PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

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

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

MARÍA DEL CARMEN VIZCAÍNO BARBA

Quito, 2012

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata María del Carmen Vizcaíno Barba ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. María Eugenia Ordóñez Maldonado

Directora de la Disertación

Quito, diciembre de 2012

A mis hijos, mi mayor tesoro.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por haberme dado la fortaleza y valor para concluir mi carrera a pesar de todos los obstáculos que se me presentaron.

A mis hijos: José David, Kamila, Nicolás y Zoé, por ser la motivación más grande para no dejarme derrotar, sino al contrario, levantarme y esforzarme por llegar a la meta.

A mi esposo David, por ser un compañero incondicional y haberme brindado todo su apoyo a lo largo de mi carrera; por alentarme siempre y no dejar de creer en mí.

A mis padres, por su ejemplo, su apoyo, tanto económico como moral y por su confianza inquebrantable en mí. A mis hermanos por su apoyo.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, y a la Dirección General Académica, por haber financiado la presente investigación.

A María Eugenia Ordóñez, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo. Por haber sido una maestra y directora ejemplar y, sobretodo, por su guía, apoyo y la confianza que depositó en mí.

A Charlie Barnes por transmitirme sus conocimientos, sus consejos y su apoyo.

A Andrés Merino y Miryan Rivera por las correcciones realizadas a la presente disertación y sus valiosas sugerencias.

A Santiago Ron por sus consejos para los análisis filogenéticos.

A Andrés Merino y Diego Almeida por su apoyo en la determinación de los datos de las muestras procedentes de los terrarios de la Balsa de los Sapos de la PUCE.

A quienes trabajaron en el Laboratorio de Biología Molecular Qcaz mientras duró mi investigación, por su apoyo y contribución a este trabajo: Andrea Manzano, Diana Flores, Gabriela Nicholls, Daniel Chávez, Gabriela Pozo y María José Pozo.

También agradezco a quienes me enseñaron a utilizar los programas de bioinformática necesarios para realizar mis análisis: Miguel Pinto, Ana Troya y Marcel Caminer. A Pablo Menéndez por sus sugerencias para los análisis estadísticos.

Agradezco a todos mis compañeros y amigos de la carrera por haber sido un gran apoyo, y por continuar siéndolo. Un agradecimiento especial a Fer Yauri, Caro Toapanta, Gaby U, Kary B, Fernandina, Janice María, Luz Marina, Stephy Salas, Tanita y Gaby Lu; por estar conmigo en las buenas y en las malas.

Y no puedo dejar de agradecer también a todos los profesores que, en determinado momento de la carrera, fueron un apoyo incondicional y, siempre, un ejemplo a seguir. Aquellos que me enseñaron que no por ser un profesional, se deja de ser humano: María Eugenia Ordóñez, Myrian Rivera, Violeta Rafael, Mercedes Rodríguez, Katya Romoleroux, Elisa Bonacorso, Luis Coloma y Andrés Merino.

A todos, ¡muchas gracias!

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS..... III

TABLA DE CONTENIDOS..... VII

LISTA DE FIGURAS..... X

LISTA DE TABLAS..... XII

LISTA DE ANEXOS..... XIV

1. RESUMEN..... 1

2. ABSTRACT..... 3

3. INTRODUCCIÓN..... 5

3.1.SITUACIÓN ACTUAL DE LOS ANFIBIOS A NIVEL MUNDIAL Y POSIBLES CAUSAS DE LA DECLINACIÓN DE ESPECIES..... 5

3.2. *Batrachochytrium dendrobatidis* Y LA QUITRIDIOMICOSIS..... 6

3.3. POSIBLES ORÍGENES DE LA QUITRIDIOMICOSIS..... 9

3.4. DETECCIÓN Y CULTIVO DE *Batrachochytrium dendrobatidis*..... 10

3.5. SITUACIÓN DE LOS ANFIBIOS EN ECUADOR..... 11

3.6. OBJETIVOS..... 13

3.6.1. OBJETIVO GENERAL..... 13

3.6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 13

4. **MATERIALES Y MÉTODOS**..... 14

4.1 MUESTRAS DE *Batrachochytrium dendrobatidis* ANALIZADAS.. 14

4.2. CUANTIFICACIÓN DEL ADN..... 15

4.3. AMPLIFICACIÓN Y VISUALIZACIÓN DEL ADN..... 15

4.3.1 ANÁLISIS DEL ADN NUCLEAR…….. 17

4.3.2 ANÁLISIS DE LA REGIÓN ITS1-5.8S DE ADN RIBOSOMAL 17

4.3.2.1 PRIMER PASO DE PCR ANIDADA…… 18

4.3.2.2 SEGUNDO PASO DE PCR ANIDADA…….. 19

4.4. SECUENCIAMIENTO DE LAS MUESTRAS……. 20

4.5. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS……. 20

4.6ANÁLISIS DE LOS LOCI VARIABLES DEL AND NUCLEAR……... 21

4.7ANÁLISIS DE LA REGIÓN ITS…… 21

4.7.1ESTIMACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS……. 21

4.7.2DISTANCIA GENÉTICA Y BÚSQUEDA DE GRUPOS ENTRE LOS HAPLOTIPOS DE LA REGIÓN ITS…… 22

4.7.3DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS HAPLOTIPOS DE LA REGION ITS1.5.8S ……..... 23

4.7.4 FILOGENIA ……..... 23

5. RESULTADOS…… 25

5.1. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA METODOLOGÍA PROPUESTA…… 25

5.2.AMPLIFICACIÓN DE LOCI NUCLEARES…… 25

5.3. AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS…….. 26

5.4. DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Batrachochytrium dendrobatidis*… 27

5.4.1. DIVERSIDAD DE LOCI POLIMÓRFICOS (SNP)…….. 27

5.4.2. DIVERSIDAD DE HAPLOTIPOS ECUATORIANOS PARA LA REGIÓN ITS…….. 28

5.4.3.DIVERSIDAD DE HAPLOTIPOS INTERNACIONALES PARA LA REGIÓN ITS**.**…… 31

5.5 FILOGENIA..... 33

6. DISCUSIÓN..... 35

6.1. EFICIENCIA DE LA METODOLOGÍA IMPLEMENTADA PARA LA AMPLIFICACION DEL ADN DE *Batrachochytrium dendrobatidis* 35

6.2. DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS LOCI NUCLEARES..... 40

6.3. DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA REGIÓN ITS..... 45

6.4. FILOGENIA..... 54

7. CONCLUSIONES..... 57

8. LITERATURA CITADA..... 59

9. FIGURAS..... 73

10. TABLAS..... 85

11. ANEXOS..... 114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mapa de distribución de las muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis* analizadas..... 74

Figura 2 Proporción de muestras amplificadas para cada loci variable y la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal de *Batrachochytrium dendrobatidis*, en el primer intento y en las repeticiones..... 75

Figura 3 Proporción de muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis* heterocigotas para los 8 loci variables analizados..... 75

Figura 4 Red de haplotipos de la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal de muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis* procedes de diferentes localidades del Ecuador..... 76

Figura 5 Análisis de componentes principales (PCA) de muestras ecuatorianas de *Batrachochytrium dendrobatidis,* en base a los haplotipos encontrados para la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal..... 77

Figura 6 Análisis de componentes principales (PCA) de la secuencia de la región ITS1-5.8S para las muestras ecuatorianas de *Batrachochytrium dendrobatidis*, según ubicación norte-sur..... 77

Figura 7 Análisis de componentes principales (PCA)de muestras ecuatorianas de *Batrachochytrium dendrobatidis,* en base a las provincias del hospedero..... 78

Figura 8 Análisis de componentes principales (PCA) para las muestras ecuatorianas de *Batrachochytrium dendrobatidis* en base a procedencia (silvestre-cautiverio)..... 79

Figura 9 Análisis de componentes principales (PCA) en base a especies de anfibios hospederas de las muestras ecuatorianas de *Batrachochytrium dendrobatidis*…… 79

Figura 10 Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras ecuatorianas de *Batrachochytrium dendrobatidis,* en base al modo reproductivo de los géneros hospederos..……..... 80

Figura 11 Red de haplotipos de la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal de muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis*a nivel mundial……. 81

Figura 12 Análisis de componentes principales (PCA) de muestras mundiales de *Batrachochytrium dendrobatidis* en base a los haplotipos encontrados para la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal……... 82

Figura 13 Filogenia de secuencias de la región ITS1-58S de *Batrachochytrium dendrobatidis*……..... 83

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis* procedentes del Ecuador analizadas para la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal y SNP..... 86

Tabla 2 Alelos encontrados en las muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis* amplificadas, para los ocho loci variables analizados..... 93

Tabla 3 Frecuencias alélicas de muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis* heterocigotas por provincia para los ocho loci nucleares analizados..... 96

Tabla 4 Frecuencia de muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis* heterocigotas para los ocho loci nucleares analizados..... 98

Tabla 5 Porcentajes de heterocigocidad y loci polimórficos de las muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis* analizadas para los ocho loci nucleares, por hospedero y por provincia..... 99

Tabla 6 Frecuencias de los haplotipos de la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal de *Batrachochytrium dendrobatidis*, en las diferentes localidadesecuatorianas muestreadas..... 100

Tabla 7 Análisis molecular de la varianza (AMOVA) de los haplotipos de la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal de *Batrachochytrium dendrobatidis* encontrados en el Ecuador, agrupados por regiones, provincias, procedencia, hospederos y modo reproductivo del hospedero..... 101

Tabla 8 Muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis* procedentes de

otros países incluídas en los análisis filogenéticos y de haplotipos de la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal……..... 102

Tabla 9 Frecuencias de los haplotiposde la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal de*Batrachochytrium dendrobatidis*en los diferentes países..……. 110

Tabla 10 Análisis molecular de la varianza (AMOVA) de los haplotipos dela región ITS1-5.8S de ADN ribosomal de *Batrachochytrium dendrobatidis* entre países……. 112

Tabla 11 Distancias genéticas de Nei de los haplotipos de la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal de *Batrachochytrium dendrobatidis* entre países…..……... 113

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 Muestras de ADN de *Batrachochytrium dendrobatidis* corridas en gel de agarosa que presentaron degradación del ADN…….... 115

Anexo 2 Características de los cebadores utilizados para la amplificación de los 8 loci nucleares de *Batrachochytrium dendrobatidis.*……... 115

Anexo 3 Muestras de ADN de *Batrachochytrium dendrobatidis* amplificadas para los SNP de los 8 loci nucleares……. 116

Anexo 4 Muestras de ADN de *Batrachochytrium dendrobatidis* amplificadas para la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal…….. 117

Anexo 5 Secuencias de los haplotipos de la región ITS-5.8S de ADN ribosomal de *Batrachochytrium dendrobatidis*encontrados en Ecuador……..... 118

Anexo 6 Categorías de amenaza y modo reproductivo de las especies de anfibios hospederas de las muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis* analizadas.……..... 120

1. RESUMEN

El hongo quítrido *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), causante de la quitridiomicosis, ha ocasionado severos impactos en las poblaciones de anfibios a nivel mundial en las últimas décadas. Dos hipótesis intentan explicar la propagación de esta enfermedad. La primera sugiere que este patógeno es de aparición reciente en sitios vulnerables; la segunda sostiene que siempre ha estado presente, como comensal o simbionte, y se ha hecho más virulento debido a los cambios ambientales en la dinámica patógeno-hospedero.

Enel Ecuador no se han realizado estudios de diversidad genética de las poblaciones de *Bd* y la quitridiomicosis amenaza también a las poblaciones locales de anfibios. Tales estudios son útiles para entender la estructuración genética de las poblaciones. El objetivo del presente estudio fue determinar la variabilidad genética de muestras del hongo tomadas de hospederos de diferentes localidades en el Ecuador. Se trabajó con marcadores de polimorfismos de nucléotido simple (SNP) para ocho loci variables, además de la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal (ADNr) del hongo. La región ITS-5.8S de ADNrtuvo un mayor porcentaje de éxito en la amplificación, debido a que seutilizó la técnica de PCR anidado.

Los análisis de diversidad genética y filogenia utilizando máxima verosimilitud e inferencia bayesiana, indican que existe poca variabilidad genética en las muestras de *Bd* analizadas. Estos resultados sugieren que la hipótesis de introducción reciente del patógeno sería la de mayor soporte en el caso del Ecuador.No se observó un patrón de diferenciación geográfico entre los haplotipos encontrados, sin embargo, la diversidad de haplotipos encontrados sugiere que pudieron haber múltiples eventos de introducción del hongo al país.

Los resultados de este estudio contribuyen a la implementación de planes de manejo y conservación efectivos para las especies de anfibios amenazadas. Se recomienda analizar un mayor número de muestras de*Bd*a nivel nacional y mundial, incluyendo otros loci, de modo que se pueda inferir el origen de este patógeno.

Palabras clave: *Batrachochytrium dendrobatidis*,diversidad genética, filogenia, haplotipos, marcadores moleculares,quitridiomicosis.

2. ABSTRACT

The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), which causes chytridiomycosis, is responsible for severe impacts on amphibian populations worldwide in recent decades. Two hypotheses attempt to explain the spread of this disease. The first suggests that this pathogen is of recent onset in vulnerable places, the second holds that it was always present, as commensal or symbiont, and has become more virulent due to environmental changes in host-pathogen dynamics.

In Ecuador there are no studies of genetic diversity of populations of *Bd* and chytridiomycosis is a threat to local populations of amphibians too. Genetic diversity studies are useful for understanding the genetic structure of populations. The objective of the present studyis to determine the genetic variability of the fungus samples taken from hosts of different localities in Ecuador. We used single nucleotide polymorphisms (SNPs) markers for eight variable loci, plus the ITS1-5.8S ribosomal DNA (rDNA) of the fungus. The ITS-5.8s rDNA region had a higher percentage of success in amplification because nested PCR was used.

Analyses of genetic diversity and phylogeny using maximum likelihood and bayesian inferencemethods indicate that there is little genetic variability in the *Bd* samples analyzed. These results suggest that the hypothesis of recent introduction of the pathogen would be of more support in the case of Ecuador. There was no geographic pattern of differentiation between haplotypes, however, haplotype diversity found suggests that there may have multiple independent introductions of the fungus into the country.

The results of this study contribute to the implementation of management plans and effective conservation strategies of threatened amphibian species. It is recommended to analyze a larger number of *Bd* samples nationally and globally, including other loci, in order to infer the origin of this pathogen.

Keywords: *Batrachochytrium dendrobatidis*, chytridiomycosis, genetic diversity, haplotype, molecular markers, phylogeny.

3. INTRODUCCIÓN

3.1SITUACIÓN ACTUAL DE LOS ANFIBIOS A NIVEL MUNDIAL Y POSIBLES CAUSAS DE LA DECLINACIÓN DE ESPECIES

Actualmente se conocen 7082 especies de anfibios (AmphibiaWeb, 2012), de las cuales más del 50% están globalmente amenazadas (Daszak *et al.,* 1999, Stuart *et al.,* 2004). Existen algunas posibles causas de este masivo declive, siendo las más críticas la pérdida de hábitat, la contaminación ambiental y la introducción de especies invasivas (GAA, 2012). Sin embargo, en las últimas décadas las enfermedades emergentes han aparecido como una amenaza creciente, provocando mortalidades masivas en varias especies (de Sá, 2005).

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

Los anfibios son considerados bioindicadores del estado de los ecosistemas ya que al poseer una piel sensible, son afectados por factores como la presencia de químicos, incremento de luz ultravioleta y temperatura (Coloma, 2006). Además, son animales muy sensibles a las alteraciones locales del hábitat debido a su estrecha vinculación con el medio terrestre y/o acuático y su limitada

capacidad de desplazamiento (ya que están estrechamente ligados a sus biotipos de reproducción) (Rice *et al.,* 2006). Las declinaciones de los anfibios y su posterior desaparición pueden iniciar una cascada de efectos sobre los ecosistemas, por las relaciones que mantienen con diversas especies (Whittaker y Vrdedenburg, 2010).

3.2*Batrachochytrium dendrobatidis* Y LA QUITRIDIOMICOSIS

El hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*pertenece a un linaje basal de hongos en la división Chytridiomycota, clase Chytridiomycetes, orden Rhizophydiales, familia *incertae sedis*. Es el único quítrido conocido que infecta y se desarrolla dentro de las células epidérmicas queratinizadas de la piel de los anfibios (Fisher *et al.,* 2009). Presenta una fase de zoospora de nado libre que, al contacto con la piel, ingresa a la célula y se enquista. Entonces se desarrolla la fase de talo, que forma uno o varios zooesporangios. Cuando éstos maduran, se abren y liberan nuevamente zoosporas hacia fuera de la piel, en el agua circundante (Longcore *et al.,* 1999).

En laboratorio, *Bd* se desarrolla en un amplio rango de temperaturas, entre 4 y 25ºC (Piotrowski *et al.,* 2004). Sin embargo, se ha visto que la patogenicidad y la virulencia alcanzan su máximo entre los 12 y 23ºC, disminuyendo drásticamente a partir de los 27ºC (Longcore *et al.,* 1999). Esto explica la mayor incidencia de quitridiomicosis en ecosistemas de altura, donde la temperaturas se mantienen bajas, incluyendo los Andes (Bosch *et al.,* 2001; Muths *et al.,* 2003).

La intensidad de la infección parece ser un factor clave en la mortalidad del hospedero, ya que la infección se produce cuando el patógeno ha alcanzado alrededor de 10000 zoosporas fúngicas (Vredenburg *et al.,* 2010). Sin embargo, se conoce poco acerca de los mecanismos que emplea el quítrido para causar la enfermedad, su modo de dispersión y su origen (Morgan *et al.,* 2007). En general, la infección por *Bd* hace que la epidermis se engrose (hiperqueratinosis) y se desprenda. Al extenderse la infección, afecta el equilibrio osmótico del hospedero y los niveles de electrolitos en la sangre descienden. De esta manera, llega a provocar la muerte por paro cardíaco (Berger *et al.,* 1999).

La tasa de mortalidad del hospedero, así como el tiempo que tarda desde la infección, varía según factores como la edad, estilo de vida, especie, dosis de patógeno y cepa (Vredenburg *et al.,* 2010; Cheng *et al.,* 2011). Se cree que la quitridiomicosis se transmite por medio del agua en el estadío de zoospora libre, a pesar de que ésta carece de pared celular resistente y se deseca fácilmente, (James*et al.,* 2006) porque no se ha encontrado una fase sexual o un estadío resistente. Por lo tanto, se asume que la dispersión es causada por individuos infectados, agua contaminada con zoosporas, hojas, ramas o escombros de hábitats acuáticos infectados u hospederos no identificados que actúan como reservorios (Morgan *et al.,* 2007; Collins y Crump 2009). Se han sugerido algunos organismos que podrían estar actuando como estos reservorios, como son insectos, reptiles y plumas de aves(Johnson y Speare, 2005; Phillott *et al.,*2009; Kilburn *et al.,* 2011). No se conoce con certeza cómo puede el hongo sobrevivir en el medio ambiente fuera de sus hospederos anfibios. Se ha sugerido que puede ser capaz de sobrevivir saprobióticamente en queratina en la naturaleza, dado que ha podido reproducirse en piel muerta de anfibios durante una

generación después de que el hospedero ha muerto, pero también se ha observado que la piel del anfibio es rápidamente invadida por otros hongos oomicetes y bacterias, generando competencia contra *Bd* (Longcore *et al*., 1999).

Se ha observado que para la mayoría de anfibios, *Bd* resulta mortal incluso en bajas dosis iniciales. Sin embargo, las salamandras son, en general, menos susceptibles que los anuros, aunque estudios recientes revelan una alta susceptibilidad de las salamandras neotropicales (Rovito *et al.,* 2009). Entre los anuros, se han identificado varias especies resistentes a la quitridiomicosis. Una de las más notables es *Lithobates catesbeianus,* que presenta bajos niveles de infección, sin efectos mortales, tanto en renacuajos como en adultos (Skerrat *et al.,* 2007). Coincide que esta especie ha sido introducida en varios países, incluyendo el Ecuador, para ser criada como animal de laboratorio y para alimentación. Otras especies propuestas como posibles transmisoras o reservorios de *Bd*, por sus bajas tasas de mortalidad, son: *Xenopus laevis* (que también es comercializada en todo el mundo como animal de laboratorio y mascota), *Eleuthrerodactylus coqui, Pseudoeurycea leprosa, Agalychnis callidryas, Leptodactylus pentadactylus, Smilisca phaeota, Bufo marinus, Dendropsophus microcephalus* y algunas salamandras norteamericanas (como *Ambystoma tigrinum*) y japonesas (como *Andrias japonicus*) (Mazzoni *et al.,* 2003; Weldon *et al.,* 2004; Reed *et al.,* 2005; Picco y Collins, 2008; Goka *et al.,* 2009; Schloegel *et al.,* 2009; Bai *et al.,*2010).

En cuanto a los hábitos reproductivos, las especies más afectadas por *Bd*son aquellas que viven o se reproducen en cursos permanentes de agua, especialmente de altura (Skerratt *et al.,* 2007). El género *Atelopus* reúne ambas condiciones y es, sin duda, el género más severamente perjudicado, sobretodo

las especies que habitan sobre 1000 metros de altura (La Marca *et al*., 2005). De las 113 especies descritas y putativas de *Atelopus,* al menos 30 podrían estar extintas, ya que no se ha registrado su presencia durante los últimos 10 años (La Marca*et al*., 2005). Sólo 52 de las especies remanentes cuentan con datos suficientes para evaluar sus tendencias poblacionales. De estas, 81% (42 de 52) han visto sus poblaciones reducidas a la mitad o menos (La Marca *et al*., 2005).

3.3 POSIBLES ORÍGENES DE LA QUITRIDIOMICOSIS

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

Estudios de diversidad genética en muestras de *Bd* procedentes de América del Norte, África y Australia han encontrado niveles extremadamente bajos de diferencias en las secuencias de ADN nuclear y mitocondrial entre las cepas del hongo (Morehouse *et al.,* 2003; James*et al.,* 2009). Esta poca diferenciación genética sugiere que las cepas de diferentes continentes tienen un reciente ancestro común y no han estado evolucionando separadamente por mucho tiempo (Whittaker y Vredenburg, 2010).

Análisis subsecuentes de cepas de *Bd* alrededor del mundo también han sido consistentes con una reproducción clonal del hongo y un rango de expansión rápido y reciente (James*et al.,* 2009). No se conoce con certeza la fuente de introducción que pudiera tener el hongo, aunque se sugiere que puede estar fuertemente relacionada con la dispersión mediada por humanos (Morgan *et al.,* 2007).

Los datos moleculares existentes hasta el momento sugieren un único origen de *Bd* con evidencia de dispersiones locales e internacionales, lo cual brinda un fuerte soporte a la hipótesis del patógeno nuevo. Los descubrimientos de que *Bd* es un organismo diploide, de baja diversidad genética y alta hetorocigosidad, sugieren que la globalización de este linaje es producto del apareamiento entre cepas parentales no idénticas, pero cercanamente relacionadas y heterotálicas (Fisher *et al.,* 2009).

3.4 DETECCIÓN Y CULTIVO DE *Batrachochytriumdendrobatidis*

Para la detección de *Bd* se han empleado varios métodos, dentro de los cuales, los más utilizadosson: análisis histológicos e inmunohistoquímica de piel, análisis de dedos de individuos adultos, baño con solución salina débil (DS) utilizados en cultivos puros, análisis de discos orales extirpados de renacuajos e hisopos (Hyatt *et al.*, 2007). Como herramienta molecular se emplea la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real, la cual permite determinar de manera confiable y segura la presencia de *Bd* (Berger *et al.,* 1999; Boyle *et al.,* 2004). Sin embargo, debido a los altos costos de este procedimiento se utiliza

como alternativa la PCR de punto final. En la actualidad se están desarrollando nuevos métodos de detección tanto para individuos adultos como renacuajos.

Para realizar los diferentes estudios con *Bd*, ya sea para identificación, genéticos omicrobiológicos, se siguen protocolos para cultivar el hongo en medios de cultivo puros (Longcore, 2003). Sin embargo, este procedimiento requiere de cuidado frecuente porque el tiempo de crecimiento del hongo puede variar (hasta tres meses) (Longcore, 2003), además de que se deben tomar medidas extremas por la alta probabilidad de contaminación con bacterias, levaduras u otros microorganismos (Roger *et al.,* 1992; Longcore *et al.,* 1999; Longcore, 2003).

3.5 SITUACIÓN DE LOS ANFIBIOS EN ECUADOR

Ecuador es uno de los países con mayor diversidad de anfibios a nivel mundial, que corresponde a 528 especies registradas, de las cuales 42% son endémicas (Ron *et al.,* 2012). Sin embargo, también es uno de los países con mayor número de especies amenazadas, alcanzando un 31.3% (Ron *et al.,* 2012). Además, existe evidencia sobre una relación causal entre el declive de especies del género *Atelopus* y la quitridiomicosis (Proaño-Bolaños*et al.,* 2007). Otros grupos que han sufrido declinaciones en Ecuador son las ranas acuáticas del género *Telmatobius* y algunas especies de las familias Dendrobatidae y Centrolenidae (ambas asociadas a riachuelos) (Ron *et al.,* 2012). El primer registro de infección por *Bd* en el país data del año 1980, proveniente de la provincia de Cañar, en *Atelopus bomolochos* (Ron y Merino, 2000).

Estudios previos sobre *Bd* en Ecuador se han limitado a determinar su presencia y es muy poco lo que se conoce sobre su origen o mecanismos de

transmisión. Es necesario enfocar esfuerzos prioritarios a la conservación y manejo adecuados de los anfibios del país (Ron *et al*., 2012). Debido a que no se han realizado estudios de diversidad genética de las poblaciones de *Bd* y, dado que la quitridiomicosis es una amenaza latente para las poblaciones locales de anfibios (Ron y Merino, 2000; Proaño-Bolaños *et al.,* 2007), estos estudios son críticos para entender la dinámica de poblaciones y flujo génico de las mismas. Los resultados de este tipo de estudios son vitalespara la aplicación de planes de manejo y conservación efectivos para las especies de anfibios amenazadas (Young *et al.,* 2001; de Sá, 2005).

La presente investigación permitirá desarrollar una metodología efectiva para analizar *Bd* de muestras procedentes de hisopos y determinar la variabilidad genética de muestras tomadas de especímenes de anfibios colectados en varias localidades del Ecuador, con el objeto de dilucidar la variabilidad genética del patógeno y hacer inferencias respesto a su origen. Si *Bd* ha sido introducido recientemente se espera obtener una baja diversidad genética en la poblaciones analizadas, mientras que si este patógeno lleva un largo período de tiempo en el Ecuador, se espera una variabilidad genética alta debido a una mayor asociación evolutiva con el área (Morgan *et al.,* 2007).

