	Hiperplasia posibles zoosporangios	Negativo
KU111487	13/07/67	Napo	1 km al Oeste de Papallacta	3190	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	Membrana	Hiperplasia posibles zoosporangios	Negativo
KU111488	13/07/67	Napo	1 km al Oeste de Papallacta	3190	Brazos	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111489	13/07/67	Napo	1 km al Oeste de Papallacta	3190	parche y axilas	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111490	13/07/67	Napo	1 km al Oeste de Papallacta	3190	parche y piernas	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111491	13/07/67	Napo	1 km al Oeste de Papallacta	3190	Parche	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111492	13/07/67	Napo	1 km al Oeste de Papallacta	3190	Parche	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111493	13/07/67	Napo	1 km al Oeste de Papallacta	3190	Parche	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU111497A	13/07/67	Napo	1 km al Oeste de Papallacta	3190	Parche	Negativo	Parche	Piel sin infección	Negativo
KU111497B	13/07/67	Napo	1 km al Oeste de Papallacta	3190	Parche	Negativo	Parche	Piel sin infección	Negativo
KU111497C	13/07/67	Napo	1 km al Oeste de Papallacta	3190	No se pudo extraer	Negativo	Parche	Hiperplasia	Negativo
KU111497D	13/07/67	Napo	1 km al Oeste de Papallacta	3190	Parche	Negativo	Parche	Piel sin infección	Negativo
KU111497E	13/07/67	Napo	1 km al Oeste de Papallacta	3190	Parche	Negativo	Parche	Piel sin infección	Negativo
KU142949	28/09/71	Napo	Papallacta	3130	parche	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU164758	26/04/75	Napo	Laguna de Papallacta	3330	parche brazos y piernas	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU178342	13/07/77	Napo	1 km al Oeste de Papallacta	3190	Parche	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU178343	13/07/77	Napo	1 km al Oeste de Papallacta	3190	Parche y piernas	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU201122	18/03/84	Napo	6.7 km al Oeste Papallacta	3030	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	Membrana	hiperplasia	Negativo
KU201123	18/03/84	Napo	6.7 km al Oeste de Papallacta	3030	no se pudo extraer	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU201124	18/03/84	Napo	6.7 km al Oeste de Papallacta	3030	no se pudo extraer	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo

## Anexo 9. Continuación

Número	Fecha de colección	Provincia	Localidad	Elevación (m)	Parte de la piel analizada	Diagnóstico o Montaje húmedo	Corte histológico	Síntomas	Diagnóstico histología
KU201125	18/03/84	Napo	6.7 km al Oeste de Papallacta	3030	axilas y brazos	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU201126	18/03/84	Napo	6.7 km al Oeste de Papallacta	3030	Parche	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU201127	18/03/84	Napo	6.7 km al Oeste de Papallacta	3030	Parche	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU201128	18/03/84	Napo	Ladera Este Paso de Guamaní	3720	no se pudo extraer	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
KU201129	18/03/84	Napo	Ladera Este Paso de Guamaní	3720	no se pudo extraer	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
QCAZ18	01/05/85	Napo	Papallacta		No desprende piel		Membrana	hiperplasia posibles zoosporangios	Negativo
QCAZ130	01/12/85	Napo	Papallacta		No desprende piel		Membrana	Piel sin infección	Negativo
QCAZ264	01/10/84	Napo	Páramo de Guamaní		No desprende piel		Membrana	Piel sin infección	Negativo
QCAZ265	01/10/84	Napo	Páramo de Guamaní		No desprende piel		Membrana	Piel sin infección	Negativo
QCAZ266	01/10/84	Napo	Páramo de Guamaní		No desprende piel		Membrana	Piel sin infección	Negativo
QCAZ267	01/10/84	Napo	Páramo de Guamaní		No desprende piel		Membrana	Piel sin infección	Negativo
QCAZ268	01/10/84	Napo	Páramo de Guamaní		No desprende piel		Membrana	Piel sin infección	Negativo
QCAZ269	01/10/84	Napo	Páramo de Guamaní		No desprende piel		Membrana	hiperplasia posibles zoosporangios	Negativo
QCAZ270	01/10/84	Napo	Páramo de Guamaní		No desprende piel		Membrana	hiperplasia	Negativo
QCAZ384	01/05/86	Napo	Páramo de Guamaní		No desprende piel		Membrana	Piel sin infección	Negativo
QCAZ773	01/06/87	Napo	Guamaní		No desprende piel	-	Membrana	Piel sin infección	Negativo
USNM236684	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	Membrana	Piel sin infección	Negativo
USNM236685	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	Membrana	Piel sin infección	Negativo