3.6 OBJETIVOS

3.6.1OBJETIVO GENERAL

Determinar la variabilidad genética de muestras *de Batrachochytrium dendrobatidis*(*Bd*) procedentes de anfibios infectados de varias localidades en el Ecuador.

3.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la diferenciación genética entre muestrasde *Bd* de diferentes localidades del país mediante la búsqueda de polimorfismos de nucleótido simple o SNP (Single Nucleotide Polymorphism)y la región ITS (Espaciador Transcribible Interno - Internal Transcribed Spacer)de ADN ribosomal del hongo.
- Comparar los niveles de diversidad genética de *Bd* encontrados en Ecuador con los publicados en otras regiones del mundo.
- Identificar marcadores moleculares útiles para futuros estudios poblacionales de *Bd.*
- Desarrollar un protocolo eficiente para analizar muestras de *Bd* procedentes de hisopos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1MUESTRAS DE *Batrachochytrium dendrobatidis*ANALIZADAS

Para los análisis moleculares se trabajó con un total de 73 muestras de ADN de *Bd.* De estas, 57 corresponden a anfibios infectados de 19 localidades del Ecuador, las cuales se encontraban almacenadas a -20 ºC en el Laboratorio de Biología Molecular del Museo de Zoología QCAZ (Tabla 1). Adicionalmente, se incluyó en el análisis ocho muestras de ADN de *Bd* procedentes del Parque Metropolitano de Quito y ocho muestras procedentes de los páramos de La Virgen, Cuendina, Papallacta y Palmira; pertenecientes a dos estudios anteriores realizados por Manzano (2010) y Sáenz (2011), respectivamente. Se incluyeron además dos muestras procedentes de Perú, también almacenadas en el laboratorio, dos muestras procedentes de la Balsa de los Saposde la Pontificia Universidad Católica del Ecuador con localidades y hospederos indeterminados; y dos muestras diagnosticadas previamente como negativas para *Bd* con el objetivo de confirmar este diagnóstico utilizando la metodología de PCR anidada (Tabla 1). La mayoría de estas muestras fueron extraídas a partir de muestras de hisopos (59), las 16 restantes fueron resultado de la extracción de ADN de discos orales de renacuajos (Tabla 1).

Para los análisis filogenéticos y de haplotipos, también se incluyeron 14 secuencias de ADN de *Bd* procedentes del Parque Nacional Yasuní, publicadas por McCracken *et al.*(2009) y 15 secuencias procedentes de las localidades de La Virgen, Papallacta, Cuendina y Palmira, pertenecientes al estudio realizado por

Sáenz (2011) (Tabla1). En total, estas muestras representan 11 provincias del país, cuya distribución se muestra en la Figura 1.

4.2CUANTIFICACIÓN DEL ADN

Se cuantificó la cantidad de ADN presente en cada muestra mediante un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific), el cual midió la concentración en ng de ADN/µL. Se determinó, además, la pureza del ADN respecto a la presencia de ARN u otros contaminantes, como proteínas.

Para interpretar las mediciones obtenidas se consideró una buena calidad de ADN al evaluar los valores dados en las absorbancias de 260/280 y 260/230. Un valor óptimo que se lee en estas absorbancias es entre1.8**–**2 y 1.8–2.2, respectivamente. Se almacenaron los reportes de las cuantificaciones realizadas.

Adicionalmente, se corrieron geles para confirmar la pureza de las muestras de ADN almacenadas (Anexo 1).

4.3 AMPLIFICACIÓN Y VISUALIZACIÓN DEL ADN

Se realizó la reacción de PCR con cada una de las muestras incluyendo, en cada ensayo, un control positivo, que corresponde a una muestra procedente de la cepa JEL423 aislada de *Phyllomedusa lemur* de Panamá (Longcore, 2004) y un control negativo, sin la presencia de ADN, para asegurar las condiciones y resultados de la amplificación.

Los fragmentos de ADN amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (AGR-LE-500. AXYGEN Biosciences) al 1% en 0.5X TBE (Tris, Borato, EDTA), para la visualización de fragmentos mayores a 300 pares de bases. Para fragmentos de menor tamaño, se utilizó agarosa al 1.5–2%.Para cada muestra, se tomó 3 µL de cada producto de PCR y se mezcló con 1 µL de marcador de carga (Blue/Orange 6X, Loading Dye 1ml, Promega), el cual nos permitió la visualización del frente de corrida en el gel de agarosa. El peso molecular de cada producto de PCR fue estimado utilizando una escalera (Low DNA Mass Ladder (0.1 ng/µL), Invitrogen).

Las condiciones de electroforesis empleadas para correr cada una de las muestras variaron dependiendo del peso del producto amplificado. En el caso de la amplificación de fragmentos mayores a 200 pares de bases corridos en gel de agarosa al 1%, estas condiciones fueron: 40 minutos, 90 voltios y 400 amperios; mientras que para fragmentos de menor tamaño corridos en gel de agarosa al 1.5–2%, las condiciones fueron: 50 minutos, 95–100 voltios y 400 amperios. Se utilizó una fuente de poder Enduro Power Supplies 300V (Labnet International Inc.).

Luego de la electroforésisse procedió a teñir las muestras con el tinte SYBR Safe (DNA gel stain, Invitrogen) durante 15–20 minutos para visualizar las bandas. El gel teñido se observó mediante un transiluminador (Safe Imager, Invitrogen) y se fotografió el resultado. Se reportaron como muestras positivas las que poseían un amplificado del tamaño de banda esperado y como negativas aquellas en la que hubo ausencia de bandas.

4.3.1 ANÁLISIS DEL ADN NUCLEAR

Se analizaron 8 loci variables de las 75 muestras utilizando cebadores específicos diseñadas por Morgan *et al.*(2007); y Morehouse*et al.*(2003), las secuencias de estos cebadores se encuentran en el (Anexo 2).

Para la amplificación de los loci se utilizó el protocolo publicado por Morgan, *et al.*(2007), con algunas modificaciones. Las condiciones de la reacción de PCR consistieron en 1 µL de ADN, 1.5 µL de $MgCl_2$ 50mM (Invitrogen), 0.5 µL de cada dNTP 20mM (Invitrogen), 0.5 µL de cada primer 10mM y 0,2u/ µL de Taq polimerasa 5U/ µL (Invitrogen), en un volumen total de 25 µL de reacción. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador (Multigene Labnet) con el siguiente perfil de temperaturas: desnaturalización inicial de 94 ºC por 3 minutos; 35 ciclos de: 1 minuto a 94 ºC (desnaturalización), 30 segundos a 50 ºC (alineamiento) y 1 minuto a 72 ºC (extensión); extensión final de 72 ºC por 7 minutos y conservación a 4 ºC (Anexo 3).

En muestras en las que no se visualizó un producto de amplificaciónse procedió a realizar una nueva PCR utilizando como templado 1 µLdel producto de la PCR inicial.Todos los productos de PCR obtenidos fueron almacenados a una temperatura de 4 °C para evitar cualquier degradación del ADN.

4.3.2 ANÁLISIS DE LA REGIÓN ITS1-5.8S DE ADN RIBOSOMAL

La región ITS1-5.8S fue analizada mediante la técnica de PCR anidado, la cual permite incrementar la cantidad de ADN del locus que se desea amplificar, aumentando la sensibilidad en la detección del mismo (Goka *et al.,* 2009). Esta

amplificación consiste de dos pasos en los cuales se utilizan dos pares de cebadores para un mismo locus.

4.3.2.1 PRIMER PASO DE PCR ANIDADA

Para esta primera amplificación se siguió el protocolo publicado por Goka*, et al.*(2009), en el cual se utilizan los cebadores *Bd*18SF1 (5'-TTTGTACACA CCGCCCGTCGC-3') y *Bd*28SR1(5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3')diseñados por los mismos autores. Estos cebadores amplifican para la región del gen 18S de ARN ribosomal de *Bd*, el tamaño del producto esperado es de aproximadamente 500pb.Se modificó el protocolo de modo que se utilizó 2.5µL de Buffer de reacción 10X, 1µL de $MgCl_2$ 50mM (Invitrogen), 0.5 µL de cada dNTP 20mM (Invitrogen), 0.5 µL de cada cebador 10mM y 0.25 µL de Taq polimerasa 5 U/ µL (Invitrogen) y 1 µL de ADN en un volumen total de 25 µL de reacción. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador (Multigene Labnet) empleando el siguiente perfil de temperaturas: desnaturalización inicial de 95 ºC por 9 minutos; 30 ciclos de: 30 segundos a 94 ºC (desnaturalización), 30 segundos a 52 ºC (alineamiento) y 2 minutos a 72 ºC (extensión); extensión final de 72 ºC por 7 minutos y conservación a 4 ºC.

4.3.2.2 SEGUNDO PASO DE PCR ANIDADA

Se utilizó un segundo par de cebadores, también conocidos como cebadores anidados, que se unen al primer producto de PCR para producir un segundo producto de PCR de aproximadamente 300 pb. Este último par de cebadores utilizado fue *Bd*1a (5'- CAGTGTGCCATATGTCACG- 3')y *Bd*2a(5'- CATGGTTCATATCTGTCCAG-3'), el cual es específico para *Bd* y fue diseñado por Annis *et al.*(2004).

De la misma forma que para el protocolo del primer paso de la PCR anidada, se realizaron modificaciones para el protocolo del segundo paso, utilizando 2.5 µL de Buffer 10X, 1.5 µL de $MgCl_2$ 50mM (Invitrogen), 0.5 µL de cada dNTP 20mM (Invitrogen), 0.5 µL de cada cebador 10mM y 0.25 µL de Taq polimerasa 5U/ µL (Invitrogen) y 1 µL del producto de la primera PCR, en un volumen total de 25 µL de reacción.

Se realizaron tres repeticiones por cada muestra en las que se utilizó como ADN inicial para la amplificación: 1) 1 µL del producto de la primera PCR directamente, 2) dilución 1:10 en agua destilada estéril del mismo producto de PCR, y 3) dilución 1:100 en agua destilada de ese mismo producto de PCR. Una vez visualizados los productos por electroforesis, se escogió la muestra más apropiada de las tres para su posterior secuenciamiento. El programa de amplificación para este paso fue: desnaturalización inicial de 93 ºC por 10 minutos; 20 ciclos de: 45 segundos a 93 ºC (desnaturalización), 45 segundos a 60 ºC (alineamiento) y 1 minuto a 72 ºC (extensión); extensión final de 72 ºC por 10 minutos y conservación a 4 ºC (Anexo 4).

Los productos de PCR obtenidos fueron almacenados a una temperatura de 4 °C para evitar cualquier degradación del ADN.En muestras que resultaron negativas, se procedió a realizar una terceraPCR utilizando como templado el producto de PCR inicial a una concentración de 1:10 y de 1:100, para confirmar el resultado obtenido.

4.4 SECUENCIAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras que tuvieron un resultado positivo fueron enviadas a secuenciar a la Compañía Macrogen (Seúl, Korea) en un secuenciador automático de capilares. Se preparó previamente a las muestras añadiendo 1 µL de Exosap IT (USB Corporation) al 20% a cada producto de PCR y se incubaron a 37 ºC por 15 minutos, para degradar residuos de cebadores y nucleótidos, seguido de 80 ºC por 15 minutos, para inactivar Exosap-IT y, finalmente, 4 ºC para conservación.

4.5 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

Las secuencias obtenidas fueron alineadas y analizadas con el programa Geneious 5.4.6 (Drummond *et al.,*2010) (Biomatters Ltd. Copyright © 2005-2012), en donde se obtuvo una secuencia consenso para cada muestra. Estas secuencias consenso se compararon con las secuencias de los loci variables publicados en Morehouse *et al.*(2003) y Morgan *et al.*(2007), para los análisis de ADN nuclear (Tabla 2); y Gaertner *et al.* (2009), Goka *et al.*(2009), Federici *et al.*(2009), McCracken *et al.* (2009), Rodríguez y Hirt(2009), Tupper *et al.*(2011),

Bai*et al.* (2012), Kaiser *et al.* (2012) y Schloegel *et al.* (2012), para los análisis de la región ITS de ADN ribosomal. Estas secuencias se encuentran publicadas en DDBJ/EMBL/GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).La alineación final fue ajustada manualmente en el programa Mesquite 2.75 (Maddison y Maddison, 2011).

4.6 ANÁLISIS DE LOS LOCI VARIABLES DEL ADN NUCLEAR

Se calcularon los porcentajes de éxito de amplificación obtenido para cada locus nuclear, así como también el porcentaje de éxito obtenido en la primera reacción y en las repeticiones y se los comparó con los resultados obtenidos para la región ITS. Se compararon los alelos encontrados en las secuencias de cada locus de las muestras ecuatorianas con los publicados por Morehouse *et al.*(2003) y Morgan *et al.*(2007). Se calculó además la frecuencia de heterocigotos observada para cada locus y se la comparó con la frecuencia esperada, utilizando el programa GenAlEx V.6.41 (Peakall y Smouse, 2006).

4.7 ANÁLISIS DE LA REGIÓN ITS

4.7.1 ESTIMACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS

Se utilizó el programa TCS (Templeton, Crandall y Sing) versión 1.21 (Clement *et al.,*2000) para realizar una red de haplotipos incluyendo las secuencias ecuatorianas y las secuencias existentes a nivel mundial. Los países fueron considerados como poblaciones y para los análisis de haplotipos

ecuatorianos, las provincias fueron consideradas como poblaciones. Las secuencias incompletas fueron eliminadas para evitar falsos haplotipos debido a bases faltantes, sin embargo, se mantuvieron las secuencias incompletas compartidas entre poblaciones.

4.7.2 DISTANCIA GENÉTICA Y BÚSQUEDA DE GRUPOS ENTRE LOS HAPLOTIPOS DE LA REGIÓN ITS

Se calcularon las distancias genéticas de Nei entre las diferentes poblaciones de muestras analizadas a nivel mundial y nacional, en el programa GenAlEx V.6.41 (Peakall y Smouse, 2006). Con esta información se realizaron análisis de componentes principales (PCA) en el mismo programa para establecer las agrupaciones existentes entre las diferentes muestras.

Se buscaron estas relaciones a nivel global, entre los haplotipos encontrados en el Ecuador con los de otros países incluidos en este estudio y a nivel local, analizando los haplotipos encontrados en las diferentes provincias del país. En este último caso, los análisis se enfocaron en determinar si existe algún patrón de agrupaciones relacionado con las diferentes localidades (provincias), regiones (norte-sur del país), procedencia (silvestre-cautiverio), hospederos y modo de reproducción del hospedero .

4.7.3 DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS HAPLOTIPOS DE LA REGION ITS1.5.8S

Para determinar si existía subdivisión genética dentro y entre las poblaciones analizadas se realizó un Análisis Molecular de la Variancia (AMOVA), utilizando el programa GenAlEx V.6.41, el cual permite analizar la diversidad genética a diferentes niveles de variación, como regiones, poblaciones, individuos y locus, en forma anidada. Se puede medir la diferenciación genética entre las poblaciones en función de las frecuencias alélicas y determinar si esta diferenciación es significativa. Se realizó el cálculo del parámetro Φ_{PT}, el cual es una medida de la diferenciación genética entre poblaciones, análoga a *Fst*, proporcionada por GenAlEx para marcadores dominantes (datos binarios) y de secuencias haplotípicas. Φ_{PT} se calcula como la proporción de la varianza entre poblaciones (VAP) respecto de la varianza total (VAP + VWP), siendo VWP la varianza dentro de las poblaciones, y representa la correlación entre individuos dentro de la población respecto del total (El Mujtar, 2009). El nivel de significación de todos los estadísticos calculados se basó en 999 permutaciones.

4.7.4 FILOGENIA

Los análisis filogenéticos se realizaron en base a los criterios de máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana. Los modelos para la evolución de los caracteres para estos análisis fueron escogidos usando JModelTest 0.1.1 (Posada, 2008) utilizando el criterio de información de

Akaikecorregido (AICc) para muestras pequeñas, el modelo escogido fue Hasegawa-Kishino-Yano más sitios invariables (HKY+I).

El análisis de máxima parsimonia fue conducido en el programa Mega 4.0 (Tamura *et al.,* 2007). Se les dio a todos los caracteres el mismo peso, las inserciones y deleciones(*indels*) fueron codificadas como datos binarios (secuencia presente=1, secuencia ausente=0). Se condujo el análisis a través de una búsqueda heurística y con un bootstrap de 1000 réplicas.

El análisis de máxima verosimilitud se llevó a cabo utilizando el programaPhyML 3.0 (Guindon y Gascuel, 2003). Se realizó una búsqueda estocástica para encontrar el mejor árbol. El soporte de los nodos fue realizado mediante un bootstrap no paramétrico basado en 1000 réplicas.

El análisis de inferencia bayesiana se llevó a cabo en el programa MrBayes 3.2 (Ronquist *et al.,* 2012). Este análisis corrió por 16×10^6 generaciones, la cadena fue muestreada cada 1000 generaciones. Se utilizó el análisis de convergencia PSRF (Potenctial Scale Reduction Factor) en el mismo programa.

Para el grupo externo, se utilizaron 3 secuencias de Rhizophydiales australianos (AUS012, AUS009 y AUS003) que se determinaron más cercanamente relacionados a *Bd* que otras secuencias de Rhizophydiales (Goka *et al.,* 2009).

5. RESULTADOS

5.1 EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA METODOLOGÍA PROPUESTA

En las muestras de ADN de *Bd*procedentes de hisopos, la concentración de ADN fue muy variable.En algunas muestras la concentración de ADN fue muy baja. Además, la calidad del ADN observado bajo espectrofotometría en general no era buena, ya que los valores de absorbancia260/280 fueron menores a 1.0, indicando la presencia de contaminantes. En las muestras de ADN procedentes de las partes bucales de renacuajos, la concentración y calidad de ADN fue mayor que las de las muestras procedentes de hisopos.

5.2 AMPLIFICACIÓN DE LOCI NUCLEARES

De las 73 muestras analizadas para los ocho loci muestreados, 49 amplificaron para al menos un locus de los ocho con los que se trabajó. Esto representa un total de 67,12% de éxito alcanzado.De las ocho muestras procedentes del Parque Metropolitano, tres amplificaron para cinco loci (locus 8, 9, 10, 11 y 14) y solamente una amplificó para el locus 9 (Tabla2); mientras que para las muestras pertenecientes al estudio de Sáenz (2011), solamente una muestra, procedente de la localidad La Virgen, amplificó para el locus 12. En las demás muestras no se obtuvo ninguna amplificación, a pesar de las repeticiones realizadas.

En la Figura 2 se pueden observar los porcentajes de éxito de la de amplificación para cada locus y los obtenidos en la primera reacción y en las

repeticiones. El locus que mayor porcentaje de éxito tuvo fue el locus 12 (52,05%), seguido del locus 11 (46,58%). Los loci 8 y 9 también alcanzaron un porcentaje de amplificación mayor al 40%; los loci 10, 14 y 15, tuvieron un porcentaje sobre 30%; mientras que para el locus 13 únicamente el 13,70% de las muestras amplificaron. En general, con la metodología de repeticiones realizada, se observa un incremento en el porcentaje de amplificación de la mayoría de loci hasta en un 15% (locus 15) (Figura 2).Únicamente los loci 10 y 13 no amplificaron en las repeticiones.Las mejores secuencias se obtuvieron cuando se utilizó como templado para la reacción de PCR el ADN sin diluir.

5.3 AMPLIFICACIÓNDE LA REGIÓN ITS

En el caso de la región ITS, a pesar de haber trabajado con productos de la primera reacción de PCR y de haberse obtenido un porcentaje de amplificación de 53,70%, en las repeticiones se pudo incrementar el porcentaje de amplificación en un 23%, alcanzando un total de 76,71% de éxito(Figura 2). Los controles negativos con los que se trabajó fueron claves en el momento de interpretar los resultados puesto que hay un alto riesgo de contaminación en el proceso y bastaría muy poca cantidad de amplicón para que el resultado obtenido no sea el verdadero (falsos positivos). Para las muestras que, en una segunda instancia seguían dando un resultado negativo, se realizó una tercera repetición, utilizando el producto de PCR de la segunda repetición como templado. En este caso, todas las muestras nuevamente resultaron ser negativas.

De las ocho muestras procedentes del Parque Metropolitano, cinco amplificaron para la región ITS; mientras que para las muestras pertenecientes al

estudio de Sáenz (2011), solamente dos muestras procedentes de La Virgen amplificaron. En las demás muestras no se obtuvo ninguna amplificación, al igual que con los análisis de los loci nucleares, a pesar de las repeticiones realizadas (Figura 2).Al realizarse una electroforesis en agarosa al 1% para comprobar la calidad de ADN de las muestras que no amplificaban, se observó que estas muestras estaban degradadas, evidenciado por un barrido en el gel de agarosa (Anexo 1).

La mejor calidad de secuencia que se obtuvo para la región ITS fue cuando se utilizó como templado para la segunda reacción de PCR, diluciones 1:10 del producto de PCR de la primera reacción.Las dos muestras diagnosticadas previamente como negativas y que fueron incluidas en este estudio, se confirmaron como negativas para *Bd* bajo la técnica de PCR anidado (Tabla 1).

5.4DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Batrachochytrium dendrobatidis*

5.4.1 DIVERSIDAD DE LOCIPOLIMÓRFICOS (SNP)

La diversidad genética encontrada entre las 49muestras positivas para*Bd* dentro del país, utilizando los ocho loci polimórficos (SNP) fue baja, observándose solamente dos alelos por cada locus, que son los mismos a los publicados por Morehouse *et al.*(2003) y Morgan *et al.*(2007). La Tabla 3 muestra las frecuencias alélicas y la heterocigosidad esperada y observada para los ocho loci, por provincia. Para el loci 8 aparece una nueva deleción en una de las muestras de *Bd* analizadas; esta secuencia tuvo una buena calidad, según el cromatograma observado en el programa Geneious, donde fue ensamblada y alineada. Esta

secuencia corresponde a un especimen de *Pristimantis malkini* de la provincia del Napo (Tabla 2).

En todos los loci nucleares, excepto los loci 14 y 15, se encontraron heterocigotos (Tabla 3 y 4) (Figura 3). En la Tabla 4 se pueden observar los porcentajes de heterocigosidad para cada locus, pero destaca que en el locus 13, a pesar de no tener un alto porcentaje de amplificación, todas las muestras amplificadas fueron heterocigotas. El locus 11 tuvo un porcentaje promedio de heterocigotos mayor al 50% (Figura 3) (Tabla 4).

La frecuencia de heterocigotos calculada indica que existe un exceso de heterocigosidad en cinco de los ocho loci (locus 9, 10 11, 12 y 13) (Tabla 4).Por otro lado, las provincias del sur del país, Azuay y Morona Santiago tuvieron un 75% de loci heterocigotos, siguiéndole la provincia de Cotopaxi con 37,5%; Napo, Imbabura y Orellana con 25%; y las provincias de Pichincha, Tungurahua y Chimborazo tuvieron el menor porcentaje (12,50%) (Tabla 5).

5.4.2DIVERSIDAD DE HAPLOTIPOS ECUATORIANOS PARA LA REGIÓN ITS

En total se encontraron 11 haplotipos, los cuales difieren en deleciones y sustituciones de bases (Anexo 5). El haplotipo H1 tiene una frecuencia de 0.82 yestá compartido por al menos una muestra en cada una de las provincias incluidas en este estudio, además de las dos muestras procedentes del terrario y de localidad indeterminada(Tabla 1).Los haplotipos H2 y H4tienen una frecuencia de 0.24. De estos, el primero es compartido por las provincias de Napo y Pichincha y el H4 corresponde a dos muestras de Morona Santiago. El haplotipo

H3está presente con una frecuencia de 0.34y es compartido por las provincias de Morona Santiago, Pichincha y Azuay. El haplotipo H11 tiene una frecuencia de 0.24 y es compartido por dos muestras de la provincia de Orellana. Los seis haplotipos restantes son únicos para cada muestra,cinco pertenecen a la provincia de Orellana y uno a la provincia de Pichincha (Tabla 6). La Figura 4 muestra la red de haplotipos observados en el país.

El análisis de PCA realizado para los haplotipos ecuatorianos reveló que estos no tienen un patrón de agrupamientos relacionado con localidad, región, procedencia de la muestra, hospedero o modo de reproducción del hospedero. Sin embargo tres haplotipos (H10, H3 y H4) se separan del resto. El haplotipo H10, correspondiente a una muestra de la provincia de Orellana, se encuentra más separado de los demás haplotipos (Figura 5). El haplotipo H3, compartido por muestras procedentes de las provincias Morona Santiago, Pichincha y Azuay; y el haplotipo H4, correspondiente a muestras procedentes de Morona Santiago, también se encuentran separados el resto (Figura5).

Al enfocar el análisis en base a las regiones (norte-sur del país) y las provincias, se observa que las muestras más separadas del resto corresponden a las provincias de Morona Santiago y Orellana; y otras que corresponden a las provincias de Azuay y Tungurahua, un poco menos separadas (Figura 6 y 7).

Al tomar en cuenta la procedencia de las muestras (silvestres-cautiverio), se observó que las muestras silvestres son más dispersas, mientras que las de cautiverio se agrupan en un solo punto con otras muestras silvestres (Figura 8).Las especies hospederas de las muestras de *Bd*que se separan del resto corresponden, por un lado a *Pristimantis ockendeni* procedente del Parque Nacional Yasuní (Orellana), por otro a *Leptodactylus pentadactylus*, de la misma

localidad; y por otro, se agrupan juntos *Gastrotheca riobambae*, procedente de Cuendina (Pichincha) y *Pristimantis festae*, procedente de Papallacta (Napo) (Figura 9).

El modo de reproducción de los hospederos de *Bd* fue otro criterio que se tomó en cuenta para buscar posibles relaciones (Anexo 6). Dentro de los haplotipos de las muestras que se separan de las demás se encuentran diversos modos de reproducción de los hospederos. *Pristimantis ockendeni*coloca la puesta en medio terrestre y tienen un desarrollo directo; por otro lado, *Leptodactylus pentadactylus* coloca la puesta en medio terrestre, en un nido de espuma, cerca de charcas temporales donde se desarrollarán las larvas. *Gastrotheca riobambae*lleva la puesta en su marsupio y las larvas se desarrollan en medio acuático (charcas) y *Pristimantis festae* también tiene desarrollo directo. Sin embargo, no se observa un patrón de diferenciación entre los haplotipos de *Bd* encontrados y el modo de reproducción del hospedero(Figura 10).

El Análisis Molecular de la Variancia (AMOVA), realizado para evaluar diferenciación genética entre y dentro de las poblaciones del Ecuador reveló que no existen diferencias significativas entre las poblaciones analizadas (Tabla 7).En el primer análisis realizado para evaluar diferencias entre dos regiones (norte-sur) del país, el resultado indica que la mayor parte de la varianza(97%) se encuentra dentro de estas regiones, mientras que el 3% se da entre las mismas; por lo tanto no existen diferencias significativas entre estas dos regiones del país (Φ_{PT} 0.032 P ≥ 0.051). A nivel de provincias se obtuvo un poco más de variación entre las poblaciones, obteniendo el 91% de variación dentro de las provincias y el 9% de variación entre las mismas, sin embargo tampoco existe una diferenciación significativa (Φ_{PT} 0.089 P ≥ 0.077) (Tabla 7).El análisis llevado a cabo para

encontrar posibles diferencias genéticas entre las muestras según su procedencia (silvestres-cautiverio), hospederos y modo de reproducción tampoco reveló diferencias significativas ya que el 100% de variación se encontró dentro de las poblaciones (Tabla 7).

5.4.3 DIVERSIDAD DE HAPLOTIPOS INTERNACIONALES PARA LA REGIÓN ITS

El análisis de haplotipos de muestras mundiales evidenciaron99 haplotipos en las 262 secuencias incluidas en el análisis (Figura 11, Tabla 8).El análisis de PCA para los haplotipos encontrados en los diferentes países, no reveló ningún patrón de agrupación de estos haplotipos según los diferentes países. Al contrario, se evidenció una dispersión de los diferentes haplotipos de los países con mayor diversidad de haplotipos (Figura 12). El haplotipo con mayor frecuencia fue el H1con 111/262 (0.42) y se encuentra en todos los países analizados (Tabla 9). En el caso de Italia, todas las muestras procedentes de este país corresponden a este haplotipo. Los haplotipos compartidos entre Ecuador y otros países son: H1 (compartido con todos los países), H2(con Estados Unidos), H6 (con China y Japón), H8 (con China) y H11 (con Bélice, China y Sudáfrica). Los haplotipos H3, H4, H5, H7, H9, y H10 son únicos para Ecuador (Figura 11).

En Brasil se encontraron 11 haplotipos, tres de los cuales son compartidos por otros países: H1 (compartido con Ecuador), H51 y H68. Japón por su lado presentó 26 haplotipos, que son los mismos publicados por Goka *et al.* (2009). Se encontró que solamente dos de estos comparte con Ecuador (H1 y H6) y cinco con otros países. China presentó 30 haplotipos, de los cuales cuatro (H1, H6, H8

y H11) son compartidos con Ecuador, otroscuatro con otros países y los demás son únicos.En Bélice se encontaron siete haplotipos: dos compartidos con Ecuador (H1 y H11), cinco con otros países y solamente un haplotipo es único. Sudáfrica presentó once haplotipos; de los cuales H1 y H11 comparte con Ecuador, otros tres con otros países y los demás no están compartidos. Estados Unidos fue el país en donde se encontraron más haplotipos (32 en total). Sin embargo se debe tomar en cuenta que 17 haplotipos provienen de una misma cepa (UM142) aislada de *Lithobates catesbeianus* de una tienda de mascotas de Florida (Schloegel *et al*., 2012). Estos haplotipos no están compartidos por ningún otro país. Los haplotipos H1, H12 y H17 son compartidos por otros países (Figura11, Tabla 9).

El AMOVA realizado reveló que no existen diferencias significativas entre las muestras del Ecuador y todas las poblaciones delos países incluidos en este estudio(Φ_{PT} 0.199 P ≥ 0.002) (Tabla 10).La variación entre las poblaciones fue del 20%, mientras que la mayor variación se da dentro de las poblaciones (80%).Sin embargo, se observa que la variación entre países es considerablemente mayor a la encontrada entre las poblaciones ecuatorianas (Tablas 8 y 10).En relación a las distancias genéticas, Brasil tiene la mayor distancia genética de Nei con Ecuador (0.035), siguiéndole Japón (0.013), Sudáfrica (0.012) y Estados Unidos (0.009). Por el contrario, no existe distancia genética con Italia (0.000) (Tabla 11).

5.5 FILOGENIA

Se analizaron en total 262 muestras de una longitud de 259 pares de bases de la región ITS-5.8S de ADNr de *Batrachochytrium dendrobatidis* (Tablas 1 y 8).

De acuerdo con el programa JModel Test se escogió el modeloHKY+I, utilizando el criterio de información de Akaike (AICc) para muestras pequeñas.

El árbol resultante del análisis de máxima verosimilitud (Figura 13) contiene un clado con alto valor de soporte bayesiano (0.95) con tres individuos de Japón de procedente de la salamandra gigante *Andrias japonicus* y uno de China procedente de *Babina pleuraden*; este clado también tiene un buen soporte de máxima parsimonia. Se diferencia también un clado más grande, con un alto soporte bayesiano (0.97) y de máxima parsimonia, que a su vez se subdivide en otros clados.

En el inicio de este clado se agrupan dos muestras, la una procedente de Japón y la otra de Bélice. Dentro de este clado también se diferencia un sub-clado grande que incluye una politomía extensa, en donde se encuentran todas las muestras de Italia, algunas de Estados Unidos, Sudáfrica, China, una sola de Brasil, y la mayoría de muestras ecuatorianas. Las únicas muestras analizadas provenientes de Perú también caen dentro de este clado, así como la muestra proveniente de la cepa JEL423 de Panamá (utilizada como control positivo) (Figura 13). En este sub-clado también se diferencia otro más pequeño con bootstrap de máxima verosimilitud y parsimónico de 65, en el que se incluye una muestra procedente del Parque Nacional Yasuní de *Leptodactylus pentadactylus*, una de China y una de Estados Unidos.

A partir de este clado diverge otro sub-clado grande con un soporte moderado bayesiano (0.96) y de bootstrap de máxima veromilitud y de máxima parsimonia (62). Dentro de este sub-clado se encuentran la mayoría de muestras de Japón, China, Basil, Sudáfrica, Bélice y Estados Unidos. En este sub-clado también se encuentran muestras ecuatorianas, la mayoría procedentes del

Parque Nacional Yasuní, que se agrupan con muestras de otros países (Figura 13). Muestras procedentes de Cuendina, de *Gastrotheca riobambae*, y de Papallacta, de *Pristimantis festae*, se agrupan con muestras de Estados Unidos, formando un clado monofilético con un bootstrap de máxima verosimilitud de 65. En otro clado se agrupan únicamente muestras ecuatorianas procedentes de Cuendina, Cotopaxi y de varias localidades de Azuay. Este clado monofilético tiene un alto soporte de máxima veromilitud y máxima parsimonia (65). Las demás muestras ecuatorianas se agrupan en otros clados sin soporte.

6. DISCUSIÓN

6.1 EFICIENCIA DE LA METODOLOGÍA IMPLEMENTADA PARA LA AMPLIFICACION DEL ADN DE *Batrachochytrium dendrobatidis*

Para poder realizar estudios de diversidad genética de *Bd* es indispensable primeramente poder detectar la presencia del hongo. Las muestras de hisopos utilizadas en este estudio correspondieron justamente a ensayos previos,en los que se pretendía determinar la presencia de *Bd* en los individuos muestreados. Se quiso utilizar este valioso recurso (ADN de *Bd*) almacenado en el Museo de Vertebrados de la Escuela de Ciencias Biológicas de la PUCE,para el análisis de diversidad genética de las poblaciones detectadas en el Ecuador. En general, estudios relacionados a genética de poblaciones de *Bd* se basan en muestras del hongo que han sido cultivadas en medios artificiales, cuyas metodologías son difíciles de implementar, toman mucho tiempo de crecimiento, y reducen el número de muestras que se pueden manejar con mayor facilidad (Berger *et al.,* 1999; Longcore*et al.,* 2003;Morgan*et al.,* 2007). No era posible realizar cultivos puros de las muestras de ADN en los hisopos, pero se quiso aprovechar del recurso de ADN extraído disponible.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el mayor porcentaje de éxito de amplificación del ADN se obtuvo con la región ITS comparada con los loci nucleares. Esto se puede debera que la región ITS se encuentra repetida muchas veces en el genoma de los individuos, elevando la probabilidad de lograr una amplificación exitosa, aun de muestras degradadas. Para los loci nucleares, esta situación no aplica. Además, para el análisis de laregión ITS se utilizó la

técnica de PCR anidada, la cual incrementa la cantidad de ADN del locus que se desea amplificar, aumentando la sensibilidad en la detección del mismo (Goka *et al.,* 2009). La PCR anidada es capaz de detectar una región de ADN objetivo con alta especificidad y sensibilidad a pesar de que haya contaminación y ejemplares degradados (Ma *et al.,* 2003). En el caso de las muestras procedentes de hisopos, esto resulta muy conveniente debido a que la extracción de ADN no es específica a *Bd*y la muestra final puede contener contaminantes de ADN de otros organismos. Con la primera amplificación dentro de la PCR anidada se incrementa la cantidad de ADN objetivo mejorando así la sensibilidad de detección. Estudios realizados por Annis *et al.* (2004) y Goka *et al.* (2009), reportaron que la PCR anidada también es diez veces más sensible que la PCR en tiempo real. Sin embargo, ésta también incrementa el riesgo de contaminación y obtención falsos positivos, por lo que es necesario tener cuidado al momento de manipular las muestras y los reactivos, así como trabajar con controles negativos.

La causa de que no se haya logrado amplificar un número mayor demuestras para los loci nucleares podría estar explicada por la calidad y concentración de ADN presente en la muestra. Las muestras analizadas que se encontraban almacenadas en el laboratorio de biología molecular, provenían de pruebas previas realizadas para diagnóstico de *Bd*. Estas muestras fueron extraídas entre los años 2007 y 2009 (Tabla 1) y fueron manipuladas bajo condiciones desconocidas, por lo quees probable que el ADN se encontrara degradado. Esto se confirmó al observar los geles de prueba realizados para confirmar las condiciones de las muestras de ADN almacenadas, en los que se observaron bandas degradadas (Anexo 1).

Por otro lado, la concentración de ADN medida en las muestras provenientes de hisopos no solamente contenía ADN del hongo, sino también de otros organismos presentes en el momento de la toma de la muestra (contaminación). En algunos casos, muestras que contenían una concentración baja de ADN sí amplificaban, mientras que otras que tenían una concentración de ADN mayor no lo hacían. Esto pudo deberse a que en la muestra de ADN con mayor concentración, el ADN correspondiente a *Bd* era mínima. Tomando en cuenta que para el análisis de los loci no se realizó una PCR anidada, sino únicamente una PCR de punto final, partíamos de la concentración inicial de ADN de la muestra. Con las repeticiones realizadas para los loci nucleares utilizando el producto de PCR de la primera reacción, se consiguió aumentar la cantidad de muestras amplificadas (positivas) (Figura 2). En las muestras que resultaron negativas en la primera PCR y positivas en la segunda, lo más probable es que la concentración del ADN presente en la primera amplificación fue muy baja para poder ser visualizada en el gel de agarosa. Por esta razón, al realizar una segunda PCR utilizando como templado el producto de PCR anterior se aumenta la cantidad de ADN inicial, y así se logra queel segundo producto de PCR pueda ser visualizado. En las muestras que no hubo ninguna amplificación en las repeticiones realizadas, se puede asegurar que el resultado era negativo, es decir, no había amplificación para ese locus.

Los resultados obtenidos indican que la metodología utilizada resultó exitosa ya que se logró aumentar la cantidad de muestras positivas hasta en un 15%, en el caso de loci nucleares, y en un 23% para la región ITS (Figura 2).Los resultados también advierten que es posible utilizar muestras de *Bd* procedentes de hisopos directamente, sin necesidad de obtener cultivos puros. Esto permitiría

ahorrar tiempo, esfuerzo y dinero para llevar a cabo análisis a partir de muestras de hisopos o de campo. A pesar de que los cultivos puros permiten tener mayor concentración y pureza del ADN del hongo, estos tienen la desventaja de requerir de mucho tiempo para que el cultivo crezca lo suficiente como para llevar a cabo los análisis (en el caso de *Bd* este tiempo puede ser hasta de tres meses) (Longcore *et al.,* 2003); por otro lado, se requiere de muchos cuidados para evitar la contaminación, por lo que resultan más costosos y complicados de desarrollar si no se dispone del instrumental necesario, además de que la producción a gran escala no puede hacerse si no se dispone del equipamiento adecuado (Roger *et al.,* 1992).

No se puede concluir si los análisis a partir de muestras de hisopos son más efectivos al amplificar la región ITS de *Bd*, que al amplificar las regiones de los loci variables, puesto que no se puede hacer una comparación dado que no se utilizaron las mismas metodologías. Si se implementara la metodología de PCR anidado para los análisis de ADN nuclear, es posible que se obtengan mayores resultados positivos.

En el caso de muestras que amplificaron para determinados loci pero no para otros, es posible que la secuencia de ADN en la región de los loci que no amplificaron estaba degradada. Otra explicación es que la región de los cebadores era muy variable en el sitio de ensamblaje y por esto no se pudieron unir al templado, ya que éste no era complementario. En los casos en que no hubo amplificación para ningún loci o región ITS, está la posibilidad de que las muestras hayan sido consideradas falsos positivos en estudios previos y realmente no tengan la presencia de *Bd*. Tomando en cuenta que el diagnóstico previo realizado a las muestras se basó en la metodología de Annis *et al.* (2004),

en la cual no se utiliza la técnica de PCR anidada, y ésta última es mucho más sensible, se podría sugerir que los primeros resultados eran falsos positivos. Esta sería una explicación viable especialmente para muestras más recientes que no fueron manipuladas excesivamente y que el ADN no estuvo degradado. Como soporte de esta hipótesis está el hecho de que a las muestras que continuaban dando un resultado negativo, se les realizó una tercera repetición, utilizando el producto de PCR de la segunda repetición como templado, y todas las muestras nuevamente resultaron ser negativas. Sin embargo, también existe la posibilidad de que el ADN del cual se partió haya estado muy degradado y debido a esto no se haya producido amplificación.

Para muestras de ADN procedentes de la extracción a partir de discos orales de renacuajos, es más probable que las muestras que resultaron negativas realmente lo eran.La cantidad de ADN de hongo presente en éstas muestras podría ser mayor a la encontrada en muestras de hisopos. Hyatt*et al.*(2007) encontraron que cuando la concentración de zoosporas presente en una muestra era menor a 400, en este nivel de infección las muestras de hisopos daban un resultado negativo, pero muestras procedentes de los discos orales de renacuajos salían positivas.

6.2 DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS LOCI NUCLEARES

La diversidad genética puede ser expresada como “diversidad alélica” (número de alelos por locus), “diversidad genotípica” (número de genotipos únicos por muestra) o como “diversidad génica” (heterocigosidad esperada bajo equilibrio

Hardy Weinberg o He). La diferencia entre la diversidad genotípica y diversidad génica está relacionada con el modo de reproducción; por ejemplo, una reproducción clonal conduce a una proliferación de cepas con un mismo genotipo (James *et al.,* 2009). La diversidad alélica encontrada entre las 49 muestras positivas para *Bd* dentro del país, utilizando los ocho loci polimórficos (SNP) fue baja, observándose solamente dos alelos por cada locus, que son los mismos a los publicados por Morehouse *et al.* (2003) y Morgan *et al.*(2007). Los resultados encontrados en el presente estudio estarían confirmando la baja diversidad existente en los loci analizados, tal y como lo han reportado estudios anteriores (Morehouse *et al.,* 2003; Morgan *et al.,* 2007; James *et al.,* 2009).Sin embargo, en un reciente estudio realizado por Schloegel *et al.*(2012), los autores encontraron 36 loci variables reportando de uno a dos alelos nuevos en 21 de estos 36 loci en nuevos genotipos de Brasil. La nueva deleción encontrada para el locus 8 en una de las muestras de *Bd* analizadas en este estudio(Tabla 2), podría indicar la presencia de un nuevo polimorfismo de nucleótido simple para este locus.Debido a que la secuenciatuvo una excelente calidad, según el programa Geneious, es probable que esta deleción no se deba a un error de secuenciamiento. Esta muestra es procedente de un especimen de *Pristimantis malkini* de la provincia del Napo, por lo que se deberíarealizar un mayor muestreo para este locus, en esta localidad y otras, de modo que se pueda comprobar la existencia de esta deleción en otras muestrasde *Bd*.Adicionalmente, los datos del presente estudio confirman que *Bd* es un organismo diploide (Morehouse *et al.,* 2003; Morgan *et al.,* 2007).

La evidencia de un exceso de heterocigocidad en cuatro de los ocho loci muestreadostambién indica que las muestras ecuatorianas analizadas son de

origen diploide y reproducción mitótica, debido a que la reproducción sexual promovería la homocigosidad (Morgan *et al.*, 2009).Tanto las frecuencias alélicas, como las genotípicas se relacionan con el principio de Hardy-Weinberg, el cual establece que una población panmíctica, en ausencia de ciertas condiciones como mutación, selección, deriva génica y migración, estas frecuencias alélicas y genotípicas permanecen constantes a través de las generaciones, siguiendo las leyes de Mendel (Futuyma, 2005). Las causas potenciales de cambios en las frecuencias alélicas en un locus determinado, son los factores antes mencionados, que causan desviación al equilibrio de Hardy-Weinberg. Por lo tanto, las diferencias entre los heterocigotos observados y los heterocigotos esperados pueden deberse a muchas causa, una de estas puede ser la endogamia, que lleva a un mayor número de homocigotos que los esperados bajo equilibrio Hardy-Weinberg (Futuyma, 2005). Cuando existe un exceso de heterocigotos, por el contrario, no existe endogamia y las frecuencias de los alelos homocigotos bajan. El apareamiento, en este caso, no sería al azar, ya que los organismos se estarían reproduciendo por clonación.

Un exceso de heterocigotos para *Bd*ha sido reportado en otros estudios (Morehouse *et al.,* 2003; Morgan *et al.,* 2007; James *et al*., 2009), e indica, como se mencionó antes, que la reproducción del hongo está siendo clonal más que sexual. Sin embargo, Fisher *et al.*(2009) han sugerido que el hongo podría ser capaz de tener reproducción sexual, aunque a una tasa menor comparada con la reproducción clonal. Esto podría interpretarse también porque las diferentes poblaciones podrían estar sufriendopérdida de heterocigosidad a diferentes niveles, dando la falsa impresión de que esté ocurriendo reproducción sexual (Whittaker y Vredenburg, 2011).No se ha encontrado un estadío sexual del hongo

que pueda respaldar la hipótesis de que exista reproducción sexual (Longcore *et al.,* 1999; Berger *et al.,* 2005).Aunque no se descarta la posibilidad de que este estadío pudiera existire inclusive podría ser una explicación para la dispersión del hongo, ya que en otras especies de quítridos la reproducción sexual da lugar a un esporangio resistente (Sparrow, 1960; Miller y Dylewski, 1981).

Una posible explicación para el exceso de heterocigosidad es que la variación entre las cepas se dé por recombinación mitótica, de la misma manera como se ha sugerido para *Candida albicans* (Cowen *et al.,* 2002). Esta recombinación mitótica es producida por el sobrecruzamiento somático, y en los hongos es el mecanismo parasexual por excelencia. Las posibilidades de un ciclo parasexual que involucre la fusión de células diploides en *Bd* es una interesante posibilidad, pero ésta aún no ha sido explorada. Otro fenómeno producido por la recombinación mitótica es el mosaicismo, el cual da lugar a nuevos fenotipos celulares (Lacadena, 1996). En algunos estudios de genética de poblaciones, se encontró que la localización a lo largo del cromosoma (por ejemplo la distancia del centrómero) ha sido correlacionada con la cantidad de pérdida de heterocigosidad por recombinación genética en *C. albicans* (Jones*et al*., 2004). Este mismo procedimiento podría estarse dando en *Bd* (James y Vilgalys, 2006).

El reciente secuenciamientodel genoma total de dos cepas de *Bd* (JEL423 y JEL081), por el Broad Institute y el Joint Genome Institute, permite que estos marcadores de loci se ubiquen bajo un contexto genómico. Lo que se ha observado es que todos los marcadores agrupados en *supecontigs* pequeños, excepto el locus 15 (r6046) presentan un exceso de heterocigosidad, mientras que 7 de los 9 marcadores de loci en los *supercontigs* más grandes contienen más genotipos homocigotos y ninguno muestra un exceso de heterocigotos.

Estos datos sugieren que la heterocigosidad no es uniforme a lo largo del genoma de *Bd* y está reducida en el cromosoma más grande. Este patrón no es consistente con una reproducción sexual y una provisión independiente de cromosomas (Tibayrenc *et al.,* 1990), pero sí puede estar explicado por una variación específica de cromosomas en la recombinación mitótica o aneuploidía, causando una pérdida de heterocigosidad (LOH, por sus siglas en inglés) dentro de individuos diploides (James *et al.,* 2009).

A pesar de que la recombinación mitótica puede eliminar la variación reduciendo la heterocigosidad en ciertos loci, también tiene la capacidad de generar diversidad genotípica, la misma que podría facilitar la adaptación al exponer alelos recesivos benéficos y aumentando la tasa de fijación de mutaciones benéficas (Mandegar *et al.,* 2007; Schoustra *et al.,*2007; Bougnoux *et al.,* 2008). La LOH en patógenos diploides ha sido implicada en la atenuación de la adquisición de virulencia y la adquisición de resistencias a drogas (Chen *et al.,* 2004; Selmecki *et al.,*2006;Wu *et al.,* 2007). Se han encontrado evidencias específicas para un rol de LOH en la generación de diferencias genotípicas entre cepas de *Bd* en varias agrupaciones geográficas de cepas (James *et al.,* 2009).

Se debe tomar en cuenta que existieron muchos datos faltantes en los muestreos por lo que no se puede concluir con certeza que estos resultados realmente sean representativos de la población total; para esto se deben realizar más muestreos que confirmen este resultado y evaluar su significancia. En estudios anteriores realizados, en donde se incluyeron muestras provenientes de cepas de diferentes partes del mundo, las regiones en donde se encontraron los niveles más bajos de diversidad alélica fueron Africa, América tropical, y Australia, en donde el segundo alelo para los loci 2 (9893X2) y 15 (r6046) no

fueron detectados (James *et al.,* 2009). En las muestras de Ecuador tampoco se registra el segundo alelo para el locus 15.

Los datos reportados en varios estudios de genética de poblaciones de *Bd* indican que puede existir un reciente cuello de botella, relacionado con una cepa ancestral diploide (Morehouse *et al.,* 2003; Morgan *et al.,* 2007; James *et al.,* 2009). Tanto la extremada baja variación, como la amplia dispersión de genotipos cercanamente relacionados proveen un fuerte soporte para la hipótesis del patógeno nuevo. Sin embargo, no se ha encontrado en ninguna de las regiones muestreadas en estos estudios una evidencia de una posible población originaria (James *et al.,* 2009). En Brasil se han encontrado fuertes evidencias de que la variación alélica y genética es mayor a la reportada en otros países (Schloegel *et al.,* 2012). En Ecuador hace falta realizar mayores muestreos debido a que en el presente estudio hubieron varios datos faltantes que impidieron realizar un análisis de genética de poblaciones completo, mediante el uso de estos marcadores moleculares.

6.3 DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA REGIÓN ITS

El mayor muestreo obtenido para la región ITS permitió que para esta región sí se puedan llevar a cabo los análisis de diversidad genética, de haplotipos y filogenéticos. En Ecuador se reportan once haplotipos, de los cuales seis se encuentran restringidos al Parque Nacional Yasuní en la provincia de Orellana y fueron reportados por McCracken *et al.* (2009). Otras provincias en donde se encontraron haplotiposúnicos fueron Napo, Pichincha, Morona Santiago y Azuay (Figura 4).

En este estudio se incluyeron secuencias de muestras pertenecientes a otro estudio realizado por Sáenz en el 2011, en el cual se reportaron un total de ocho haplotipos en cinco localidades (incluida el Parque Nacional Yasuní publicadas por McCraken*et al.,*2009). Sin embargo, Sáenz reporta solamente cuatro haplotipos en Yasuní, mientras que en este estudio, así como en la publicación de McCcraken se reportan siete haplotipos. En las otras localidades muestreadas también existen variaciones entre los haplotipos encontrados en el estudio anterior y el presente estudio. Esto puede deberse a errores en el secuenciamiento que lleven a diferencias en el alineamiento de las secuencias. Por ejemplo, si en una región de la secuencia se obtienen múltiples bases iguales seguidas y una muestra es la única que presenta una base adicional al resto de secuencias comparadas, lo más probable es que esto se deba a un error en el secuenciamiento que colocó una base adicional y no a una inserción en este sitio. Por esta razón se debe tener mucho cuidado en el momento de alinear las secuencias.

El hecho de que en la provincia de Orellana existan más haplotipos que en el resto de provincias juntas podría deberse a dos posibilidades: la primera, que las muestras analizadas no sean una muestra representativa de *Bd* en el resto de provincias y en verdad existan todavía más haplotipos por ser descubiertos; y la segunda, que realmente en esta provincia exista una mayor diversidad de haplotipos que en otras provincias. Tomando en cuenta que las poblaciones de tierras bajas y húmedas no se han visto afectadas por la quitridiomicosis (La Marca y Lötters, 1997; Bustamante *et al.,* 2005; Ron, 2005; James *et al.,* 2009) se podría sugerir que existen haplotipos distintos, los cuales podrían pertenecer a cepas endémicas de *Bd* en esta región, y que no han habido cambios que afecten

la dinámica patógeno-hospedero que hagan que estas especies desarrollen la enfermedad y se de una epidemia llevando a la extición. Lo contrario sucede en el caso de las poblaciones de anfibios de mayores alturas y climas fríos, en donde el cambio climático e incremento de la temperatura ha dado lugar a que las poblaciones de anfibios también sean más vulnerables(La Marca y Lötters*,* 1997; Berger *et al.,* 1999; Daszak *et al.,* 2000; Bustamante *et al.,* 2005; James *et al.,* 2009).

El haplotipo H1, proviene de una cepa hipervirulenta que, al ser recientemente introducida en las poblaciones de anfibios locales, está causando fuertes estragos en las mismas (Farrer *et al.,* 2011; Schloegel *et al.,* 2012). Este haplotipo también ha sido reportado en la provincia de Orellana, sin embargo las especies que lo albergan y no desarrollan la enfermedad pueden estar actuando como vectores del patógeno. El haplotipo H1 también es el más frecuente a nivel mundial, compartido por muestras de todos los países analizados incluido la cepa JEL423 que ha sido secuenciada en su totalidad. Se podría sugerir que este haplotipo es parte del recientemente nominado linaje panzoótico global (GPL, por sus siglas en inglés) (Farrer *et al.,* 2011). Según el estudio de Farrer *et al.*(2011) en el que se secuenció y comparó el genoma total de *Bd*, este linaje corresponde a las cepas hipervirulentas del hongo, ha emergido en al menos cinco continentes durante el siglo XX y está asociado con el inicio de la epizoótia en varios países en Norteamérica, Centroamérica, el Caribe, Australia y Europa. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que este linaje ha sido definido en base al secuenciamiento total del genoma de *Bd*, por lo que, si bien en base a la región ITS de ADN ribosomal este haplotipo estaría siendo parte de esta cepa virulenta, se deberían combinar con análisis de otros sitios del genoma para poder concluir que esto es

así.