**Anexo 9.** Continuación

Número	Fecha de colección	Provincia	Localidad	Elevación (m)	Parte de la piel analizada	Diagnóstico Montaje húmedo	Corte histológico	Síntomas	Diagnóstico histología
USNM236686	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236687	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	Membrana	Piel sin infección	Negativo
USNM236688	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	Membrana	Piel sin infección	Negativo
USNM236689	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	Membrana	Piel sin infección	Negativo
USNM236690	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	Membrana	Piel sin infección	Negativo
USNM236691	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	Membrana	Piel sin infección	Negativo
USNM236692	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236693	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236694	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236695	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	-	-	-
USNM236696	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236697	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236698	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236699	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236700	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236701	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236702	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236703	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236704	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	-	-	-
USNM236705	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	-	-	-

**Anexo 9.** Continuación

Número	Fecha de colección	Provincia	Localidad	Elevación (m)	Parte de la piel analizada	Diagnóstico Montaje Húmedo	Corte histológico	Síntomas	Diagnóstico Histología
USNM236706	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	-	-	-
USNM236707	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236708	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236709	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	-	-	-
USNM236710	05/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236711	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	Membrana	Piel sin infección	Negativo
USNM236712	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236713	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236714	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	Membrana	Piel sin infección	Negativo
USNM236715	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236716	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	-	-	-
USNM236717	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236718	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	-	-	-
USNM236719	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236720	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236721	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236722	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-

**Anexo 9.** Continuación

Número	Fecha de colección	Provincia	Localidad	Elevación (m)	Parte de la piel analizada	Diagnóstico Montaje húmedo	Corte histológico	Síntomas	Diagnóstico histología
USNM236723	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	-	-	-
USNM236724	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	-	-	-
USNM236725	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236726	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236727	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236728	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	-	-	-
USNM236729	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	-	-	-
USNM236730	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236731	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236732	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236733	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236734	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	-	-	-
USNM236735	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236736	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236737	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236738	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236739	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236740	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236741	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236742	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-

**Anexo 9.** Continuación

<b>Número</b>	<b>Fecha de colección</b>	<b>Provincia</b>	<b>Localidad</b>	<b>Elevación (m)</b>	<b>Parte de la piel analizada</b>	<b>Diagnóstico Montaje húmedo</b>	<b>Corte histológico</b>	<b>Síntomas</b>	<b>Diagnóstico histología</b>
USNM236743	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236744	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236745	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236746	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236747	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236748	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236749	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
USNM236750	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236751	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236752	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
USNM236753	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236754	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236755	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
USNM236756	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236757	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236758	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236759	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236760	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236761	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-

**Anexo 9.** Continuación

Número	Fecha de colección	Provincia	Localidad	Elevación (m)	Parte de la piel analizada	Diagnóstico Montaje húmedo	Corte histológico	Síntomas	Diagnóstico Histología
USNM236762	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236763	06/07/62	Napo	Papallacta	3155	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	-	-	-
USNM236764	05/07/62	Napo	Papallacta	3094	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
USNM236765	05/07/62	Napo	Papallacta	3094	No desprende piel	-	Membrana	Hiperplasia posibles zoosporangios	Negativo
USNM236766	05/07/62	Napo	Papallacta	3094	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236767	05/07/62	Napo	Papallacta, cerca del Río Papallacta	3109	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
USNM236768	05/07/62	Napo	Papallacta, cerca del Río Papallacta	3109	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
USNM236769	05/07/62	Napo	Papallacta, cerca del Río Papallacta	3109	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
USNM236770	05/07/62	Napo	Papallacta, cerca del Río Papallacta	3109	No desprende piel	-	Membrana	Piel sin infección	Negativo
USNM236771	05/07/62	Napo	Papallacta, cerca del Río Papallacta	3109	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
USNM236772	05/07/62	Napo	Papallacta, cerca del Río Papallacta	3109	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	Membrana	Piel sin infección	Negativo
USNM236773	05/07/62	Napo	Papallacta, cerca del Río Papallacta	3109	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	-	-	-
USNM236774	05/07/62	Napo	Papallacta, cerca del Río Papallacta	3109	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236775	05/07/62	Napo	Papallacta, cerca del Río Papallacta	3109	No desprende piel	-	-	-	-