El análisis de haplotipos de muestras mundiales evidenció 98 haplotipos en las 262 muestras incluidas (Figura 11). En Ecuador, cinco de los once haplotipos son compartidos por otros países, lo que puede sugerir que hubieron varios eventos de introducción del hongo al país. Los seis haplotipos restantes que solamente han sido reportados para Ecuador estarían aportando a la hipótesis de la posible existencia de haplotipos endémicos para el país. En Brasil se han descubierto varios haplotipos únicos para ese país; lo más interesante es que se encontraron varios haplotipos para una misma cepa (más de una docena) de *Bd*, por lo que se sugiere que en Brasil podrían existir cepas endémicas de *Bd*(Schloegel *et al.,* 2012). En base a esto, los autores sugieren que el uso de la región ITS para estudios filogeográficos debe hacerse con cuidado, ya que en la mayoría de organismos la región ITS de ADN ribosomal es típicamente homogénea dentro de los individuos debido a la evolución concertada(Ganley y Kobayashi, 2007). La evolución concertada es el mantenimiento de una secuencia nucleotídica homogénea entre miembros de una familia de genes, la cual evoluciona con el tiempo (Futuyma, 2005). Esto ocurre cuando una secuencia de un locus es transferida unidireccionalmente a otros miembros de familia de genes, de modo que la mayoría o todos adquieran escencialmente la misma secuencia. El resultado de este proceso es la producción del mismo producto para múltiples loci, el cual puede ser adaptativo si se necesitan grandes cantidades del producto. El RNA ribosomal, es un ejemplo de esto y está producido por una larga familia de genes (Futuyma, 2005).

Goka*et al.*(2009) reportaron solo un haplotipo para la región ITS por muestra de *Bd* analizada (26 haplotipos en total), con niveles de diversidad

genética elevados para Japón, en relación con muestras de otros países incluidos en el análisis. Sin embargo, este muestreo externo es considerablemente bajo (Schloegel *et al.,* 2012), por lo que esta variabilidad genética elevada para Japón, en relación con los otros países, podría estar sesgada a este poco muestreo realizado en estos países.En el presente estudio se identificaron los mismos haplotipos de Japón y también se observó que de estos, solamente dos están presentes en Ecuador (Figura 5).

China también presentó un alto número de haplotipos únicos para el país (en total 22 haplotipos), lo cual estaría apoyando a la alta diversidad de haplotipos asiáticos (Bai *et al.,* 2010). Sin embargo, se debe tomar en cuenta que varios de estos haplotipos pertenecían a muestras tomadas del mercado de *Lythobates catesbeianus*. Los estudios enfocados en esta rana toro norteamericana han descubierto que, no solamente esta especie está ampliamente distribuida, sino que también está infectada con una larga diversidad de genotipos de *Bd,*y su invasión puede haber contribuido y facilitado el flujo génico intercontinental del hongo (Goka *et al.,* 2009; Bai *et al.,* 2010; Schloegel *et al.,* 2012). En Ecuador los criaderos de esta especie de rana datan de los años 1980 (Villacís y Zurita, 2002), que coincide con el tiempo en el que se descubre por primera vez el quítrido en el país en el año 1980 (Ron y Merino, 2000). Esto, a su vez, demuestra que *Bd* estuvo presente cuando el problema de declinaciones de anfibios en el Ecuador era evidente, a finales de la década de los 80 (Coloma, 1995; Stebbings y Cohen, 1995; Coloma, 1996; Coloma, 2000; Ron y Merino, 2000).

En otro estudio realizado recientemente en Bélice, se encontróocho nuevos haplotipos, de los cuales tres son compartidos con otros países (Kaiser *et al.,* 2012). En la presente investigación se compararon estos haplotipos con los de

otros países, además de los analizados en el estudio de Bélice, y se encontró que solamente uno de estos haplotipos no comparte con otros países. De estos, solamente dos comparte con Ecuador (H1 y H11). Sudáfrica presentó seis haplotipos que no están compartidos, los cuales también provienen de una misma cepa (CW34) (Schloegel *et al.,* 2012). Estados Unidos fue el país en donde se encontraron más haplotipos (32 en total). Sin embargo, se debe tomar en cuenta que 17 haplotipos previenen de una misma cepa (UM142) aislada de *Lithobates catesbeianus* de una tienda de mascotas de Florida, la cual ha sido reportada como un genotipo brasilero (Schloegel *et al.,* 2012), de ser así, únicamente 12 haplotipos de Estados Unidos serían únicos para este país y los tres restantes estarían compartidos con otros países.

El Análisis Molecular de la Variancia (AMOVA), realizado para evaluar diferenciación genética entre y dentro de las poblaciones del Ecuador basado en la región ITS,reveló que no existen diferencias significativas entre las poblaciones analizadas, tanto a nivel nacional, como a nivel mundial. A nivel nacional, no existen diferencias significativas entre las regiones norte y sur del país (Φ_{PT} 0.032 P ≥ 0.051); a nivel de provincias, a pesar de que la varianza fue un poco mayor entre estas que la encontrada entre regiones, ésta variación tampoco fue significativa (Φ_{PT} 0.089 P ≥ 0.077).

A nivel global, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los diferentes países incluidos en el estudio. A pesar de que en Ecuador se diferencian once haplotipos, de los cuales seis son únicos, la variación entre los países fue del 20%, mientras que la mayor variación se da dentro de los países (80%). No existen diferencias significativas entre los haplotipos de *Bd* analizados (Φ_{PT} 0.199 P ≥ 0.002).Sin embargo, se observa que la variación entre los países

es considerablemente mayor a la encontrada entre las poblaciones ecuatorianas. En los estudios de Kaiser (2012), en Bélice; Goka (2009), en Japón; Bai (2012), en China y Schloegel (2012), en Brasil, se reportan nuevos haplotipos para cada país, sugiriendo que existe una alta diversidad genética, e inclusive especificidad de nicho entre los haplotipos (Kaiser *et al.,* 2012); por lo que se puede observar claramente que la diversidad genética encontrada para *Bd* está relacionada con los muestreos que se realicen para cada país. Es decir, tal y como lo consideraron la mayoría de investigadores, esta estaría sesgada al muestreo realizado. Por esta razón es importante realizar un plan de muestreo local y global, de modo que se pueda conocer con exactitud la variabilidad genética de *Bd*. En China, Bai y sus colaboradores concluyen que podría existir un linaje de *Bd* endémico, asociado a los hospederos locales. Esto podría estar ocurriendo también en Ecuador, por lo que los haplotipos encontrados, que no se encuentran en otra localidad, podrían ser endémicos del país. Para confirmar esta hipótesis se debe realizar un mayor muestreo en las localidades en donde se encontraron estos haplotipos, con secuenciamiento multilocus, más la región ITS, para poder encontrar las diferenecias existentes.

En relación a las distancias genéticas, Brasil tiene la mayor distancia genética de Nei con Ecuador (0.035), siguiéndole Japón (0.013), Sudáfrica (0.012) y Estados Unidos (0.009) (Tabla 11). Por el contrario, con Italia no hay distancia genética ya que para este país son idénticos y comparten con la mayoría de haplotipos de Ecuador. Este resultado nos permite inferir que el linaje de *Bd*, con este haplotipo, pudo haber tenido varios eventos de introducción en varios países; o, a su vez, que está existiendo flujo génico entre estos.

El análisis de coordenadas principales PCA por sus siglas en inglés

(Principal Coordinate Analysis) es una técnica multivariada que permite encontrar y trazar los patrones dominantes en un conjunto de datos multivariados, como por ejemplo múltiples loci y múltiples muestras (Peakall y Smouse 2006). Los análisis de componentes principales (PCA) realizados, mostraron que no existe un patrón de agrupación entre los haplotipos ecuatorianos encontrados, relacionado con localidad, región, procedencia de la muestra, hospedero o modo de reproducción del hospedero.

Losresultados obtenidos demuestran que la mayoría las muestras analizadas no tienen una estructura poblacional relacionada con hospederos, tal como se ha visto en otro estudios en donde no existe un patrón de especificidad patógeno-hospedero (Johnson y Speare 2003; Lips *et al.,* 2008).Tampoco se encuentran patrones en cuanto a localidades (provincias). Sin embargo, tres haplotipos se separan del resto. Estos haplotipos se encuentran en las provincias de Orellana, Morona Santiago, Pichincha y Azuay.

Los haplotipos de muestras procedentes de cautiverio son, en su mayoría, el haplotipo H1, que es el de mayor frecuencia en el país. No se puede conocer si estas muestras se contagiaron en los terrarios en los que se los mantenía en la Balsa de los Sapos, o si llegaron ya infectados,ya que no existía entonces un protocolo de diagnóstico para *Bd* antes de que los animales sean ingresados a los terrarios. Por esta razón, no se puede concluir si este haplotipo estaría presente en las localidades de donde proceden estas muestras, o es un haplotipo presente en los terrarios de la Balsa. La mayoría de las muestras analizadas que procedían de cautiverio provenían de la provincia de Azuay. En esta provincia la mayoría de las muestras también tenían el haplotipo H1, por lo que se puede inferir que pudieron haberse contagiado en los terrarios de la Balsa de los Sapos; sin

embargo, una de las muestras de la provincia de Azuay tuvo un haplotipo distinto, el haplotipo 3, el cual está compartido con una muestra de la provincia de Cotopaxi (procedente de cautiverio) y una de la provincia de Pichincha (de procedencia silvestre). Esto nos indicaría que este haplotipo podría estar presente en el país de modo silvestre y endémico, debido a que este no se encuentra en ningún otro país. Se deberían realizar más muestreos en estas provincias, con el objetivo de conocer la frecuencia de este haplotipo en muestras silvestres, así como la existencia de otros haplotipos.

Las especies hospederas de las haplotipos de *Bd* que se separan del resto en el PCA corresponden a *Pristimantis ockendeni* procedente del Parque Nacional Yasuní (Orellana), *Leptodactylus pentadactylus*, de la misma localidad, *Gastrotheca riobambae*, (Pichincha) y *Pristimantis festae* (Napo) (Figura 9). Otras muestras de las mismas especies se agrupan juntas en el análisis, por lo que tampoco se observa un patrón en cuanto a hospedero.

A pesar de que se conoce que *Bd*afecta más a especies que viven o se reproducen en cursos permanentes de agua, especialmente de altura (Skerratt *et al.,* 2007), en las muestras analizadas en este estudio no se observó un patrón en base al modo de reproducción de los hospederos. Dentro de los haplotipos de las muestras que se separan del resto se encuentran diversos modos de reproducción de los hospederos:*Pristimantis ockendeni* coloca la puesta en medio terrestre y tienen un desarrollo directo; por otro lado, *Leptodactylus pentadactylus* coloca la puesta en medio terrestre, en un nido de espuma, cerca de charcas temporales donde se desarrollarán las larvas;*Gastrotheca riobambae* lleva la puesta en su marsupio y las larvas se desarrollan en medio acuático (charcas); y *Pristimantis festae* también tiene desarrollo directo (Ron*et al.,* 2012).El género

Atelopus es un ejemplo de especie con modo de reproducción acuático, en cuanto a puesta de los huevos y desarrollo larvario se refiere, ya que coloca los huevos en charcas. Sin embargo, las muestras analizadas en este estudio procedentes de especies de *Atelopus*, no presentan diferenciación en cuanto a haplotipos de *Bd*.

6.4 FILOGENIA

La filogenia obtenida en base a la región ITS confirma que los haplotipos provenientes de Japón yde la salamandra gigante *Andrias japonicus,*serían los más basales. Sin embargo, se encuentra que un haplotipo de China proveniente de *Babina pleuraden* de procedencia silvestre, comparte este clado con los haplotipos japoneses. Esto estaría apoyando la hipótesis de un origen asiático para *Bd*. Bai *et al.,* (2012) confirmaron que el Sudeste Asiático podría estar albergando un linaje endémico de *Bd* asociado a anfibios.

En general los resultados obtenidos en la filogenia son congruentes con los publicados por los autores de los diferentes estudios de las secuencias analizadas (James *et al.,* 2009; Bai *et al.,* 2012; Kaiser *et al.,* 2012; Schloegel *et al.,* 2012). Los haplotipos más diversos son los de Japón, China, Estados Unidos y Brasil; tal y como se observó también en el PCA. Sin embargo, no se puede hablar de diferencias interespecíficas todavía puesto que varios análisis similares realizados no han obtenido significación en la diversidad obtenida (Schloegel *et al.,* 2012; James *et al.,* 2009), del mismo modo que en este estudio en donde las distancias genéticas entre los haplotipos de los diferentes países es baja (Tabla 11). El grupo más divergente es Brasil, debido a que la diversidad en este país es mayor;

a pesar de que Japón y Brasil tienen una diversidad muy parecida. Pero, las muestras procedentes de especies invasoras en Japón, tienen la mayor diversidad genética, según un estudio publicado por Schloegel *el al.* 2012; los autores argumentan que esto se debe a que estas especies pueden estar acarreando haplotipos de Bd de otros países, especialmente de Brasil.

Con respecto a Ecuador, los haplotipos procedentes de la provincia de Orellana son más numerosos que los demás. Del mismo modo, en la filogenia obtenida estas muestras del Parque Nacional Yasuní se agrupan en diferentes clados con otras muestras de otros países. Esto sugiere que, probablemente estos haplotipos pudieron haber sido introducidos de estos otros países. Sin embargo, también cabe la posibilidad de que estos haplotipos puedan ser endémicos para el país y la región. Otras muestras procedentes de Cuendina, Papallacta, varias localidades de Azuay, Cotopaxi y Morona Santiago; también se agrupan en diferentes clados, con muestras de otros países. Esto puede evidenciar los diferentes eventos de introducción de *Bd* al país.

Se han realizado estudios con la región ITS de ADNr, en donde se ha comprobado que existen variaciones mayores al 5% en diferentes especies (Linder y Banik, 2011). Pero, en este estudio, la mayor variación obtenida fue de 35% entre los haplotipos de Brasil y Ecuador. Esta variación no implica que exista una diferenciación interespecífica para *Bd* ya que la variación no fue significativa (Tabla 10).

En general, la baja diversidad genética encontrada en las poblaciones del *B. dendrobatidis* en el Ecuador, y la semejanza de haplotipos con poblaciones del hongo de otros países, apoya la hipótesis del patógeno de introducción reciente. La diversidad de haplotipos encontrados en *Lithobates catesbeianus* sugiere que

esta especie ha funcionado como vector de *Bd* a través de los continentes en donde ha sido introducido.Esta evidencia indica que el haplotipovirulentodel hongo introducido (Farrer *et al.,* 2011; Schloegel *et al.,* 2012), ha sido capaz de tener una rápida dispersión a nivel mundial, así como también que estaría siendo favorecido por selección natural debido a su proliferación.

7. CONCLUSIONES

En Ecuador se evidenció una baja variabilidad genética entre los haplotipos de *Bd* encontrados (Φ_{PT} 0.032 P ≥ 0.051). Esta baja variabilidad es consistente con la hipótesis de que el patógeneo es de introducción reciente al país. Sin embargo, la diversidad de haplotipos fue alta (11 en total) lo que sugiere que podrían existir linajes endémicos en el país, ya que la mayoría de estos haplotipos no se han reportado en ninguna otra parte del mundo. Esta diversidad de haplotipos encontradostambién podría sugerir que hubieron varios eventos de introducción del patógenoal país.

Al comparar los niveles de diversidad genética a un nivel global, se observa que mientras mayor es el muestreo de *Bd* en cada país, mayor es el número de haplotipos encontrados. Por lo que, para determinar con exactitud el origen de *Bd* e inferir el tiempo que lleva en cada país, es necesario realizar un muestreo adicional de varios loci polimórficos, además de la región ITS, de amplias regiones geográficas y hospederos, para comprobar si la muestra global actuales representativa de la verdadera diversidad genética del patógeno o es sólo una parte de lo que realmente existe.

Se tuvo un mayor éxito al analizar las muestras de *Bd* con la región ITS, probablemente debido a la técnica de PCR anidada utilizada, por lo que se recomienda trabajar con esta región, siguiendo la metodología planteada. Sin embargo, se podría implementar la metodología de PCR anidado para los SNP,

de modo que se aumente el éxito en la amplificación de los mismos y sea posible complementar los estudios incluyendo estos marcadores.

Mediante la metodología implementada es posible realizar estudios de diagnóstico, genéticos y filogenéticos de *Bd*a partir de muestras de hisopos, sin necesidad de realizar cultivos puros. Esto permitiría que en el Ecuador se pueda llevar a cabo un plan de monitoreo de la quitridiomicosis, tanto en el campo, como en cautiverio. Del mismo modo, realizar un diagnóstico previo a los nuevos especímenes que llegan a los terrarios, para determinar la presencia de *Bd*resulta imprescindible para evitar el contagio del patógeno a otros especímenes; y también a que en los programas de manejo*ex-situ* de especies amenazadas se incluye la posible reintroducción de las especies a su hábitat natural e inclusive, la adopción de especies nativas para su cuidado. Tomando en cuenta todos los peligros que conlleva la introducción de patógenos como *Bd* a sitios vulnerables, es indispensable realizar pruebas de detección de estos patógenos antes de reintroducir a estas especies en dichos hábitats. De lo contrario se estaría perjudicando, más que beneficiando, a las poblaciones vulnerables.

8. LITERATURA CITADA

AmphibiaWeb. 2012. AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation [en línea]. 2012. Berkeley, California: AmphibiaWeb. <http://amphibiaweb.org/>. [Consultado: diciembre, 2012].

Annis, S.L., Dastoor, F.P., Ziel, H., Daszak, P., Longcore, J.E. 2004. *A DNA-based assay identifies Batrachochytrium dendrobatidis in amphibians. Journal of Wildlife Diseases* 40: 420-428.

Bai, Ch., Trenton, WJ., Garner, T. yLi, Y. 2010. First evidence of Batrachochytrium dendrobatidis in China: discovery of chytridiomycosis in introduced American bullfrogs and native amphibians in the Yunnan Province, China. Ecohealth7(1): 127-134.

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

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

Berger. L., Marantelli, G., Skerratt, L. y Speare, R. 2005. Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. *Diseases of Aquatic Organisms* 68: 47-50.

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* 97:331-337.

Bougnoux M., Pujol, C., Diogo, D., Bouchier, C., Sol, D., de'Enfert, C. 2008. Mating israre within as well as between clades of the human pathogen *Candida albicans*.*Fungal Genetics and Biology* 45: 221-231.

Boyle, D., Boyle, D., Olsen, V., Morgan, J. y Hyatt, A. 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic organisms* 60: 141-148.

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

Cheng, T., Rovito, S., Wake, D. y Vredenburg, V. 2011. Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108:9502-9507.

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

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

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

Coloma L. 1996. Systematics, morphology and relationship of *Atelopus* (Anura:Bufonidae). En: Program notes and abstracts of the 39th Annual

Meeting of the Society for the Study of the Amphibians and Reptiles, pp. 47. The University of Kansas, Lawrence, Kansas, USA.

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

Coloma, L. 2006. Iniciativa Balsa de los Sapos. Implementando un plan estratégico para la conservación de los anfibios ecuatorianos en riesgo de extinción. Pontificia Universidad Católica del Ecuador., Quito, Ecuador.

Cowen, L., Anderson, J. y Kohn, L. 2002.Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. *Annual Review of Microbiology* 56:139-165.

Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A., Hyatt, A., Green, D. y Speare, R. 1999. Emerging infectious disease and amphibian population declines. *Emerging Infection Diseases* 5: 735-748.

Daszak, P., Cunningham, A. y Hyatt, A. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife- Threats to biodiversity and humanhealth. *Science* 287:443-449.

de Sá, R.O. 2005. Crisis Global de Biodiversidad: Importancia de la diversidad genética y la extinción de anfibios. *Agrociencia* 9: 513-522.

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 5.4.6 <http://www.geneious.com/>.

El Mujtar, V. 2009. Análisis integrado de factores genéticos, bióticos y abióticos para la formulación de una nueva hipótesis sobre la etiología del “mal del ciprés”. Tesis Doctoral, Universidad de la Plata, La Plata, Argentina.

Farrer, R. A., Weinert, L. A. Bielby, J., Trenton, W., Garner, J., Balloux, F., Clare, F., Bosch, J., Cunningham, A. A., Weldon, C., du Preez, L. H., Anderson, L., Kosakovsky Pond, S. L., Shahar – Golan, R., Henk, D. A., Fisher, M. C. 2011. Multiple emergences of genetically diverse amphibian infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage.*Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108:18732-18736.

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

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

Futuyma, D. 2005. Evolution. Sinauer Associates, Inc, Massachusetts, USA.

GAA. 2012. Global Amphibian Assessment [en línea]. <www. globalamphibian.org>. [Consultado: noviembre, 2012].

Ganley, A y Kobayashi, T. 2007. Highly efficient concertedevolution in the ribosomal DNA repeats: total rDNA repeatvariation revealed by whole-genome shotgun sequence data.*Genome Research* 17: 184-191.

Garner, T., Perkins, P., Seglie, D., Walker, S., Cunningham, A., y Fisher, M. 2006. The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbiana*. *Biology Letters* 2: 455-459.

Gaertner, J., Forstner, M., O' Donnell, Hahn, D. 2009. Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Endemic Salamander Species from Central Texas. *EcoHealth* 6: 20-26.

Guindon, S. y Gascuel, O. 2003. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximun likelihood. *Systematic Biology* 52(5): 696-704.

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

Hyatt, A., Boyle, D., Boyle, D., Olsen V., Berger, L., Obendorf D., Dalton A., Kriger, K. Hero, M., Hines, H., Phillott, A., Campbell, R., Marantelli, G., Gleason, F. y Colling, A. 2007. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 73: 175-192.

Idnurm, A., Walton, F., Floyd, A. y Heitman, J. 2008. Identification of the sex genes in an early diverged fungus. *Nature* 451:193-196.

IUCN. 2012. IUCN Red List of Threatened Species [en línea]. Version 2012.2. <www.iucnredlist.org>. [Consultado: noviembre, 2012].

James, T. y Vilgalys, R. 2006. Amphibian chytridiomycosis as an emerging infectious disease of wildlife: what can we learn from the earliest diverging fungi? En: Molecular principles of fungal pathogenesis (Heitman, J., Filler, S., Edwards, E. y Mitchell, A.) pp. 271-278. ASM Press, Washington, D.C., USA.

James, T., Kauff, F., Schoch, C., Matheny, P., Hofstetter, V., Cox, C., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E. y Miadlikowska, J. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822.

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

Johnson M.L. y Speare, R. 2003. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and disease controlimplications. *Emerging Infectious Diseases* 9(8):922-925.

Johnson M.L. y Speare, R. 2005. Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytium dendrobatidis* in the environment. Diseases of Aquatic Organisms 65: 181-186.

Jones, T., Federspiel, H., Chibana, J., Dungan, S., Kalman, B., Magee, G.,Newport, Y., Thorstenson, N., Agabian, P., Magee, R. y Scherer, P. 2004. The diploid genomesequencedof *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 10: 7329-7334.

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

Kilburn, V., Ibañez, R. y Green, D. 2011. Reptiles as potential vectors and hosts of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Panama. *Diseases of Aquatic Organisms* 97:127-134.

Lacadena, J. 1996. Citogenética, Editorial Complutense, Madrid, España.

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

La Marca, E., Lips, K., Lötters, S., Puschendorf, R., Ibañez, R., Rueda-Almonacid, J., Schulte, R., Marty, C., Castro, F., Manzanilla-Puppo, J., García-Pérez, J., Bolaños, F., Chaves, G., Pounds, J., Toral, E., y Young, B. 2005. Catastrophic population declines and extinctions in neotropical Harlequin Frogs (Bufonidae: *Atelopus*). *Biotropica* 37: 190-201.

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): 731-740.

Lips, K., Diffendorfer, J., Mendelson, J. y Sears, M. 2008. Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLoS Biology* 6: 441-454.

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

Longcore, J. 2003. Culturing *Batrachochytrium dendrobatidis.* Department of Biological Sciences, University of Maine, Orono, Maine, pp. 4469-5722.

Ma, Z., Luo, Y., y Michailides, T. 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.

MacCracken, S., Gaertner, J., Forstner, J. y Hahn, D. 2009. Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians from the forest floor to the

upper canopy of an ecuadorian amazon lowland rainforest. *Herpetological Review* 40: 190-195.

Maddison, W. P. y Maddison, D.R. 2010. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis [en línea]. Version 2.73 <http://mesquiteproject.org>.

Mandegar, M., Otto, S. 2007. Mitotic recombination counteracts the benefitsof genetic segregation. *Procceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274: 1301-1307.

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

Mazzoni, R., Cunningham, A., Daszak, P., Apolo, A., Perdomo, E., y Speranza, G. 2003. Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. *Emerging Infectious Diseases* 9: 995-998.

Miller, C., y Dylewski, D. 1981. Syngamy and resting body development in *Chytriomyces hyalinus* (Chytridiales). *American Journal of Botany* 68: 342-349.

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

Morgan, J., Vredenburg, V., Rachowicz, L., Knapp, R., Stice, M., Tunstall, T., Bingham, R., Parker, J., Longcore, J., Moritz, C., Briggs, C. y Taylor, J. 2007. Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium*

dendrobatidis. Proceedings of the National Academy of Sciences 104: 13845-13850.

Muths, E., Corn,P., Pessier, A. y Green, D. 2003. Evidence for disease related amphibian decline in Colorado. *Biological Conservation* 110: 357-365.

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

Phillott, A., Garland, S., y Skerratt, L. 2009. Eastern Water Dragons (*Physignathus lesueureii*) are not important alternate hosts of the frog chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Herpetological Conservation and Biology* 4: 379-383.

Picco, A., y Collins, J. 2008. Amphibian commerce as a likely source of pathogen pollution. *Conservation Biology* 22: 1582-1589.

Piotrowski, J., Annis, S. y Longcore, J. 2004. Physiology of *Batrachochytrum dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96: 9-15.

Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.

Proaño-Bolaños, C., Merino-Viteri, A., Peña-Loyola, P. y Salazar-V, D. 2007. A midaltitude report of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Ecuador. *Froglog* 82: 3-4.

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

Reed, K., Ruth, G., Meyer, J., y Shukla, S. 2005. *Chlamydia pneumoniae* infection in a breeding colony of African Clawed Frogs (*Xenopus tropicalis*). *Emerging Infectious Diseases* 6: 196-199.

Rice K., Mazzotti F., Waddles J., Conill M. 2006. Uso de Anfibios como Indicadores del Exito de la Restauracion de Ecosistemas. Universidad de la Florida. Wildlife Ecology and Conservation.

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

Roger, Y., Ingraham, J., Wheelis, M. y Painter, P. 1992. Microbiología, Editorial Reverté, Barcelona, España.

Ron, S. 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.

Ron, S.R. 2005. Predicting the Distribution of the Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica* 37: 209-221.

Ron, S., Guayasamín, J., Coloma, L. y Menéndez-Guerrero, P. 2008. Lista Roja de los Anfibios de Ecuador [en línea]. Versión 1.0 (2 de mayo 2008). Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador. <http://http://www.puce.edu.ec/zoologia/sron/roja/>. [Consultado: noviembre, 2010].

Ron, S. R., Coloma, L. A, Guayasamin, J. M. y Yanez-Muñoz, M. H. 2012. AmphibiaWebEcuador [en línea]. Version 2012.0. Museo de Zoología,

Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/anfibios/AnfibiosEcuador>. [Consultado: noviembre, 2012].

Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D., Darling, A., Höna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. y Huelsenbeck, J. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. *Systematic Biology* 61:1-4.

Rovito, S., Parra-Olea, G., Vásquez-Almazán, C., Papenfuss, T. y Wake, D. 2009. Dramatic declines in neotropical salamander populations are an important part of the global amphibian crisis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 3231-3236.

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

Schloegel, L., Picco, A., Kilpatrick, A., Davies, A., Hyatt, A., y Daszak, P. 2009. Magnitude of the US trade in amphibians and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis*and ranavirus infection in imported North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Biological Conservation* 142: 1420-1426.

Schloegel, L., Toledo, L., Longcore, J., Greenspan, S., Conrado, A., Lee, M., Zhao, S., Wangen, C., Ferreira, C., Hipolito, M., Davies, A., Cuomo, C., Daszak, P. y James, T. 2012. Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade.*Molecular Ecology*21: 5162-5177.

Schoustra, S., Debets, A., Slakhorst, M. y Hoekstra, R. 2007. Mitoticrecombination accelerates adaptation in the fungus *Aspergillus nidulans*. PLoSGenetics 3(4): e68. doi:10.1371/journal.pgen.0030068.

Selmecki, A., Forche, A., Berman, J. 2006. Aneuploidy and isochromosomeformation in drug-resistant *Candida albicans*. Science 313: 367-370.

Skerratt, L., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., McDonald, K., Phillott, A., Hines, H. y Kenyon, N. 2007. Spread of Chytridiomycosis has caused therapid globaldecline and extinction of frogs.*EcoHealth* 4: 125-134.

Sparrow, F. 1960. Aquatic Phycomycetes, 2nd revised edition. University of Michigan Press, Ann Arbor.

Stebbins, R. y Cphen, N. 1995. A Natural History of Amphibians. Princeton University Press, Princeton, New, Jersey, USA.

Stuart, S., Chanson, J., Cox, N., Young, B., Rodrigues, A., Fischman, D. y Waller, R. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306: 1783-1790.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. y Kumar, S. *2007*. *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.

Tibayrenc, M., Kjellberg, F. y Ayala, F. 1990. A clonal theory of parasitic protozoa:the population structures of Entamoeba, Giardia, Leishmania, Naegleria, Plasmodium,Trichomonas, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences.*Proceedings Of The National Academy Of Sciences USA* 87: 2414-2418.

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

VillacísS.,y Zurita J.2002. Especialización: La Ranicultura como fuente de Divisas para el Ecuador. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Instituto de Ciencias Humanísticas y Económicas. Guayaquil, Ecuador.

Vredenburg, V., Knapp, R., Tunstall, T y Brigs, C. 2010. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences USA* 107 (21): 9689-9694.

Weldon, C., Du Preez, L., Hyatt, A., Muller, R. y Speare, R. 2004. Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infection Disease* 10: 2100-2105.

Whittaker, K. y Vredenburg, V. 2010. Information on amphibian biology and conservation [en línea]. Berkeley, California. <http://amphibiaweb.org/> [Consultado: noviembre, 2010].

Wu, W., Lockhart, S., Pujol, C., Srikantha, T. y Soll, D. 2007. Heterozygosity ofgenes on the sex chromosome regulates *Candida albicans* virulence. *Molecular Microbiology*64: 1587-1604.

Young, B., Lips, K., Reaser, J., Ibáñez, R., Salas, A., Cedeño, J., Coloma, L., Ron, S., La Marca, E., Meyer, J., Muñoz, A., Bolaños, F., Chaves, G. y Romo, D. 2001. Population Declines and Priorities for Amphibian Conservation in Latin America. *Conservation Biology* 15: 1213-1223.

9. FIGURAS

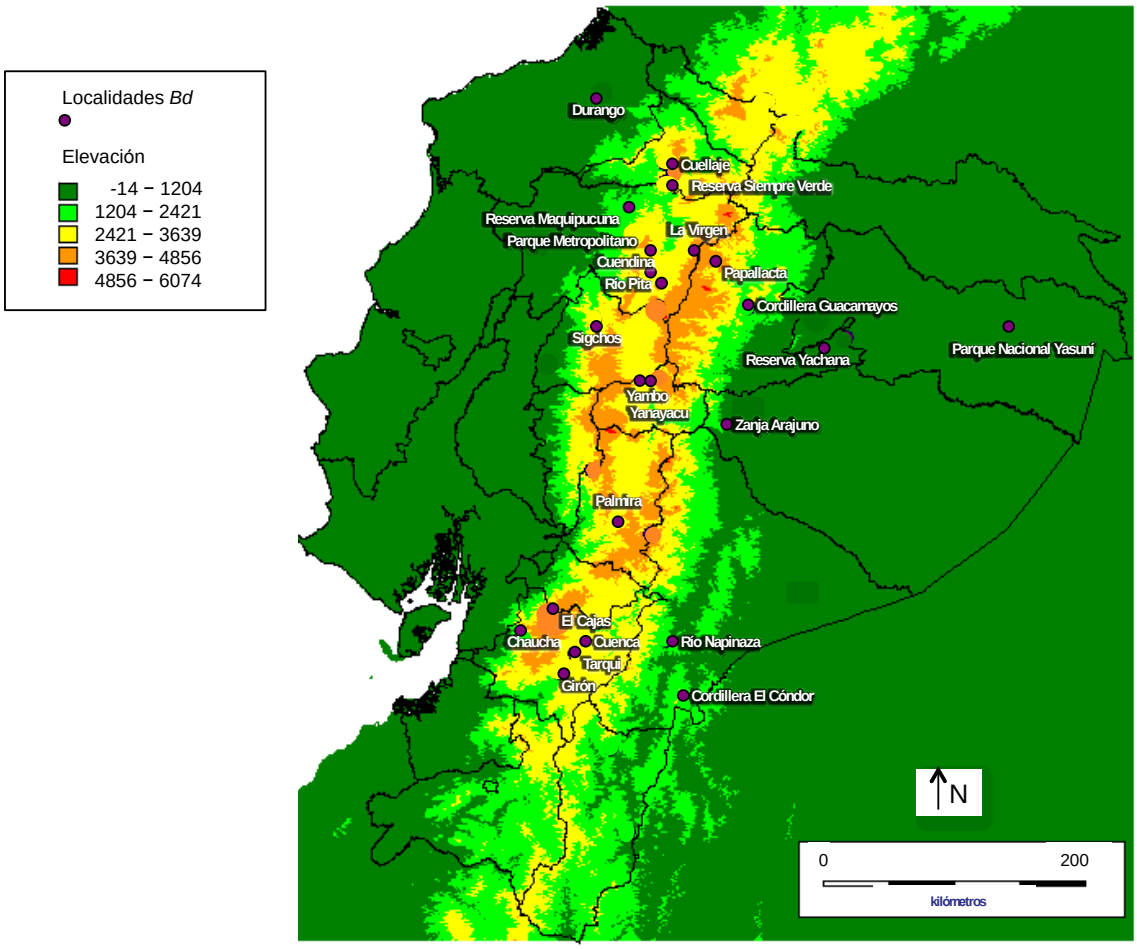


Figura1. Mapa de distribuciónde las muestrasde *Batrachochytrium dendrobatidis* analizadas.

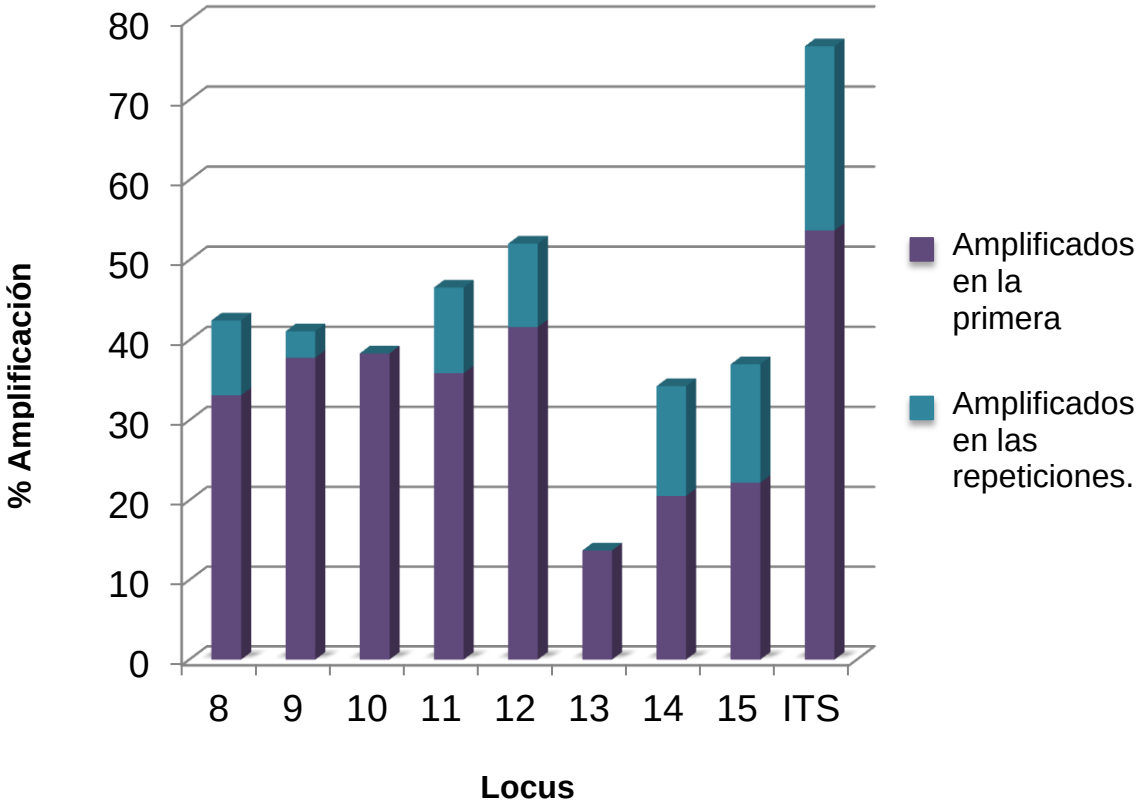


Figura 2. Proporción de muestras amplificadas para cada loci variable y la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal de *Batrachochytrium dendrobatidis*, en el primer intento y en las repeticiones.

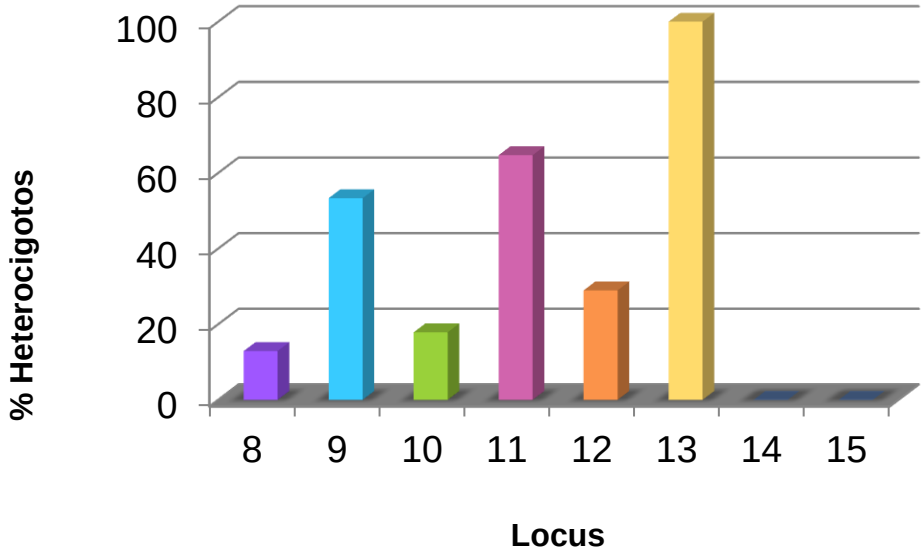


Figura 3. Proporción de muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis* heterocigotas para los 8 loci variables analizados.

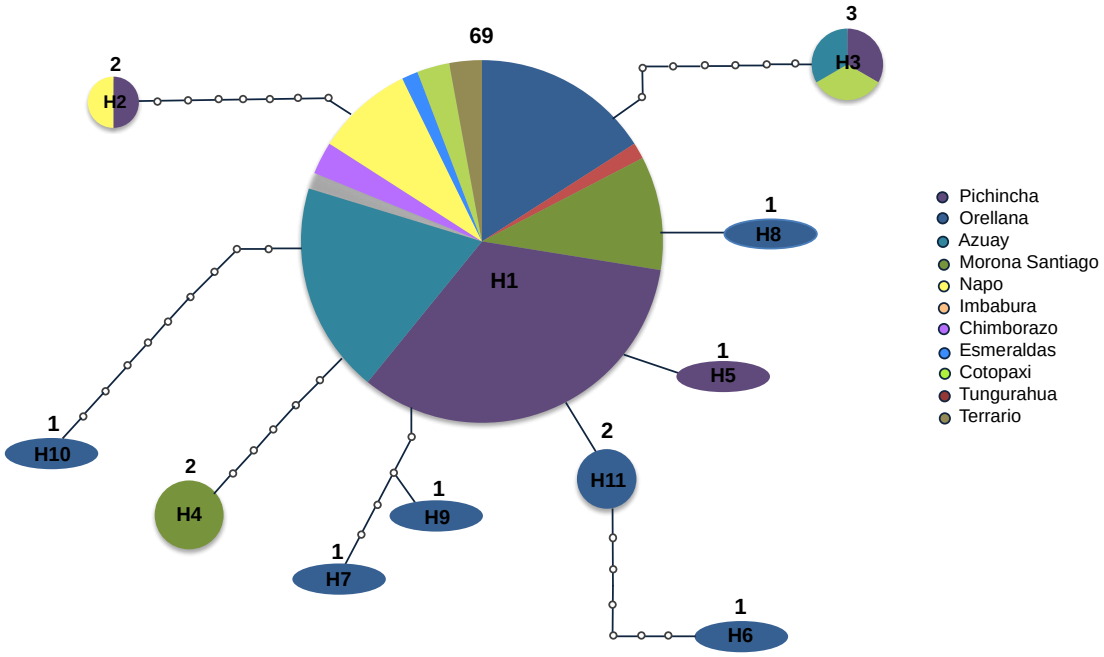


Figura 4. Red de haplotipos de la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal de muestras de*Batrachochytrium dendrobatidis* procedentes de diferentes localidades del Ecuador. La forma y tamaño de las figuras está dado por la frecuencia de cada haplotipo. Los números dentro de cada figura simbolizan a los diferentes haplotipos. Los números sobre las figuras indican la frecuencia de cada haplotipo. Las poblaciones de las que provienen los haplotipos se encuentran en la Tabla 1.

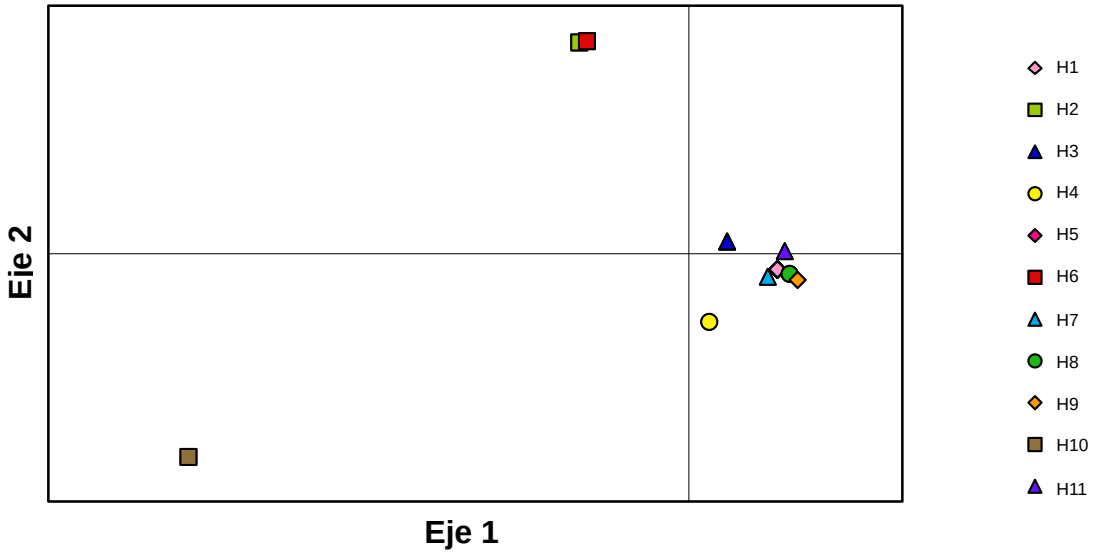


Figura5. Análisis de componentes principales (PCA) de muestras ecuatorianas de *Batrachochytrium dendrobatidis,* en base a los haplotipos encontrados para la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal.

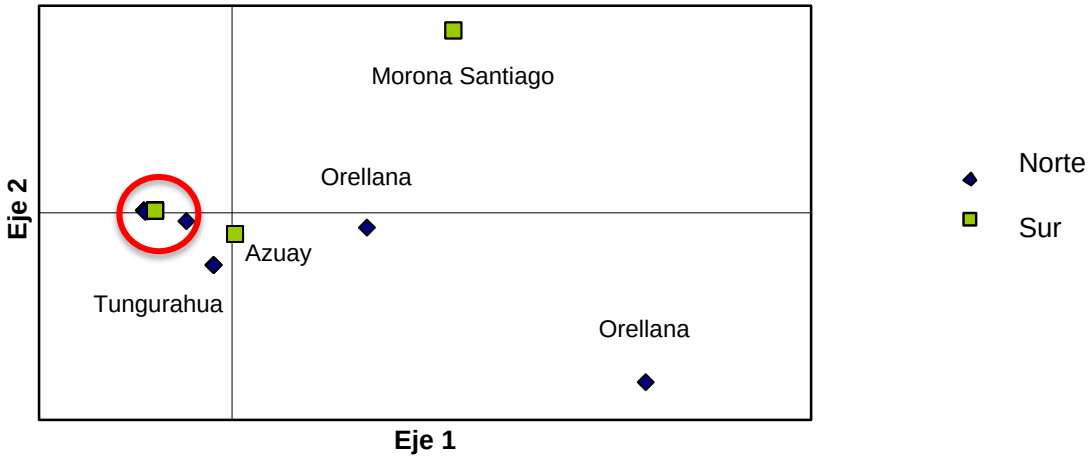


Figura 6. Análisis de componentes principales (PCA) de la secuencia de la región ITS1-5.8S para las muestras ecuatorianas de *Batrachochytrium dendrobatidis*, según ubicación norte-sur. Para el análisis se tomaron en cuenta como provincias del norte a Esmeraldas, Pichincha, Napo, Orellana, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo; mientras que las provincias del sur fueron Azuay y Morona Santiago.

En la figura se indican las muestras de las provincias que se separan del punto en el que se agrupan y solapan la mayoría, marcado por el círculo.

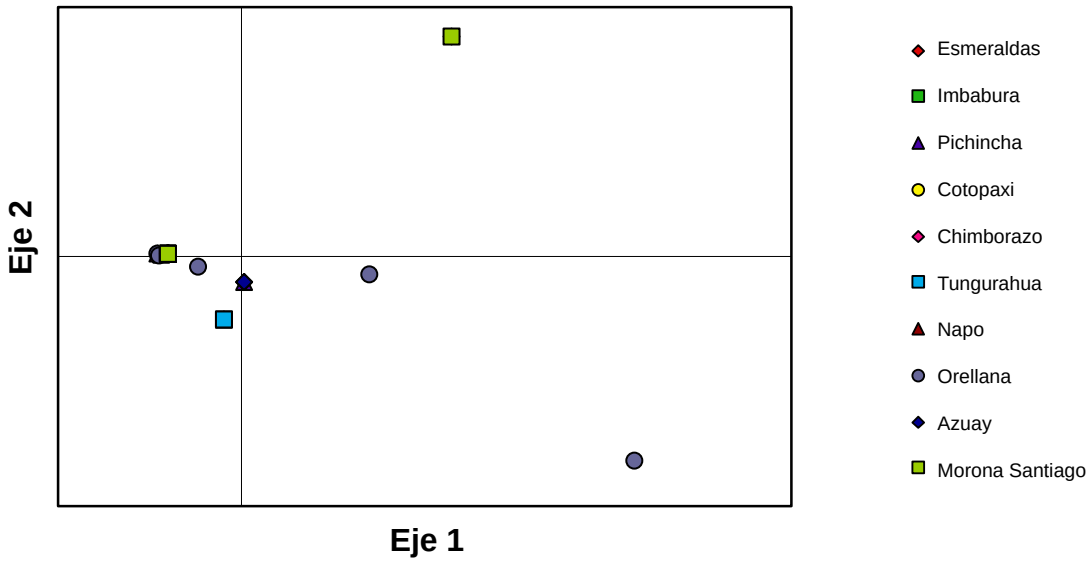


Figura7. Análisis de componentes principales (PCA)de muestras ecuatorianas de *Batrachochytrium dendrobatidis,* en base a las provincias del hospedero.

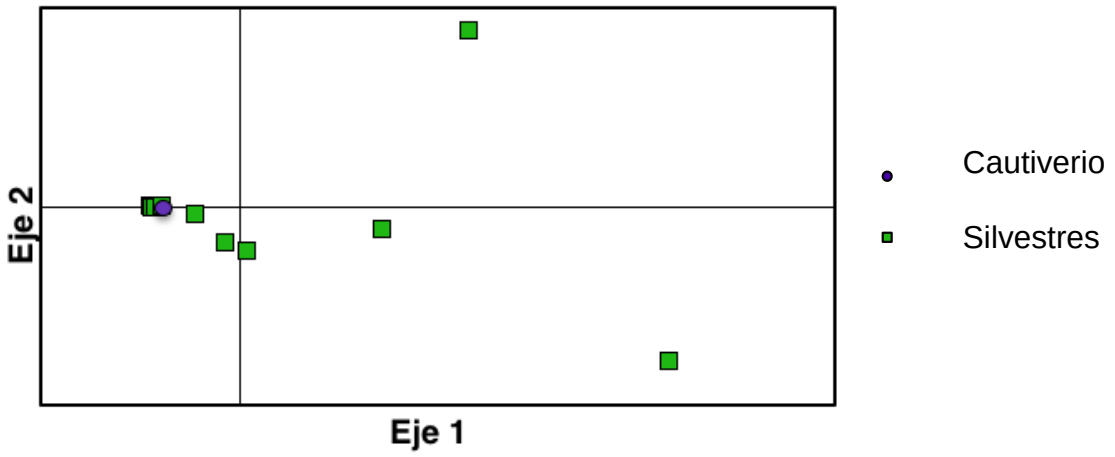


Figura 8. Análisis de componentes principales (PCA) para las muestras ecuatorianas de *Batrachochytrium dendrobatidis* en base a procedencia (silvestre-cautiverio).

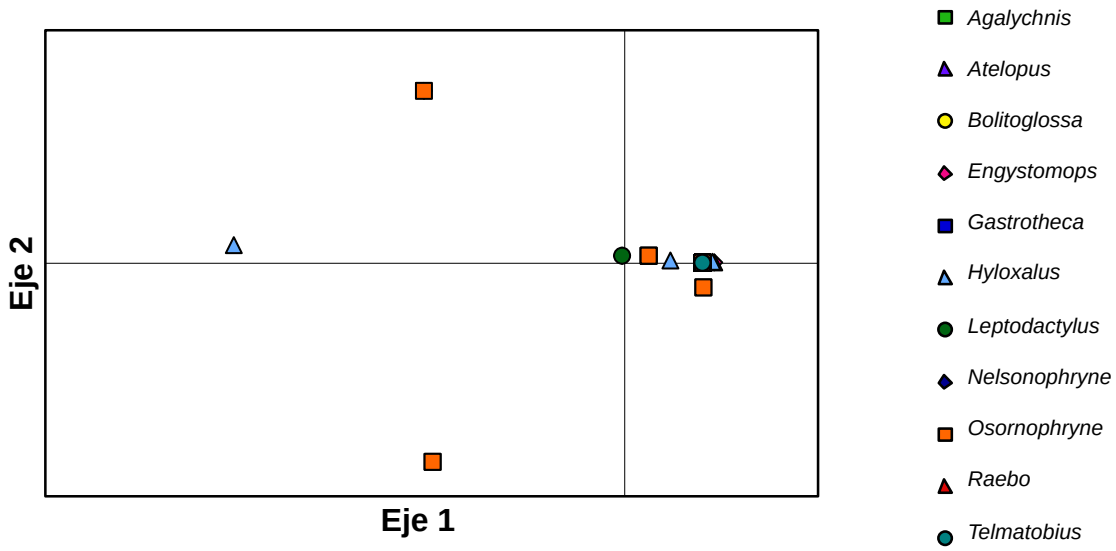


Figura9. Análisis de componentes principales (PCA) en base a especies de anfibios hospederas de las muestras ecuatorianas de *Batrachochytrium dendrobatidis.*

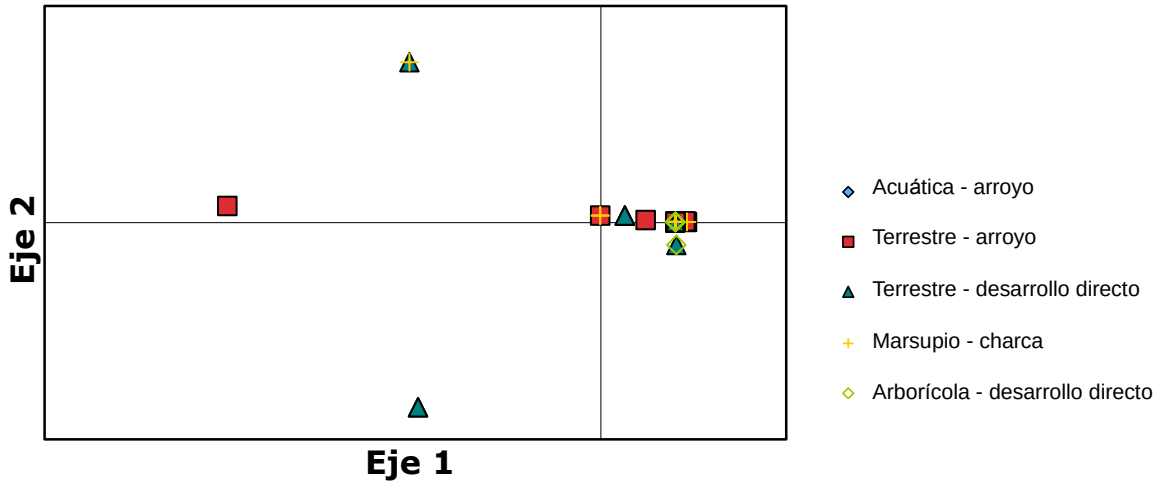


Figura 10. Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras ecuatorianas de *Batrachochytrium dendrobatidis,* en base al modo reproductivo de los géneros hospederos. Para diferenciar el modo reproductivo se tomó en cuenta la puesta de los huevos y el desarrollo larvario de cada género.