**Anexo 9.** Continuación

<b>Número</b>	<b>Fecha de colección</b>	<b>Provincia</b>	<b>Localidad</b>	<b>Elevación (m)</b>	<b>Parte de la piel analizada</b>	<b>Diagnóstico Montaje húmedo</b>	<b>Corte histológico</b>	<b>Síntomas</b>	<b>Diagnóstico histología</b>
USNM236776	05/07/62	Napo	Papallacta, cerca del Rio Papallacta	3109	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	-	-	-
USNM236777	05/07/62	Napo	Papallacta, cerca del Rio Papallacta	3109	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236778	05/07/62	Napo	Papallacta, cerca del Rio Papallacta	3109	No desprende piel	-	-	-	-
USNM236779	05/07/62	Napo	Papallacta, cerca del Rio Papallacta	3109	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	-	-	-
USNM236780	05/07/62	Napo	Papallacta, cerca del Rio Papallacta	3109	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	-	-	-
USNM236781	05/07/62	Napo	Papallacta, cerca del Rio Papallacta	3109	Desprende piel en todo el cuerpo	Negativo	-	-	-



**Anexo 10.** Análisis de presencia/ausencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* utilizando una PCR anidada.

QCAZ	Especie	Localidad	Altitud	Fecha de colección	Diagnóstico
49666	<i>Pristimantis festae</i>	Papallacta Comunidad Valle del Tambo	3631	21/10/2010	Positivo
49667	<i>Pristimantis</i> sp.	Papallacta Comunidad Valle del Tambo	3631	21/10/2010	Positivo
49668	<i>Pristimantis festae</i>	Papallacta Comunidad Valle del Tambo	3631	21/10/2010	Negativo
49669	<i>Pristimantis festae</i>	Papallacta Comunidad Valle del Tambo	3631	21/10/2010	Positivo
49670	<i>Pristimantis thymelensis</i>	Papallacta Comunidad Valle del Tambo	3631	21/10/2010	Positivo
49671	<i>Pristimantis curtipes</i>	Papallacta Comunidad Valle del Tambo	3631	21/10/2010	Negativo
49672	<i>Pristimantis festae</i>	Papallacta Comunidad Valle del Tambo	3631	21/10/2010	Negativo
49673	<i>Pristimantis festae</i>	Papallacta Comunidad Valle del Tambo	3631	21/10/2010	Positivo
49674	<i>Pristimantis curtipes</i>	Papallacta Comunidad Valle del Tambo	3631	21/10/2010	Negativo
49675	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Papallacta Comunidad Valle del Tambo	3631	21/10/2010	Negativo
49676	<i>Pristimantis festae</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Negativo
49677	<i>Pristimantis festae</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Positivo
49678	<i>Pristimantis festae</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Negativo
49679	<i>Pristimantis festae</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Positivo
49680	<i>Pristimantis festae</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Negativo
49681	<i>Pristimantis festae</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Negativo
49682	<i>Pristimantis festae</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Negativo
49683	<i>Pristimantis festae</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Negativo
49684	<i>Pristimantis festae</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Negativo
49685	<i>Pristimantis festae</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Negativo
49686	<i>Pristimantis festae</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Positivo
49687	<i>Pristimantis festae</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Negativo
49688	<i>Pristimantis festae</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Negativo
49689	<i>Pristimantis festae</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Positivo
49690	<i>Pristimantis festae</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Negativo
49691	<i>Pristimantis festae</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Negativo
49692	<i>Pristimantis festae</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Negativo
49693	<i>Pristimantis festae</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Negativo
49694	<i>Pristimantis festae</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Negativo
49695	<i>Pristimantis festae</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Negativo
49696	<i>Pristimantis thymelensis</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Negativo
49697	<i>Pristimantis thymelensis.</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Negativo
49698	<i>Pristimantis festae</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Negativo