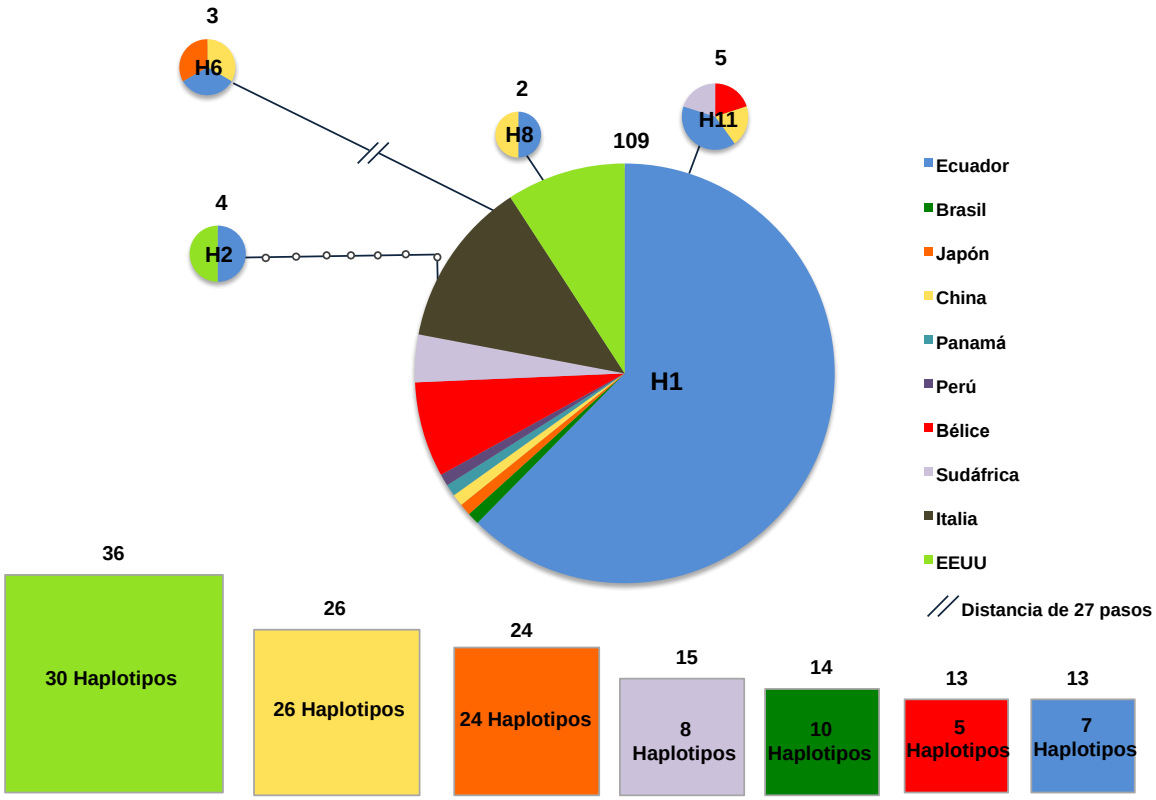


Figura 11. Red de haplotipos de la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal de muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis*a nivel mundial. La forma y tamaño de las figuras está dado por la frecuencia de cada haplotipo. Los números dentro de cada figura simbolizan a los diferentes haplotipos. Los números sobre las figuras indican la frecuencia de cada haplotipo. Los cuadrados representan los haplotipos encontrados en cada país que no están compartidos con Ecuador y los que son únicos para Ecuador.

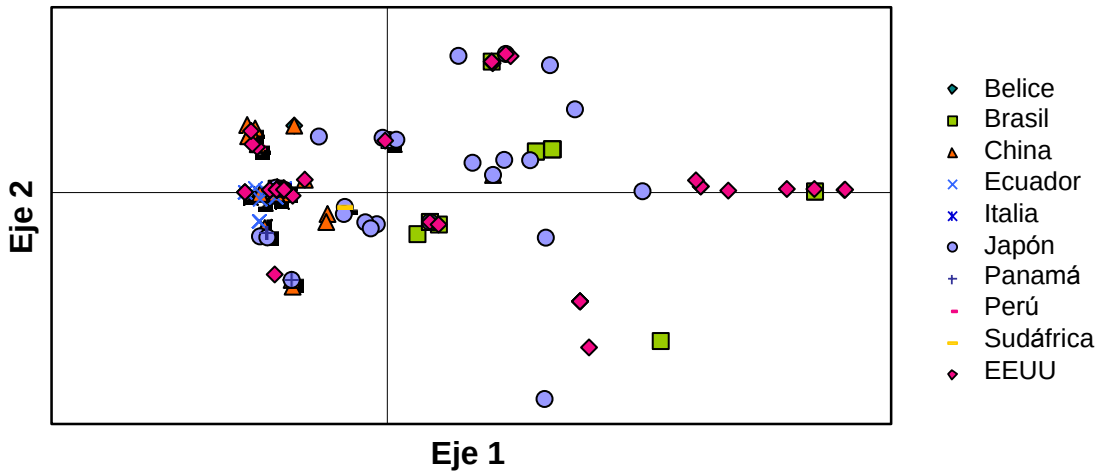


Figura 12. Análisis de componentes principales (PCA) de muestras mundiales de *Batrachochytrium dendrobatidis* en base a los haplotipos encontrados para la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal.

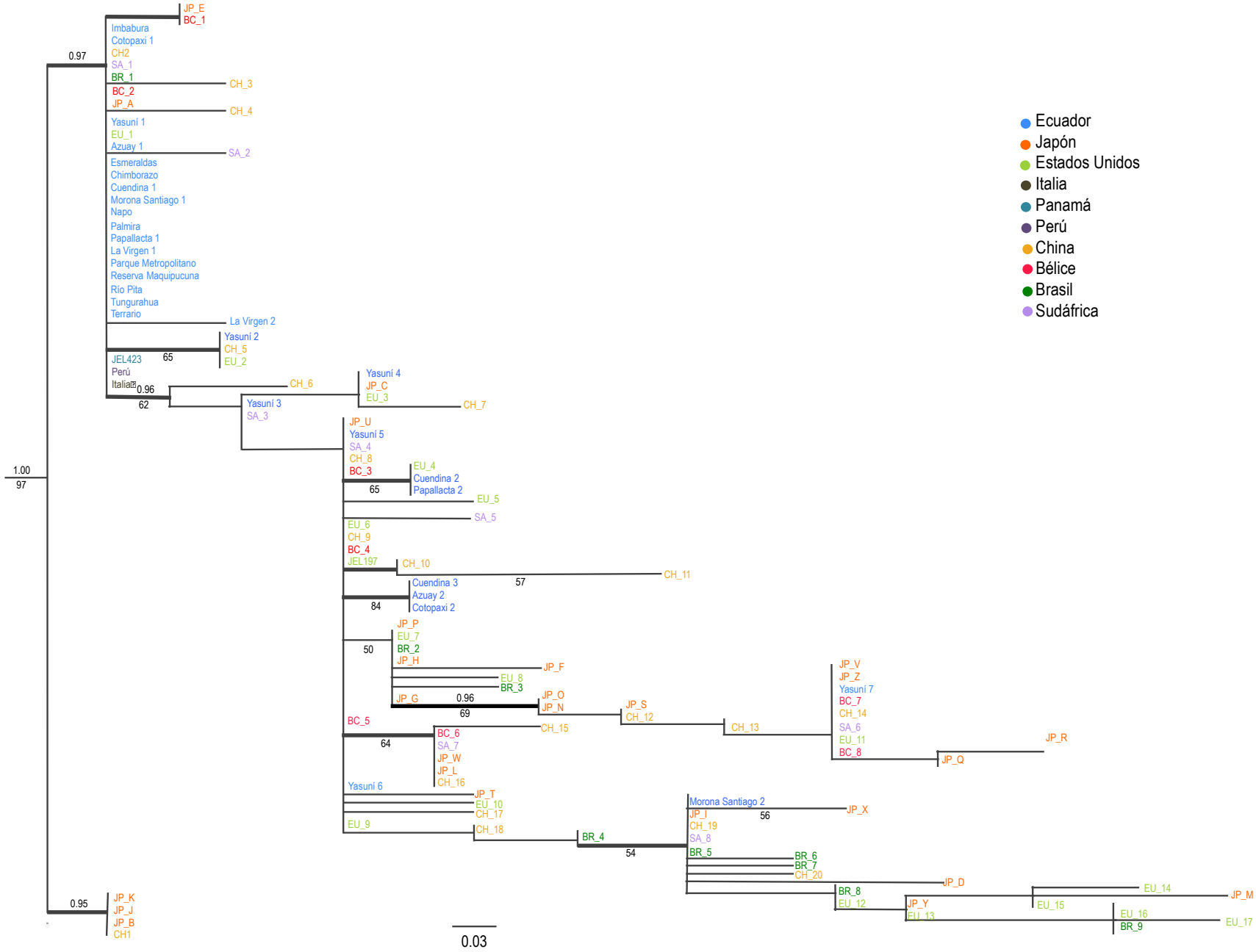

JP_E
BC_1
Imbabura
Cotopaxi 1
CH2
SA_1
BR_1
CH_3
BC_2
JP_A
CH_4
Yasuní 1
EU_1
Azuay 1
SA_2
Esmeraldas
Chimborazo
Cuendina 1
Morona Santiago 1
Napo
Palmira
Papallacta 1
La Virgen 1
Parque Metropolitano
Reserva Maquipucuna
Río Pita
Tungurahua
Terrario
La Virgen 2
Yasuní 2
CH_5
EU_2
JEL423
Perú
Italia
Yasuní 4
JP_C
EU_3
CH_6
CH_7
Yasuní 3
SA_3
JP_U
Yasuní 5
SA_4
CH_8
BC_3
EU_4
Cuendina 2
Papallacta 2
EU_5
SA_5
EU_6
CH_9
BC_4
JEL197
CH_10
CH_11
Cuendina 3
Azuay 2
Cotopaxi 2
JP_P
EU_7
BR_2
JP_H
JP_F
EU_8
BR_3
JP_G
JP_O
JP_N
JP_S
CH_12
CH_13
JP_V
JP_Z
Yasuní 7
BC_7
CH_14
SA_6
EU_11
BC_8
JP_R
JP_Q
BC_5
CH_15
BC_6
SA_7
JP_W
JP_L
CH_16
Yasuní 6
JP_T
EU_10
CH_17
EU_9
CH_18
BR_4
Morona Santiago 2
JP_I
CH_19
SA_8
BR_5
JP_X
BR_6
BR_7
CH_20
JP_D
BR_8
EU_12
EU_14
JP_M
JP_Y
EU_13
EU_15
EU_16
BR_9
EU_17
JP_K
JP_J
JP_B
CH1
0.97
1.00
97
0.96
62
65
0.96
69
64
50
84
57
0.95
0.03
Ecuador
Japón
Estados Unidos
Italia
Panamá
Perú
China
Bélice
Brasil
Sudáfrica

Figura 13. Filogenia de secuencias dela región ITS1-58S de *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Se utilizaron muestras de Rhizophydiales como grupo externo que no se muestran en esta filogenia. Los valores sobre las ramasrepresentan probabilidades Bayesianas > 0.90 y los valores (abajo) representan los valores de bootstrap de máxima verosimilitud > 50.Las líneas engrosadas representan valores de bootstrap de máxima parsimonia > 50. Los números junto a cada muestra hacen referencia a agrupaciones de muestras pertenecientes a la misma localidad, estas se pueden ver en las Tablas 1 y 2. La escala indica el número de sustituciones.

10. TABLAS

Tabla 1. Muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis*procedentes del Ecuador analizadaspara la región ITS1-5.8Sde ADN ribosomal y SNP.Las muestras de cautiverio son procedentes de la Balsa de los Sapos de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Código	Localidad	Provincia	Procedencia	Especie	Año de colección	Tipo de muestra	Referencia	N_h	N_f
Qcaz47771	Durango	Esmeraldas	Silvestre	*Agalychnis spurrelli*	Indet.	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Esmeraldas
Qcaz39375	Girón	Azuay	Cautiverio	*Atelopus exiguus*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Azuay 1
Bd12aab10	Río Napinaza	Morona Santiago	Silvestre	*Atelopus* sp.	2009	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Morona Santiago 1
Bd12aar5	Río Napinaza	Morona Santiago	Silvestre	*Atelopus* sp.	2009	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Morona Santiago 1
Bd6aar5	Río Napinaza	Morona Santiago	Silvestre	*Atelopus* sp.	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Morona Santiago 1
Bd6aar6	Río Napinaza	Morona Santiago	Silvestre	*Atelopus* sp.	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Morona Santiago 1
Yas024	ECY-PUCE	Orellana	Silvestre	*Bolitoglosssa peruviana*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Yasuní 1
Qcaz40871	Sanja Arajuno	Pastaza	Silvestre	*Engystomops petersi*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	Δ	–
Qcaz40890	Sanja Arajuno	Pastaza	Silvestre	*Engystomops petersi*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	Δ	–
T616	Cuenca	Azuay	Cautiverio	*Gastrotheca litonedis*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	◆	–
Qcaz46874	Tarqui	Azuay	Cautiverio	*Gastrotheca litonedis*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Azuay 1
Qcaz48073	Girón	Azuay	Cautiverio	*Gastrotheca pseustes*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Azuay 1

Tabla 1. Continuación.

Código	Localidad	Provincia	Procedencia	Especie	Año de colección	Tipo de muestra	Referencia	N_h	N_f
Qcaz39373	PNC	Azuay	Cautiverio	*Gastrotheca pseustes*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Azuay 1
T1328	PNC	Azuay	Cautiverio	*Gastrotheca pseustes*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Azuay 1
T1660	Palmira	Chimborazo	Cautiverio	*Gastrotheca pseustes*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Chimborazo 1
T719	Indet.	Azuay	Cautiverio	*Gastrotheca pseustes*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Azuay 1
T724	Sigchos	Cotopaxi	Cautiverio	*Gastrotheca pseustes*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Cotopaxi 1
T1158	Cuenca	Azuay	Cautiverio	*Gastrotheca riobambae*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	◆	–
T1178	Yambo	Cotopaxi	Cautiverio	*Gastrotheca riobambae*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Azuay 1
T1309	Yambo	Cotopaxi	Cautiverio	*Gastrotheca riobambae*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H3	Cotopaxi 2
T1165	Yambo	Cotopaxi	Cautiverio	*Gastrotheca riobambae*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	Δ	–
T1572	Chaucha	Azuay	Cautiverio	*Gastrotheca* sp.	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Azuay 1
T1313	PNC	Azuay	Cautiverio	*Gastrotheca* sp.	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Azuay 1
Sc28625	Cuellaje	Imbabura	Silvestre	*Hyloscirtus* sp.	2009	Hisopo	Analizada en este estudio*	◆	–
Sc24371	Río Pita	Pichincha	Silvestre	*Hyloxalus jacobuspetersi*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Río Pita
Qcaz40894	Sanja Arajuno	Pastaza	Silvestre	*Leptodactylus wagneri*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	Δ	–
T1170	Tarqui	Azuay	Cautiverio	*Nelsonophryne aequatorialis*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Azuay 1
T1184	Tarqui	Azuay	Cautiverio	*Nelsonophryne aequatorialis*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Azuay 1

Tabla 1. Continuación.

Código	Localidad	Provincia	Procedencia	Especie	Año de colección	Tipo de muestra	Referencia	N_h	N_f
T1250	Tarqui	Azuay	Cautiverio	*Nelsonophryne aequatorialis*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Azuay 1
T1289	Tarqui	Azuay	Cautiverio	*Nelsonophryne aequatorialis*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H3	Azuay 2
T1307	Tarqui	Azuay	Cautiverio	*Nelsonophryne aequatorialis*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Azuay 1
T1117	Tarqui	Azuay	Cautiverio	*Nelsonophryne aequatorialis*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	Δ	–
T1185	Tarqui	Azuay	Cautiverio	*Nelsonophryne aequatorialis*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	Δ	–
Qcaz40095	Cordillera Guacamayos	Napo	Silvestre	*Osornophryne guacamayo*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Napo
Qcaz40103	Cordillera Guacamayos	Napo	Silvestre	*Osornophryne guacamayo*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Napo
Qcaz40111	Cordillera Guacamayos	Napo	Silvestre	*Osornophryne guacamayo*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	◆	–
Qcaz38420	Limón	Morona Santiago	Silvestre	*Osteocephalus festae*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	◆	–
Qcaz42198	Reserva Maquipucuna	Pichincha	Silvestre	*Pristimantis achatinus*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Reserva Maquipucuna
Qcaz42200	Reserva Maquipucuna	Pichincha	Silvestre	*Pristimantis achatinus*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Reserva Maquipucuna
Bds35	Oso Verde	Indet.	Silvestre	*Pristimantis calcarulatus*	2009	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	–
Qcaz41875	Río Napinaza	Morona Santiago	Silvestre	*Pristimantis conspicillatus*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H4	Morona Santiago 2
B345	Yanayacu	Tungurahua	Silvestre	*Pristimantis kirklandi*	2009	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Tungurahua
Qcaz40330	Reserva Siempre Verde	Imbabura	Silvestre	*Pristimantis leoni*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Imbabura

Tabla 1. Continuación.

Código	Localidad	Provincia	Procedencia	Especie	Año de colección	Tipo de muestra	Referencia	N_h	N_f
Qcaz48799	Reserva Yachana	Napo	Silvestre	*Pristimantis malkini*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	◆	–
Qcaz39802	Río Napinaza	Morona Santiago	Silvestre	*Pristimantis* sp.	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Morona Santiago 1
Qcaz41845	Río Napinaza	Morona Santiago	Silvestre	*Pristimantis* sp.	2007	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Morona Santiago 1
Qcaz41860	Río Napinaza	Morona Santiago	Silvestre	*Pristimantis* sp.	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H4	Morona Santiago 2
Qcaz40112	Cordillera Guacamayos	Napo	Silvestre	*Pristimantis* sp.	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	◆	–
Qcaz41380	Cordillera de El Cóndor	Zamora Chinchipe	Silvestre	*Pristimantis* sp.	2009	Hisopo	Analizada en este estudio*	◆	–
Qcaz38113	Río Napinaza	Morona Santiago	Silvestre	*Raebo* cf. *glaberrimus*	2008	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Morona Santiago 1
T703a°	–	–	Cautiverio	*Telmatobius* sp.	2009	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Perú
T703b°	–	–	Cautiverio	*Telmatobius* sp.	2009	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Perú
B003	Indet.	–	Cautiverio	Indet.	2010	Hisopo	Analizada en este estudio*	Δ*	–
6Aar15	Indet.	–	Cautiverio	Indet.	2010	Hisopo	Analizada en este estudio*	Δ*	–
Bd16	Indet.	Indet.	Cautiverio	Indet.	2007	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Terrario
Bdbgr9	Indet.	Indet.	Cautiverio	Indet.	2011	Hisopo	Analizada en este estudio*	H1	Terrario
H16100	Indet.	–	Cautiverio	Indet.	2009	Hisopo	Analizada en este estudio*	Δ	–
Bd386	Parque Metropolitano	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca riobambae*	2009	Discos orales	Manzano, 2010	H1	Parque Metropolitano
Bd388	Parque Metropolitano	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca riobambae*	2009	Discos orales	Manzano, 2010	H1	Parque Metropolitano

Tabla 1. Continuación.

Código	Localidad	Provincia	Procedencia	Especie	Año de colección	Tipo de muestra	Referencia	N_h	N_f
Bd390	Parque Metropolitano	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca riobambae*	2009	Discos orales	Manzano, 2010	H1	Parque Metropolitano
Bd400	Parque Metropolitano	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca riobambae*	2009	Discos orales	Manzano, 2010	H1	Parque Metropolitano
Bd404	Parque Metropolitano	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca riobambae*	2009	Discos orales	Manzano, 2010	Δ	–
Bd401	Parque Metropolitano	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca riobambae*	2009	Discos orales	Manzano, 2010	Δ	–
Bd402	Parque Metropolitano	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca riobambae*	2009	Discos orales	Manzano, 2010	Δ	–
Bd403	Parque Metropolitano	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca riobambae*	2009	Discos orales	Manzano, 2010	Δ	–
Qcaz50473	La Virgen	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca pseustes*	2011	Discos orales	Sáenz, 2011∞	H1	La Virgen 1
Qcaz50468	La Virgen	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca pseustes*	2011	Discos orales	Sáenz, 2011∞	H1	La Virgen 1
Qcaz50469	La Virgen	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca pseustes*	2011	Discos orales	Sáenz, 2011∞	H1	La Virgen 1
Qcaz50470	La Virgen	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca pseustes*	2011	Discos orales	Sáenz, 2011∞	H5	La Virgen 2
Qcaz50471	La Virgen	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca pseustes*	2011	Discos orales	Sáenz, 2011∞	H1	La Virgen 1
Qcaz50472	La Virgen	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca pseustes*	2011	Discos orales	Sáenz, 2011∞	H1	La Virgen 1
Mr1	Cuendina	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca riobambae*	2009	Discos orales	Sáenz, 2011	H1	Cuendina 1
Mr3	Cuendina	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca riobambae*	2009	Discos orales	Sáenz, 2011	H1	Cuendina 1
Mr4	Cuendina	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca riobambae*	2009	Discos orales	Sáenz, 2011	H1	Cuendina 1
Mr5	Cuendina	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca riobambae*	2009	Discos orales	Sáenz, 2011	H1	Cuendina 1
A001	Cuendina	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca riobambae*	2009	Hisopo	Sáenz, 2011	H1	Cuendina 1
A005	Cuendina	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca riobambae*	2009	Hisopo	Sáenz, 2011	H2	Cuendina 2
A006	Cuendina	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca riobambae*	2009	Hisopo	Sáenz, 2011	H1	Cuendina 1
A008	Cuendina	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca riobambae*	2009	Hisopo	Sáenz, 2011	H3	Cuendina 3
A010	Cuendina	Pichincha	Silvestre	*Gastrotheca riobambae*	2009	Hisopo	Sáenz, 2011	H1	Cuendina 1
Qcaz49686	La Virgen	Pichincha	Silvestre	*Pristimantis festae*	2010	Hisopo	Sáenz, 2011∞	H1	La Virgen 1

Tabla 1. Continuación.

Código	Localidad	Provincia	Procedencia	*Especie*	Año de colección	Tipo de muestra	Referencia	Nh	Nf
Qcaz49689	La Virgen	Pichincha	Silvestre	*Pristimantis festae*	2010	Hisopo	Sáenz, 2011∞	H1	La Virgen 1
Qcaz49679	La Virgen	Pichincha	Silvestre	*Pristimantis festae*	2010	Hisopo	Sáenz, 2011	H1	La Virgen 1
Qcaz49667	Papallacta	Napo	Silvestre	*Pristimantis festae*	2010	Hisopo	Sáenz, 2011	H1	Papallacta 1
Qcaz49669	Papallacta	Napo	Silvestre	*Pristimantis festae*	2010	Hisopo	Sáenz, 2011	H1	Papallacta 1
Qcaz49670	Papallacta	Napo	Silvestre	*Pristimantis festae*	2010	Hisopo	Sáenz, 2011	H1	Papallacta 1
Qcaz49673	Papallacta	Napo	Silvestre	*Pristimantis festae*	2010	Hisopo	Sáenz, 2011	H2	Papallacta 2
Ys 01	PNY	Orellana	Silvestre	*Engystomops petersi*	2004-2006	Hisopo	McCracken *et al.*, 2009	H1	Yasuní 1
Ys 04	PNY	Orellana	Silvestre	*Leptodactylus discodactylus*	2004-2006	Hisopo	McCracken *et al.*, 2009	H1	Yasuní 1
Ys 05	PNY	Orellana	Silvestre	*Leptodactylus discodactylus*	2004-2006	Hisopo	McCracken *et al.*, 2009	H1	Yasuní 1
Ys 06	PNY	Orellana	Silvestre	*Leptodactylus pentadactylus*	2004-2006	Hisopo	McCracken et al., 2009	H7	Yasuní 7
Ys 10	PNY	Orellana	Silvestre	*Leptodactylus pentadactylus*	2004-2006	Hisopo	McCracken *et al.*, 2009	H8	Yasuní 2
Ys 11	PNY	Orellana	Silvestre	*Leptodactylus pentadactylus*	2004-2006	Hisopo	McCracken *et al.*, 2009	H9	Yasuní 6
Ys 12	PNY	Orellana	Silvestre	*Leptodactylus pentadactylus*	2004-2006	Hisopo	McCracken *et al.*, 2009	H10	Yasuní 4
Ys 03	PNY	Orellana	Silvestre	*Leptodactylus rhodomystax*	2004-2006	Hisopo	McCracken *et al.*, 2009	H1	Yasuní 1
Ys 07	PNY	Orellana	Silvestre	*Pristimantis aureolineatus*	2004-2006	Hisopo	McCracken *et al.*, 2009	H1	Yasuní 1
Ys 08	PNY	Orellana	Silvestre	*Pristimantis aureolineatus*	2004-2006	Hisopo	McCracken *et al.*, 2009	H1	Yasuní 1
Ys 14	PNY	Orellana	Silvestre	*Pristimantis aureolineatus*	2004-2006	Hisopo	McCracken *et al.*, 2009	H11	Yasuní 5
Ys 13	PNY	Orellana	Silvestre	*Pristimantis lanthanites*	2004-2006	Hisopo	McCracken *et al.*, 2009	H1	Yasuní 1

Tabla 1. Continuación.

Código	Localidad	Provincia	Procedencia	*Especie*	Año de colección	Tipo de muestra	Referencia	Nh	Nf
Ys 02	PNY	Orellana	Silvestre	*Pristimantis ockendeni*	2004-2006	Hisopo	McCracken *et al.*, 2009	H6	Yasuní 3
Ys 15	PNY	Orellana	Silvestre	*Pristimantis waoranii*	2004-2006	Hisopo	McCracken *et al.*, 2009	H11	Yasuní 4
Ys 09	PNY	Orellana	Silvestre	*Pristimantis waoranii*	2004-2006	Hisopo	McCracken *et al.*, 2009	H1	Yasuní 1
Ys 16	PNY	Orellana	Silvestre	*Pristimantis waoranii*	2004-2006	Hisopo	McCracken *et al.*, 2009	H1	Yasuní 1
Ys 17	PNY	Orellana	Silvestre	*Pristimantis waoranii*	2004-2006	Hisopo	McCracken *et al.*, 2009	H1	Yasuní 1

* Muestras de ADN almacenadas en el Laboratorio de Biología Molecular del Museo de Zoología Qcaz.
∞Muestras amplificadas y secuenciadas en este estudio, procedentes de extracción de ADN de Sáenz (2011).
Δ Muestras sin amplificación en este estudio.
Δ* Muestras previamente diagnosticadas negativas para *Bd,* sin amplificación en este estudio.
° Muestras procedentes de Perú.
◆Secuencia no tomada en cuenta por ser muy corta.
N_h Código asigando a cada haplotipo en el presente estudio.
N_f Nombre asignado a la agrupación en la filogenia en el presente estudio.
ECY: Estación Científica Yasuní.
PNC: Parque Nacional Cajas.
Indet.: Datos indeterminados.

Tabla 2. Alelos encontrados en las muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis* amplificadas para los ocho loci variables analizados.

Código	Locus 8 8009X2 SNP_1 - 19..67..155..173..264..276 G..G..A..G..T/A..T..G..A..C	Locus 9 8329X2 SNP_1 – 64 A/G	Locus 10 8392X2 SNP_1 - 76 A/T	Locus 11 8667Y2 SNP_1 - 153 AA/GG	Locus 12 8702X2 SNP_1 - 56 C/T	Locus 13 ctsynl SNP_1 - 381 A/G	Locus 14 lsu(35)cy SNP_1 - 162 T/C	Locus 15 r6046 Del_2 - 429 CA/-
Bd6aar05	A..A..T..G..A..C	A/G	A	AG/AG	C/T	A/G	T	-
Bd6aar06	A..A..T..G..A..C	A/G	A	AG/AG	C/T	A/G	T	-
Bd12aab10	A..A..T..G..A..C	A/G	A	AG/AG	C/T	A/G	T	-
Bd12aar05	A..A..T..G..A..C	A/G	A	AG/AG	C/T	A/G	T	-
Bd16	A..A..T..G..A..C	G	A	AG/AG	C/T	-	T	-
Bd386	A..A..T..G..A..C	G	A	AA	T	-	T	-
Bd390	-	G	-	-	-	-	-	-
Bd400	A..A..T..G..A..C	G	A	AA	T	-	T	-
Bd404	A..A..T..G..A..C	G	A	AA	T	-	T	-
Bd345	A..A..T..G..A..C	-	-	AA	T	A/G	-	-
Bdbgr9	A..A..T..G..A..C	-	A	AG/AG	-	-	T	-
Bds35	A..A..T..G..A..C	A	A	GG	T	-	T	-
Qcaz38113	G..A..G..A..G..T	A/G	T	AG/AG	T	-	T	-
Qcaz38420	-	G	-	-	T	-	-	-
Qcaz39373	A..A..T..G..A..C/G..A..G..A..G..T	A/G	A/T	AG/AG	-	A/G	T	-
Qcaz39375	A..A..T..G..A..C	A/G	A	GG	-	A/G	T	-
Qcaz39802	G..A..G..A..G..T	A/G	T	AG/AG	T	-	T	-
Qcaz40095	A..A..T..G..A..C	G	A	-	T	-	T	-
Qcaz40103	-	-	-	-	-	-	-	-
Qcaz40111	A..A..T..G..A..C	-	-	-	-	-	-	-
Qcaz40112	-	A/G	-	AG/AG	-	-	-	-
Qcaz40330	-	A/G	A	-	T	-	T	-

Tabla 2. Continuación.

Código	Locus 8 8009X2 SNP_1 - 19..67..155..173..264..276 G..G..A..G..T/A..T..G..A..C	Locus 9 8329X2 SNP_1 – 64 A/G	Locus 10 8392X2 SNP_1 - 76 A/T	Locus 11 8667Y2 SNP_1 - 153 AA/GG	Locus 12 8702X2 SNP_1 - 56 C/T	Locus 13 ctsynl SNP_1 - 381 A/G	Locus 14 lsu(35)cy SNP_1 - 162 T/C	Locus 15 r6046 Del_2 - 429 CA/-
Qcaz41845	A..A..T..G..A..C/G..A..G..A..G..T	A	A/T	AG/AG	T	-	T	-
Qcaz41860	A..A..T..G..A..C	A/G	A	AG/AG	T	-	T	-
Qcaz41875	G..A..G..A..G..T	G	T	AG/AG	T	-	T	-
Qcaz42198	G..A..G..A..G..T	G	-	-	T	-	-	-
Qcaz42200	G..A..G..A..G..T	G	-	-	T	-	-	-
Qcaz46874	A..A..T..G..A..C	A	A/T	AG/AG	-	A/G	T	-
Qcaz47771	-	-	-	AA	-	-	-	-
Qcaz48073	-	-	A	-	T	-	-	-
QCAZ48799	A.. – ..T..G..A..C	-	-	GG	-	-	-	-
QCAZ50469	-	-	-	-	T	-	-	-
SC24371	-	-	-	-	T	-	-	-
SC28625	G..A..G..A..G..T	-	-	AG/AG	T	-	-	-
T1158	A..A..T..G..A..C	A/G	A	AG/AG	C/T	-	T	-
T1178	A..A..T..G..A..C	A/G	A	AA	C/T	-	T	-
T1250	-	-	-	-	T	-	-	-
T1289	-	-	-	AG/AG	T	-	-	-
T1307	-	-	-	GG	T	-	-	-
T1309	-	A/G	-	AG/AG	C/T	-	T	-
T1313	-	-	A	AA	C/T	-	-	-
T1328	-	A/G	A	AA	T	A/G	-	-
T1572	A..A..T..G..A..C	A/G	A	AG/AG	T	A/G	T	-
T1660	-	-	-	AG/AG	-	-	-	-
T616	-	-	-	-	T	-	-	-
T719	A..A..T..G..A..C/G..A..G..A..G..T	-	A/T	-	T	-	-	-
T724	A..A..T..G..A..C	-	-	-	C/T	-	-	-

Tabla 2. Continuación.

Código	Locus 8 8009X2 SNP_1 - 19..67..155..173..264..276 G..G..A..G..T/A..T..G..A..C	Locus 9 8329X2 SNP_1 – 64 A/G	Locus 10 8392X2 SNP_1 - 76 A/T	Locus 11 8667Y2 SNP_1 - 153 AA/GG	Locus 12 8702X2 SNP_1 - 56 C/T	Locus 13 ctsynl SNP_1 - 381 A/G	Locus 14 lsu(35)cy SNP_1 - 162 T/C	Locus 15 r6046 Del_2 - 429 CA/-
T703 B	-	-	-	AG/AG	T	-	-	-
YAS024	A..A..T..G..A..C/G..A..G..A..G..T	A	A/T	AA	T		T	-
JEL423 (C+)	A..A..T..G..A..C	G	A	AG/AG	C/T	A/G	T	-
JP005	-	-	A	-	-	-	T	-
JAM059_1	A..A..T..G..A..C	A	T	-	-	A	C	-
JAM059_2	G..A..G..A..G..T	G	-	-	-	G	-	-
JAM081_1	-	-	-	AA	T	-	-	-
JAM081_2	-	-	-	GG	C	-	T	-
JEL197	-	-	-	-	-	A/G	-	AC/_
JAM234	-	-	-	-	-	-	-	AC

[1] Posición de los polimorfismos de nucléotido simple (SNP).
[2] Posición de la deleción en el locus 15.
– Deleción en esa posición en el locus 8.
- Indica que no hubo amplificación de la muestra para ese locus.
.. Indica que existen espacios entre polimorfismos.
/ Indica heterocigotos en esa posición.

JEL423: cepa de Bd procedente de *Phyllomedusa lemur*, Panamá (Longcore, 2003).
JP005: cepa de *Bd* procedente de *Xenopus laevis*, importado de Ghana (Sudáfrica) a Berkeley (USA) (Morgan *et al*., 2007).
JAM059: cepas de *Bd* procedente de *Rana muscosa*, California (USA) (Morgan *et al*., 2007).
JAM081: cepas de *Bd* procedente de *Rana sierrae*, California (USA) (Morgan *et al*., 2007).
JEL197: cepa de *Bd* procedente de *Dendrobates azureus*, Washington DC (USA) (Morgan *et al*., 2007).
JEL234: cepa de *Bd* procedente de *Rana catesbeiana*, California (USA) (Morgan *et al*., 2007).

Tabla 3. Frecuencias alélicas de muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis* heterocigotas por provincia para los ocho loci nucleares analizados. En negrilla se indican los loci con exceso de heterocigotos observados sobre lo esperado, para cada provincia.

Provincias	*	Locus 8	Locus 9	Locus 10	Locus 11	Locus 12	Locus 13	Locus 14	Locus 15
Cotopaxi	N	2	2	1	2	3	0	3	2
	Na	1	2	1	2	2	0	1	1
	Ne	1.000	2.000	1.000	1.600	2.000	0.000	1.000	1.000
	Ho	0.000	**1.000**	0.000	**0.500**	**1.000**	0.000	0.000	0.000
	He	0.000	**0.500**	0.000	**0.375**	**0.500**	0.000	0.000	0.000
Imbabura	N	1	1	1	1	2	0	1	1
	Na	1	2	1	2	1	0	1	1
	Ne	1.000	2.000	1.000	2.000	1.000	0.000	1.000	1.000
	Ho	0.000	**1.000**	0.000	**1.000**	0.000	0.000	0.000	0.000
	He	0.000	**0.500**	0.000	**0.500**	0.000	0.000	0.000	0.000
Napo	N	3	2	1	2	1	0	1	2
	Na	2	2	1	2	1	0	1	1
	Ne	1.800	1.600	1.000	1.600	1.000	0.000	1.000	0.000
	Ho	0.000	0.375	0.000	**0.500**	0.000	0.000	0.000	0.000
	He	0.444	0.500	0.000	**0.375**	0.000	0.000	0.000	0.000
Orellana	N	2	2	2	2	2	0	2	0
	Na	2	1	2	1	1	0	1	0
	Ne	2.000	2.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000
	Ho	**1.000**	0.000	**1.000**	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	He	**0.500**	0.000	**0.500**	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Pichincha	N	5	5	3	3	5	0	3	0
	Na	2	1	1	1	1	0	1	0
	Ne	1.724	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	0.000
	Ho	0.200	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	He	0.420	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Tabla 3. Continuación.

Provincias	∗	Locus 8	Locus 9	Locus 10	Locus 11	Locus 12	Locus 13	Locus 14	Locus 15
Tungurahua	N	2	0	0	2	2	2	0	2
	Na	1	0	0	1	1	2	0	1
	Ne	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	2.000	0.000	1.000
	Ho	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	**1.000**	0.000	0.000
	He	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	**0.500**	0.000	0.000
Chimborazo	N	0	0	0	2	0	0	0	2
	Na	0	0	0	2	0	0	0	1
	Ne	0.000	0.000	0.000	2.000	0.000	0.000	0.000	1.000
	Ho	0.000	0.000	0.000	**1.000**	0.000	0.000	0.000	0.000
	He	0.000	0.000	0.000	**0.500**	0.000	0.000	0.000	0.000
Azuay	N	6	6	9	9	9	5	5	8
	Na	2	2	2	2	2	2	1	1
	Ne	1.385	1.946	1.385	2.000	1.246	2.000	1.000	1.000
	Ho	**0.333**	**0.833**	**0.333**	**0.556**	**0.222**	**1.000**	0.000	0.000
	He	**0.278**	**0.486**	**0.278**	**0.500**	**0.198**	**0.500**	0.000	0.000
Morona Santiago	N	9	10	9	9	10	4	9	8
	Na	2	2	2	2	2	2	1	1
	Ne	1.976	1.980	1.976	2.000	1.342	2.000	1.000	1.000
	Ho	0.222	**0.700**	0.222	**1.000**	**0.300**	**1.000**	0.000	0.000
	He	0.494	**0.495**	0.494	**0.500**	**0.255**	**0.500**	0.000	0.000

∗N = número de muestras / Na = número de alelos / Ne = número efectivo de alelos / Ho = heterocigosidad observada / He = heterocigosidad esperada.

Tabla 4. Frecuencia de muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis* heterocigotas para los ocho loci nucleares analizados. En negrilla se indican los loci con exceso de heterocigotos observados sobre lo esperado, para cada loci.

*	Locus 8	Locus 9	Locus 10	Locus 11	Locus 12	Locus 13	Locus 14	Locus 15
N	3.333	3.111	2.889	3.556	3.778	1.222	2.667	2.778
Na	1.444	1.333	1.111	1.667	1.222	0.667	0.778	0778
Ne	1.320	1.281	1.040	1.578	1.065	0.667	0.778	0.778
Ho	0,195	**0.448**	**0.173**	**0.506**	**0.169**	**0.333**	0.000	0.000
He	0,237	**0.262**	**0.141**	**0.306**	**0.106**	**0.167**	0.000	0.000

*N = número promedio de muestras / Na = número promedio de alelos / Ne = número efectivo promedio de alelos / Ho = heterocigosidad promedio observada / He = heterocigosidad promedio esperada.

Tabla 5. Porcentajes de heterocigocidad y loci polimórficos de las muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis* analizadas para los ocho loci nucleares, por hospedero y por provincia.

Hospedero	Provincia	n	Loci heterocigotos	Loci polimórficos*
Atelopus exiguous	Azuay	1		
Gastrotheca litonedis		2		
Gastrotheca pseustes		4	6 (75,00%)	75,00%
Gastrotheca riobambae		1		
Gastrotheca sp.		2		
Nelsonophryne aequatorialis		2		
Gastrotheca pseustes	Chimborazo	1	1 (12,50%)	12,50%
Gastrotheca pseustes	Cotopaxi	1	3 (37,50%)	37,50%
Gastrotheca riobambae		2		
Pristimantis leoni	Imbabura	1	2 (25,00%)	25,00%
Hyloscirtus sp.		1		
Atelopus sp.	Morona	4		
Pristimantis conspicillatus	Santiago	1	6 (75,00%)	75,00%
Pristimantis sp.		2		
Osteocephalus festae		2		
Raebo cf. *glaberrimus*		1		
Pristimantis malkini	Napo	1		
Pristimantis sp.		1	2 (25,00%)	37,50%
Osornophryne guacamayo		2		
Bolitoglossa peruviana	Orellana	1	2 (25,00%)	25,00%
Gastrotheca riobambae	Pichincha	3	1 (12,50%)	12,50%
Pristimantis achatinus		2		
Pristimantis kirklandi	Tungurahua	1	1 (12,50%)	12,50%

***** Porcentajes calculados con GenAlEx V.6.41

Tabla 6. Frecuencias de los haplotipos de la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal de *Batrachochytrium dendrobatidis*, en las diferentes localidadesecuatorianas muestreadas.

Haplotipo	Provincia										
	Esmeraldas	Imbabura	Pichincha	Cotopaxi	Chimborazo	Tungurahua	Napo	Orellana	Azuay	Morona Santiago	Total
H1	1	1	23	2	2	1	5	11	12	7	65
H2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2
H3	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	3
H4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
H5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
H7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
H8	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
H9	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
H10	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
H11	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
Total	1	1	26	3	2	1	6	18	13	9	80

Tabla 7. Análisis molecular de la varianza (AMOVA) de los haplotipos de la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal de *Batrachochytrium dendrobatidis* encontrados en el Ecuador, agrupados por regiones, provincias, procedencia, hospederos y modo reproductivo del hospedero.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Φ_{PT}	P≥
Entre poblaciones (norte-sur)	1	1.933	0.030	3	0.032	0.051
Dentro de poblaciones	81	74.899	0.925	97		
Total	82	76.831	0.955			
Entre poblaciones (provincias)	9	13.472	0.085	9	0.089	0.077
Dentro de poblaciones	73	63.360	0.868	91		
Total	82	76.831	0.952			
Entre poblaciones (silvestres-cautiverio)	1	0.980	0.004	0	0.004	0.269
Dentro de poblaciones	83	71.232	0.858	100		
Total	84	72.212	0.862			
Entre poblaciones (hospederos)	11	5.817	0.000	0	-0.003	0.496
Dentro de poblaciones	83	78.994	0.952	100		
Total	94	84.811	0.952			
Entre poblaciones (modo de reproducción)	4	3.501	0.000	0	-0.072	0.865
Dentro de poblaciones	83	81.263	0.923	100		
Total	94	84.763	0.923			

Tabla 8. Muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis* procedentes de otros países incluídas en los análisis filogenéticos y de haplotipos de la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal.

Código	No. Acceso GenBank	País	Especie	Referencia	N_h	N_f
T703A	S/N	Perú	*Telmatobius* sp.	Analizada en este estudio	H1	Perú
T703B	S/N	Perú	*Telmatobius* sp.	Analizada en este estudio	H1	Perú
CN1	JN870740	China	*Lithobates catesbeianus*	Bai *et al*., 2012	H19	CH_15
CN2	JN870741	China	*Pelophylax nigromaculatus*	Bai *et al*., 2012	H20	CH_16
CN3	JN870755	China	*Cynops orientalis*	Bai *et al*., 2012	H31	CH_13
CN4	JN870744	China	*Lithobates catesbeianus*	Bai *et al*., 2012	H22	CH_12
CN5	JN870742	China	*Lithobates catesbeianus*	Bai *et al*., 2012	H21	CH_7
CN6	JN870756	China	*Lithobates catesbeianus*	Bai *et al*., 2012	H14	CH_8
CN7	JN870747	China	*Lithobates catesbeianus*	Bai *et al*., 2012	H24	CH_14
CN8	JN870749	China	*Fejervarya limnocharis*	Bai *et al*., 2012	H12	CH_14
CN9	JN870750	China	*Cynops orientalis*	Bai *et al*., 2012	H26	CH_14
CN10	JN870753	China	*Lithobates catesbeianus*	Bai *et al*., 2012	H29	CH_19
CN11	JN870754	China	*Lithobates catesbeianus*	Bai *et al*., 2012	H30	CH_20
CN12	JN870743	China	*Fejervarya limnocharis*	Bai *et al*., 2012	H13	CH_8
CN13	JN870768	China	*Fejervarya limnocharis*	Bai *et al*., 2012	H40	CH_9
CN14	JN870769	China	*Lithobates catesbeianus*	Bai *et al*., 2012	H6	CH_2
CN15	JN870767	China	*Pelophylax nigromaculatus*	Bai *et al*., 2012	H11	CH_8
CN16	JN870745	China	*Odorrana andersonii*	Bai *et al*., 2012	H18	CH_9
CN17	JN870746	China	*Lithobates catesbeianus*	Bai *et al*., 2012	H23	CH_3

Tabla 8. Continuación.

Código	No. Acceso GenBank	País	Especie	Referencia	N_h	N_f
CN18	JN870759	China	*Pelophylax nigromaculatus*	Bai *et al*., 2012	H1	CH_2
CN19	JN870762	China	*Lithobates catesbeianus*	Bai *et al*., 2012	H35	CH_2
CN20	JN870766	China	*Rana chaochiaoensis*	Bai *et al*., 2012	H39	CH_8
CN21	JN870765	China	*Lithobates catesbeianus*	Bai *et al*., 2012	H38	CH_6
CN22	JN870763	China	*Rana chaochiaoensis*	Bai *et al*., 2012	H36	CH_4
CN23	JN870764	China	*Bufo gargarizans*	Bai *et al*., 2012	H37	CH_10
CN24	JN870760	China	*Fejervarya limnocharis*	Bai *et al*., 2012	H33	CH_17
CN25	JN870757	China	*Fejervarya limnocharis*	Bai *et al*., 2012	H8	CH_5
CN26	JN870761	China	*Babina pleuraden*	Bai *et al*., 2012	H34	CH_11
CN27	JN870758	China	*Lithobates catesbeianus*	Bai *et al*., 2012	H32	CH_10
CN28	JN870751	China	*Lithobates catesbeianus*	Bai *et al*., 2012	H27	CH_9
CN29	JN870748	China	*Babina pleuraden*	Bai *et al*., 2012	H25	CH_14
CN30	JN870752	China	*Rana pleuraden*	Bai *et al*., 2012	H28	CH_1
IT BD01	FJ010547	Italia	*Pelophylax esculentus*	Federici *et al*., 2009	H1	Italia
IT BD02	FJ010548	Italia	*Pelophylax esculentus*	Federici *et al*., 2009	H1	Italia
IT BD03	FJ010549	Italia	*Pelophylax esculentus*	Federici *et al*., 2009	H1	Italia
IT BD04	FJ010550	Italia	*Pelophylax esculentus*	Federici *et al*., 2009	H1	Italia
IT BD05	FJ010551	Italia	*Bombina pachypus*	Federici *et al*., 2009	H1	Italia
IT BD06	FJ010552	Italia	*Pelophylax esculentus*	Federici *et al*., 2009	H1	Italia
IT BD07	FJ010553	Italia	*Pelophylax esculentus*	Federici *et al*., 2009	H1	Italia
IT BD08	FJ010554	Italia	*Pelophylax esculentus*	Federici *et al*., 2009	H1	Italia
IT BD09	FJ010555	Italia	*Pelophylax esculentus*	Federici *et al*., 2009	H1	Italia
IT BD10	FJ010556	Italia	*Pelophylax esculentus*	Federici *et al*., 2009	H1	Italia
IT BD11	FJ010557	Italia	*Pelophylax esculentus*	Federici *et al*., 2009	H1	Italia

Tabla 8. Continuación.

Código	No. Acceso GenBank	País	Especie	Referencia	N_h	N_f
IT BD12	FJ010558	Italia	*Pelophylax esculentus*	Federici *et al*., 2009	H1	Italia
IT BD13	FJ010559	Italia	*Pelophylax esculentus*	Federici *et al*., 2009	H1	Italia
IT BD14	FJ010560	Italia	*Pelophylax esculentus*	Federici *et al*., 2009	H1	Italia
JP BD01	AB435211	Japón	*Cynops ensicauda*	Goka *et al*., 2009	H1	JP_A
JP BD02	AB435212	Japón	*Andrias japonicus*	Goka *et al*., 2009	H99	JP_B
JP BD03	AB435213	Japón	*Ceratophrys ornata*	Goka *et al*., 2009	H6	JP_C
JP BD04	AB435214	Japón	*Rana (Rugosa) rugosa*	Goka *et al*., 2009	H13	JP_E
JP BD05	AB435215	Japón	*Lithobates catesbeianus*	Goka *et al*., 2009	H41	JP_F
JP BD06	AB435216	Japón	*Lithobates catesbeianus*	Goka *et al*., 2009	H42	JP_G
JP BD07	AB435217	Japón	*Lithobates catesbeianus*	Goka *et al*., 2009	H43	JP_H
JP BD08	AB435218	Japón	*Cynops ensicauda*	Goka *et al*., 2009	H44	JP_I
JP BD09	AB435219	Japón	*Andrias japonicus*	Goka *et al*., 2009	H45	JP_J
JP BD10	AB435220	Japón	*Andrias japonicus*	Goka *et al*., 2009	H46	JP_K
JP BD11	AB435221	Japón	*Rana catesbeiana*	Goka *et al*., 2009	H47	JP_L
JP BD12	AB435222	Japón	*Afrixalus fornasinii*	Goka *et al*., 2009	H48	JP_M
JP BD13	AB435223	Japón	*Lithobates catesbeianus*	Goka *et al*., 2009	H49	JP_N
JP BD14	AB435224	Japón	*Lithobates catesbeianus*	Goka *et al*., 2009	H50	JP_O
JP BD15	AB435225	Japón	*Lithobates catesbeianus*	Goka *et al*., 2009	H51	JP_P
JP BD16	AB435226	Japón	*Ceratophrys cranwelli*	Goka *et al*., 2009	H52	JP_Q
JP BD17	AB435227	Japón	*Ceratophrys ornata*	Goka *et al*., 2009	H53	JP_R
JP BD18	AB435228	Japón	*Lithobates catesbeianus*	Goka *et al*., 2009	H54	JP_S
JP BD19	AB435229	Japón	*Lithobates catesbeianus*	Goka *et al*., 2009	H55	JP_T
JP BD20	AB435230	Japón	*Ceratophrys ornata*	Goka *et al*., 2009	H56	JP_U
JP BD21	AB435231	Japón	*Xenopus laevis*	Goka *et al*., 2009	H57	JP_V

Tabla 8. Continuación.

Código	No. Acceso GenBank	País	Especie	Referencia	N_h	N_f
JP BD22D	AB469195	Japón	*Lithobates catesbeianus*	Goka *et al*., 2009	H58	JP_D
JP BD23W	AB469196	Japón	*Cynops ensicauda*	Goka *et al*., 2009	H15	JP_W
JP DB24X	AB469197	Japón	*Ceratophrys ornata*	Goka *et al*., 2009	H60	JP_X
JP BD25Y	AB469198	Japón	*Lithobates catesbeianus*	Goka *et al*., 2009	H59	JP_Y
JP BD26Z	AB469199	Japón	*Fejervarya limnocharis*	Goka *et al*., 2009	H26	JP_Z
I12	S/N**	Bélice	*Craugastor chac*	Kaiser *et al*., 2012	H11	BC_3
KK1	S/N**	Bélice	*Lithobates vaillanti*	Kaiser *et al*., 2012	H12	BC_8
KK15_1	S/N**	Bélice	*Incilius campbelli*	Kaiser *et al*., 2012	H13	BC_1
KK15_2	S/N**	Bélice	*Craugastor sobrinus*	Kaiser *et al*., 2012	H13	BC_1
KK15_3	S/N**	Bélice	*Agalychnis moreletii*	Kaiser *et al*., 2012	H13	BC_1
KK15_4	S/N**	Bélice	*Lithobates juliani*	Kaiser *et al*., 2012	H13	BC_1
KK15_5	S/N**	Bélice	*Lithobates vaillanti*	Kaiser *et al*., 2012	H13	BC_1
KK15_6	S/N**	Bélice	*Indeterminada*	Kaiser *et al*., 2012	H13	BC_1
KK23	S/N**	Bélice	*Indeterminada*	Kaiser *et al*., 2012	H12	BC_7
KK33	S/N**	Bélice	*Agalychnis moreletii*	Kaiser *et al*., 2012	H14	BC_4
KK41	S/N**	Bélice	*Craugastor chac*	Kaiser *et al*., 2012	H15	BC_6
KK5_1	S/N**	Bélice	*Incilius* sp.	Kaiser *et al*., 2012	H1	BC_2
KK5_2	S/N**	Bélice	*Hyalinobatrachium fleischmanni*	Kaiser *et al*., 2012	H1	BC_2
KK5_3	S/N**	Bélice	*Agalychnis moreletii*	Kaiser *et al*., 2012	H1	BC_2
KK5_4	S/N**	Bélice	*Smilisca cyanosticta*	Kaiser *et al*., 2012	H1	BC_2
KK5_5	S/N**	Bélice	*Craugastor sabrinus*	Kaiser *et al*., 2012	H1	BC_2
KK5_6	S/N**	Bélice	*Lithobates berlandieri*	Kaiser *et al*., 2012	H1	BC_2
KK5_7	S/N**	Bélice	*Lithobates vaillanti*	Kaiser *et al*., 2012	H1	BC_2
KK5_8	S/N**	Bélice	Indeterminada	Kaiser *et al*., 2012	H1	BC_2

Tabla 8. Continuación.