## Anexo 10. Continuación

QCAZ	Especie	Localidad	Altitud	Fecha de colección	Diagnóstico
49700	<i>Pristimantis curtipes</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Negativo
49701	<i>Pristimantis curtipes</i>	La virgen	3640	23/10/2010	Negativo
49702	<i>Pristimantis curtipes</i>	La virgen	3640	23/10/2010	Negativo
49703	<i>Pristimantis curtipes</i>	La virgen	3640	23/10/2010	Negativo
49704	<i>Pristimantis curtipes</i>	La virgen	3640	23/10/2010	Negativo
49705	<i>Pristimantis curtipes</i>	La virgen	3640	23/10/2010	Negativo
49706	<i>Pristimantis curtipes</i>	La virgen	3640	23/10/2010	Negativo
49707	<i>Pristimantis curtipes</i>	La virgen	3640	23/10/2010	Negativo
49708	<i>Pristimantis curtipes</i>	La virgen	3640	23/10/2010	Negativo
49709	<i>Pristimantis thymelensis</i>	La virgen	3640	23/10/2010	Negativo
49710	<i>Gastrotheca pseustes</i>	La virgen	3640	23/10/2010	Positivo
50413	<i>Gastrotheca pseustes</i>	La virgen	3640	23/10/2010	Positivo
12477	<i>Gastrotheca pseustes.</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Positivo
50416	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Positivo
24884	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Positivo
50368	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Guamaní	3950	22/10/2010	Positivo
50468	<i>Gastrotheca pseustes</i>	La virgen	3949	29/01/2011	Positivo
50469	<i>Gastrotheca pseustes</i>	La virgen	3949	29/01/2011	Positivo
50470	<i>Gastrotheca pseustes</i>	La virgen	3949	29/01/2011	Positivo
50471	<i>Gastrotheca pseustes</i>	La virgen	3949	29/01/2011	Positivo
50472	<i>Gastrotheca pseustes</i>	La virgen	3949	29/01/2011	Positivo
50473	<i>Gastrotheca pseustes</i>	La virgen	3949	29/01/2011	Positivo
A001	<i>Gastrotheca riobambae</i>	Cuendina		09/07/2009	Positivo
A005	<i>Gastrotheca riobambae</i>	Cuendina		11/06/2009	Positivo
A006	<i>Gastrotheca riobambae</i>	Cuendina		09/07/2009	Negativo
A008	<i>Gastrotheca riobambae</i>	Cuendina		10/07/2009	Negativo
A010	<i>Gastrotheca riobambae</i>	Cuendina		11/07/2009	Positivo
MR-1	<i>Gastrotheca riobambae</i>	Cuendina		21/11/2009	Positivo
MR-2	<i>Gastrotheca riobambae</i>	Cuendina		22/11/2009	Negativo
MR-3	<i>Gastrotheca riobambae</i>	Cuendina		27/11/2009	Positivo
MR-4	<i>Gastrotheca riobambae</i>	Cuendina		27/11/2009	Positivo
MR-5	<i>Gastrotheca riobambae</i>	Cuendina		27/11/2009	Positivo
MR-6	<i>Gastrotheca riobambae</i>	Cuendina		27/11/2009	Negativo
SRJ1	<i>Gastrotheca riobambae</i>	Cuendina		27/11/2009	Negativo
SRJ2	<i>Gastrotheca riobambae</i>	Cuendina		27/11/2009	Negativo
40726	<i>Pristimantis curtipes</i>	Desierto de Palmira, hacienda Tabrilla	3210	06/03/2009	Negativo
40727	<i>Pristimantis curtipes</i>	Desierto de Palmira, hacienda Tabrilla	3210	06/03/2009	Negativo
40728	<i>Pristimantis curtipes</i>	Desierto de Palmira, hacienda Tabrilla	3210	06/03/2009	Negativo

**Anexo 10.** Continuación

QCAZ	Especie	Localidad	Altitud	Fecha de coleccion	Diagnóstico
40729	<i>Pristimantis curtipes</i>	Desierto de Palmira, hacienda Tabrilla	3210	06/03/2009	Negativo
40730	<i>Pristimantis curtipes</i>	Desierto de Palmira, hacienda Tabrilla	3210	06/03/2009	Negativo
40731	<i>Pristimantis curtipes</i>	Desierto de Palmira, hacienda Tabrilla	3210	06/03/2009	Negativo
40732	<i>Pristimantis curtipes</i>	Desierto de Palmira, hacienda Tabrilla	3210	06/03/2009	Negativo
40733	<i>Pristimantis curtipes</i>	Desierto de Palmira, hacienda Tabrilla	3210	06/03/2009	Negativo
40734	<i>Pristimantis curtipes</i>	Desierto de Palmira, hacienda Tabrilla	3210	06/03/2009	Positivo

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Verónica Sáenz Calderón, C.I. 1712490182 autora del trabajo de graduación intitulado: “Genética de poblaciones y prevalencia del hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios de Papallacta y Guamani, Ecuador”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

- 1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENECYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea entregado al Sistema Nacional de información de la Educación superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
- 2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 1 de diciembre de 2011

Srta Verónica Sáenz

C:I: 1712490182