Código	No. Acceso GenBank	País	Especie	Referencia	N_h	N_f
KK6_1	S/N**	Bélice	*Agalychnis moreletii*	Kaiser *et al*., 2012	H16	BC_5
KK6_2	S/N**	Bélice	*Lithobates juliani*	Kaiser *et al*., 2012	H16	BC_5
KK6_3	S/N**	Bélice	*Lithobates vaillanti*	Kaiser *et al*., 2012	H16	BC_5
JEL423	DS022300*****	Panamá	*Phyllomedusa lemur*	Longcore, 2004	H1	JEL423
BR_1	JQ582942	Brasil	*Phyllomedusa distincta*	Schloegel *et al*., 2012	H1	BR_1
JEL648_A	JQ582931	Brasil	*Hylodes ornatus*	Schloegel *et al*., 2012	H51	BR_2
JEL648_B	JQ582889	Brasil	*Hylodes ornatus*	Schloegel *et al*., 2012	H64	BR_5
JEL648_C	JQ582902	Brasil	*Hylodes ornatus*	Schloegel *et al*., 2012	H73	BR_8
JEL648_D	JQ582918	Brasil	*Hylodes ornatus*	Schloegel *et al*., 2012	H51	BR_2
JEL648_E	JQ582891	Brasil	*Hylodes ornatus*	Schloegel *et al*., 2012	H66	BR_4
JEL648_F	JQ582892	Brasil	*Hylodes ornatus*	Schloegel *et al*., 2012	H67	BR_6
JEL648_G	JQ582919	Brasil	*Hylodes ornatus*	Schloegel *et al*., 2012	H51	BR_2
JEL648_H	JQ582914	Brasil	*Hylodes ornatus*	Schloegel *et al*., 2012	H75	BR_9
JEL648_I	JQ582907	Brasil	*Hylodes ornatus*	Schloegel *et al*., 2012	H75	BR_9
JEL648_J	JQ582917	Brasil	*Hylodes ornatus*	Schloegel *et al*., 2012	H78	BR_3
JEL648_K	JQ582894	Brasil	*Hylodes ornatus*	Schloegel *et al*., 2012	H68	BR_1
JEL648_L	JQ582893	Brasil	*Hylodes ornatus*	Schloegel *et al*., 2012	H64	BR_5
JEL648_M	JQ582933	Brasil	*Hylodes ornatus*	Schloegel *et al*., 2012	H86	BR_9
JEL648_N	JQ582890	Brasil	*Hylodes ornatus*	Schloegel *et al*., 2012	H65	BR_7
HM_1	HM153084	Estados Unidos	*Eurycea tonkawae*	Gaertner *et al*., 2009	H17	EU_6
HM_2	HM153085	Estados Unidos	*Eurycea pterophila*	Gaertner *et al*., 2009	H1	EU_1
HQ_1	HQ176488	Estados Unidos	*Eurycea nana*	Tupper *et al*., 2011	H18	EU_6
HQ_2	HQ176489	Estados Unidos	*Eurycea tonkawae*	Tupper *et al*., 2011	H1	EU_1
HQ_3	HQ176490	Estados Unidos	*Eurycea tonkawae*	Tupper *et al*., 2011	H1	EU_1

Tabla 8. Continuación.

Código	No. Acceso GenBank	País	Especie	Referencia	N_h	N_f
HQ_4	HQ176491	Estados Unidos	*Acris crepitans blanchardi*	Tupper *et al*., 2011	H1	EU_1
HQ_5	HQ176492	Estados Unidos	*Eurycea tonkawae*	Tupper *et al*., 2011	H1	EU_1
JEL197	AY997031	Estados Unidos	*Dendrobates azureus*	James *et al*., 2006	H1	JEL197
MN 1	FJ229469	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Rodriguez *et al*., 2009	H2	EU_4
MN 2	FJ229470	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Rodriguez *et al*., 2009	H2	EU_4
TX BD01	FJ373880	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Gaertner *et al*., 2009	H82	EU_1
TX BD02	FJ373881	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Gaertner *et al*., 2009	H91	EU_2
TX BD03	FJ373882	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Gaertner *et al*., 2009	H92	EU_1
TX BD04	FJ373883	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Gaertner *et al*., 2009	H1	EU_1
TX BD05	FJ373884	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Gaertner *et al*., 2009	H1	EU_1
TX BD06	FJ373885	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Gaertner *et al*., 2009	H1	EU_1
TX NA04	EU779860	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Gaertner *et al*., 2009	H98	EU_6
TX NE14	EU779863	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Gaertner *et al*., 2009	H1	EU_1
TX PT12	EU779866	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Gaertner *et al*., 2009	H83	EU_1
TX SS01	EU779859	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Gaertner *et al*., 2009	H97	EU_9
TX TK01	EU779861	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Gaertner *et al*., 2009	H93	EU_5
TX TK03	EU779867	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Gaertner *et al*., 2009	H94	EU_8
TX TK04	EU779862	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Gaertner *et al*., 2009	H96	EU_6
TX TK09	EU779865	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Gaertner *et al*., 2009	H12	EU_11
TX TK13	EU779864	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Gaertner *et al*., 2009	H95	EU_6
UM142_A	JQ582901	Estados Unidos	*Eurycea tonkawae*	Schloegel *et al*., 2012	H68	EU_6
UM142_B	JQ582888	Estados Unidos	*Acris crepitans blanchardi*	Schloegel *et al*., 2012	H63	EU_16
UM142_B	JQ582913	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Schloegel *et al*., 2012	H77	EU_15

Tabla 8. Continuación.

Código	No. Acceso GenBank	País	Especie	Referencia	N_h	N_f
UM142_C	JQ582895	Estados Unidos	*Acris crepitans blanchardi*	Schloegel *et al*., 2012	H51	EU_7
UM142_D	JQ582934	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Schloegel *et al*., 2012	H87	EU_16
UM142_E	JQ582886	Estados Unidos	*Acris crepitans blanchardi*	Schloegel *et al*., 2012	H61	EU_17
UM142_F	JQ582911	Estados Unidos	*Lithobates clamitans*	Schloegel *et al*., 2012	H76	EU_16
UM142_G	JQ582898	Estados Unidos	*Lithobates pipiens*	Schloegel *et al*., 2012	H71	EU_7
UM142_H	JQ582887	Estados Unidos	*Acris crepitans blanchardi*	Schloegel *et al*., 2012	H62	EU_16
UM142_I	JQ582930	Estados Unidos	*Scaphiopus holbrookii*	Schloegel *et al*., 2012	H84	EU_8
UM142_J	JQ582936	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Schloegel *et al*., 2012	H88	EU_14
UM142_L	JQ582939	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Schloegel *et al*., 2012	H90	EU_10
UM142_M	JQ582899	Estados Unidos	*Acris crepitans blanchardi*	Schloegel *et al*., 2012	H68	EU_6
UM142_N	JQ582909	Estados Unidos	*Bufo nebulifer*	Schloegel *et al*., 2012	H76	EU_16
UM142_O	JQ582897	Estados Unidos	*Lithobates sylvaticus*	Schloegel *et al*., 2012	H70	EU_13
UM142_P	JQ582900	Estados Unidos	*Eurycea sosorum*	Schloegel *et al*., 2012	H72	EU_3
UM142_Q	JQ582932	Estados Unidos	*Lithobates catesbeianus*	Schloegel *et al*., 2012	H85	EU_12
UM142_R	JQ582908	Estados Unidos	*Bufo houstonensis*	Schloegel *et al*., 2012	H70	EU_13
UM142_S	JQ582912	Estados Unidos	*Lithobates clamitans*	Schloegel *et al*., 2012	H76	EU_16
UM142_T	JQ582910	Estados Unidos	*Lithobates* sp.	Schloegel *et al*., 2012	H76	EU_16
UM142_U	JQ582896	Estados Unidos	*Eurycea neotenes*	Schloegel *et al*., 2012	H69	EU_8
CW34_A	JQ582924	Sudáfrica	*Xenopus laevis*	Schloegel *et al*., 2012	H79	SA_7
CW34_B	JQ582926	Sudáfrica	*Xenopus laevis*	Schloegel *et al*., 2012	H79	SA_7
CW34_C	JQ582923	Sudáfrica	*Xenopus laevis*	Schloegel *et al*., 2012	H12	SA_6
CW34_D	JQ582906	Sudáfrica	*Xenopus laevis*	Schloegel *et al*., 2012	H13	SA_3
CW34_E	JQ582925	Sudáfrica	*Xenopus laevis*	Schloegel *et al*., 2012	H81	SA_1

Tabla 8. Continuación.

Código	No. Acceso GenBank	País	Especie	Referencia	N_h	N_f
CW34_F	JQ582927	Sudáfrica	*Xenopus laevis*	Schloegel *et al*., 2012	H26	SA_6
CW34_G	JQ582904	Sudáfrica	*Xenopus laevis*	Schloegel *et al*., 2012	H1	SA_1
CW34_H	JQ582941	Sudáfrica	*Xenopus laevis*	Schloegel *et al*., 2012	H44	SA_8
CW34_I	JQ582938	Sudáfrica	*Lithobates catesbeianus*	Schloegel *et al*., 2012	H89	SA_2
CW34_J	JQ582903	Sudáfrica	*Xenopus laevis*	Schloegel *et al*., 2012	H1	SA_1
CW34_K	JQ582935	Sudáfrica	*Xenopus laevis*	Schloegel *et al*., 2012	H81	SA_1
CW34_L	JQ582916	Sudáfrica	*Xenopus laevis*	Schloegel *et al*., 2012	H11	SA_4
CW34_M	JQ582940	Sudáfrica	*Xenopus laevis*	Schloegel *et al*., 2012	H12	SA_6
CW34_N	JQ582929	Sudáfrica	*Xenopus laevis*	Schloegel *et al*., 2012	H79	SA_7
CW34_O	JQ582928	Sudáfrica	*Xenopus laevis*	Schloegel *et al*., 2012	H79	SA_7
CW34_P	JQ582915	Sudáfrica	*Xenopus laevis*	Schloegel *et al*., 2012	H1	SA_1
CW34_Q	JQ582905	Sudáfrica	*Xenopus laevis*	Schloegel *et al*., 2012	H74	SA_5
CW34_R	JQ582921	Sudáfrica	*Xenopus laevis*	Schloegel *et al*., 2012	H80	SA_1
CW34_S	JQ582920	Sudáfrica	*Xenopus laevis*	Schloegel *et al*., 2012	H79	SA_7
CW34_T	JQ582937	Sudáfrica	*Xenopus laevis*	Schloegel *et al*., 2012	H1	SA_1
CW34_U	JQ582922	Sudáfrica	*Xenopus laevis*	Schloegel *et al*., 2012	H81	SA_1

*Este número de acceso se refiere al genoma completo de esta cepa (Broad Institute).
S/N No tiene código de acceso al GenBank.
S/N** No tiene código de acceso al GenBank. Las secuencias se publicaron como información suplementaria.
N_h Código asigando a cada haplotipo en el presente estudio.
N_f Código asignado a la agrupación en la filogenia en el presente estudio.

Tabla 9. Frecuencias de los haplotiposde la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal de*Batrachochytrium dendrobatidis*en los diferentes países.

Haplotipo	País										
	Ecuador	Brasil	Japón	China	Panamá	Perú	Bélice	Sudáfrica	Italia	EEUU	Total
H1	68	1	1	1	1	1	8	4	14	10	109
H2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4
H3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
H4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
H5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
H6	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	3
H7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
H8	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2
H9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H11	2	0	0	1	0	0	1	1	0	0	5
H12	0	0	1	1	0	0	2	2	0	1	6
H13	0	0	1	1	0	0	6	1	0	0	9
H14	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	2
H15	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2
H16	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3
H17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
H18	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2
H19	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H20	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H21	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H22	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H23	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H24	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H25	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H26	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	3
H27	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H28	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H29	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H30	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H31	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H32	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H33	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H34	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H35	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H36	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H37	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H38	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H39	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
H40	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1

Tabla 9. Continuación.

Haplotipo	País										
	Ecuador	Brasil	Japón	China	Panamá	Perú	Bélice	Sudáfrica	Italia	EEUU	Total
H41	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H42	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H43	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H44	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2
H45	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H46	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H47	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H48	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H49	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H50	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H51	0	3	1	0	0	0	0	0	0	1	5
H52	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H53	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H54	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H55	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H56	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H57	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H58	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H59	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H60	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H64	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
H65	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H66	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H67	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H68	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	3
H69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
H71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H73	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H74	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
H75	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
H76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4
H77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H78	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H79	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5
H80	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
H81	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3
H82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1

Tabla 9. Continuación.

Haplotipo	País										
	Ecuador	Brasil	Japón	China	Panamá	Perú	Bélice	Sudáfrica	Italia	EEUU	Total
H83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H86	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H91	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
H99	0	0	1	0	0	0	0	0	0		1
Total	85	15	26	30	1	1	22	20	14	48	262

Tabla 10. Análisis molecular de la varianza (AMOVA) de los haplotipos dela región ITS1-5.8S de ADN ribosomal de*Batrachochytrium dendrobatidis* entre países.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Φ_{PT}	P≥
Entre poblaciones	9	249.530	0.993	20	0.199	0.002
Dentro de poblaciones	251	1001.853	3.991	80		
Total	260	1251.383	4.985			

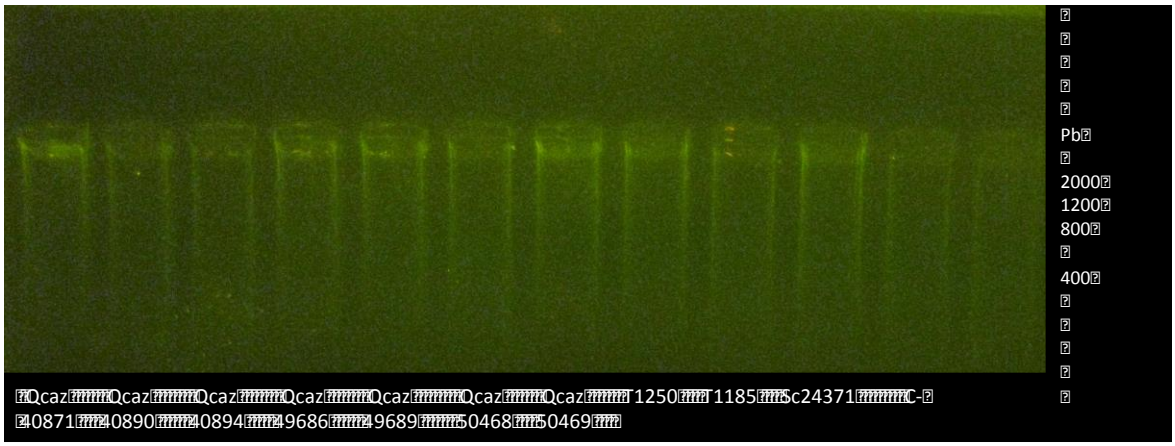
Se realizaron 999 permutaciones.

Tabla 11. Distancias genéticas de Nei de los haplotipos de la región ITS1-5.8S de ADN ribosomalde *Batrachochytrium dendrobatidis* entre países.

Belice	Brasil	China	**Ecuador**	Italia	Japón	Sudáfrica	EEUU	
								Belice
0,035								Brasil
0,002	0,031							China
0,004	0,035	0,002						**Ecuador**
0,004	0,035	0,002	0,000					Italia
0,012	0,012	0,009	0,013	0,014				Japón
0,013	0,031	0,007	0,012	0,012	0,013			Sudáfrica
0,010	0,011	0,007	0,009	0,010	0,003	0,012		EEUU

11. ANEXOS

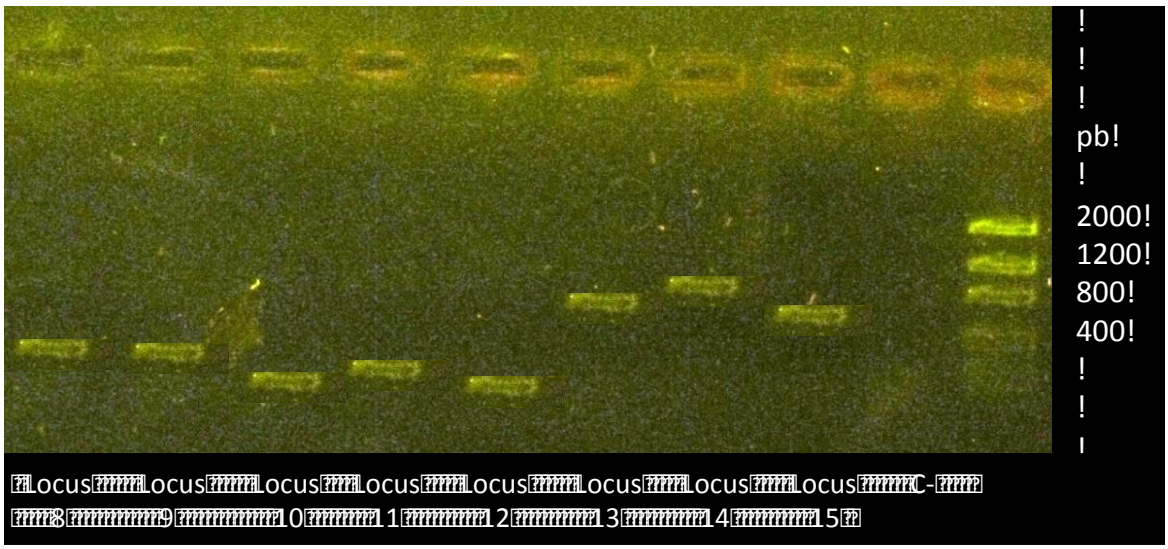
Anexo 1. Muestras de ADN de *Batrachochytrium dendrobatidis* corridas en gel de agarosa que presentaron degradación del ADN.



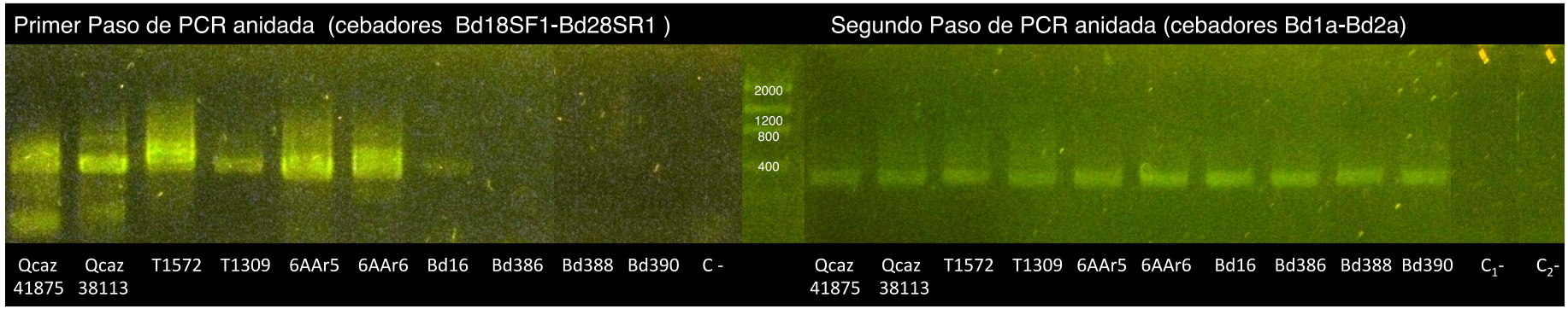
Anexo 2. Características de los cebadores utilizados para la amplificación de los 8 loci nucleares de *Batrachochytrium dendrobatidis.* (Tomado de Morgan *et al.,* 2007).

Locus	Nombre	Tamaño	Alelos	Cebadores
8	8009X2	342	2	F-5´-TCGTGAAGAGCTTGGAAAGTCG-3´/ R-5´-AGTTCTGTCGTCAATGCTGTAGGG-3´
9	8329X2	336	2	F-5´-CTGAATCTTGCCTCGTCTAGTAGC-3´/R-5´-TATCAAGGTCTTTTGGCAAGACCG-3´
10	8392X2	261	2	F-5´-CATCGGGTTTGTCATTGCCTGC-3´/ R-5´-TATGGCATGTGGTCTACTCTGTCC-3´
11	8667Y2	289	2	F-5´-AAGTGTAGACATGGCACCCGAGTT-3´/R-5´-ATACATGTACAAGACCAAGAAGGTCG-3´
12	8702X2	245	2	F-5´-GGATCTGCCAGTTTCGATCTACTCG-3´/R-5´-GAATATGGCATGGGAGAAGTAGCC-3´
13	ctsynl	553	2	F-5´-ACCAACTATAACATCATCAAG-3´/R-5´-CGAATATCAGTCAACGCAAGC-3´
14	lsu35(cy)	668	2	F-5´-ATCCCTGTGGTAACTTTTCTG-3´/R-5´-ACGGACATGGGGAATCTGACT-3´
15	r6046	496	2	F-5´-CTATCTGCGCTCCCGTGTCAA-3´/ R-5´-AGGGCTGCAACAACTGGATTT-3´

Anexo 3. Muestras de ADN de *Batrachochytrium dendrobatidis* amplificadas para los SNP de los 8 loci nucleares. Las muestras corresponden a la cepa JEL 423, utilizada como control positivo. Se incluyó un control negativo (C-).



Anexo 4. Muestras de ADN de *Batrachochytrium dendrobatidis* amplificadas para la región ITS1-5.8S de ADN ribosomal. Se incluyeron los controles negativos (C- para el primer paso de PCR y C_1- y C_2- para el segundo paso).



Anexo 5. Secuencias de los haplotipos de la región ITS-5.8S de ADN ribosomal de *Batrachochytrium dendrobatidis*encontrados en Ecuador. Los números corresponden a los haplotipos que se encuentran en la red de haplotipos de la Figura 4 y en la Tabla 1.

Haplotipo H1

AGTCGAAC--AAAATTTATTTATTTTTTCGACAAAT-TAATTGGAAATTGAA--TAAT------T
TAA-T---TGAAAAAA-----ATTGAAAATAAATATTA-AAAACAACTTTTGACAACGGATCTC
TTGGCTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA-CGTAATGTGAATTGCA
AACCTTTGTGAATCATTAAATCTTTGAACGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACAT
GTTTGAGAATTATAA

Haplotipo H2

----------AAAATTTATTTATTTTTTCGACAAAT-TAATTGGAAATTGAA--TAAT------TTAA-T-
--TGAAAAAA-----ATTGAAAATAAATATTA-AAAACAACTTTTGACAACGGATCTCTTGGC
TCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA-CGTAATGTGAATTGCAAACCTT
TGTGAATCATTAAATCTTTGAACGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGA
GAATTATAA

Haplotipo H3

AGTCGAAC--AAAATTTATTTATTTTTTCGACAAAT-TAATTGGAAATTGAA--TAAT----TTT
AA-T---TGA----------ATTGAAAATAAATATTAAAAACAACTTTTGACAACGGATCTCTTGG
CTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA-CGTAATGTGAATTGCAAACCT
TTGTGAATCATTAAATCTTTGAACGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGA
GAATTATAA

Haplotipo H4

AGTCGAAC--AAAATTTATTTATTTTTTCGACAAAT-TAATTGGAAATTGA----------TTAA-
T---TGAAAAAA-----ATTGAAAATAAATATTA-AAAACAACTTTTGACAACGGATCTCTTGG
CTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA-CGTAATGTGAATTGCAAACCT
TTGTGAATCATTAAATCTTTGAACGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGA
GAATTATAA

Haplotipo H5

AGTCGAAC--AAAATTTATTTATTTTTTCGACAAAT-TAATTGGAAATTGAA--TAAT------
TTAA-T---TGAAAAAA-----ATTGAAAATAAATATTA-AAAACAACTTTTGACAACGGATCT
CTTGGCTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGGTACGTAATGTGAATTGCA
AACCTTTGTGAATCATTAAATCTTTGAACGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACAT
GTTTGAGAATTATAA
Haplotipo H6

AGTCGAAC--AAAATTTATTTATTTTTTCGACAAAT-TAATTGGAAATTGAA--TAAT------
TTAA-T---TGAAAAAAA----ATTGAAAATA--------AAAACAACTTTTGACAACGGATCTCTT
GGCTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA-CGTAATGTGAATTGCAAA
CCTTTGTGAATCATTAAATCTTTGAACGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTT
TGAGAATTATAA

Haplotipo H7

AGTCGAAC--AAAATTTATTTATTTTTTCGACA-----AATTGGAAATTGAA--TGAT-----TTAA
-T---TGAAAAAA-----ATTGAAAATAAATATTA-AAAACAACTTTTGACAACGGATCTCTTG
GCTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA-CGTAATGTGAATTGCAAAC
CTTTGTGAATCATTAAATCTTTGAACGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTT
GAGAATTATAA

Haplotipo H8

AGTCGAAC--AAAATTTATTTATTTTTTCGACAAAT-TAATTGGAAATTTAA--TAAT------
TTAA-T---TGAAAAAA-----ATTGAAAATAAATATTA-AAAACAACTTTTGACAACGGATCT
CTTGGCTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA-CGTAATGTGAATTGC
AAACCTTTGTGAATCATTAAATCTTTGAACGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACA
TGTTTGAGAATTATAA

Haplotipo H9

AGTCGAAC--AAAATTTATTTATTTTTTCGAC---T-TAATTGGAAATTGAA--TAAT-----TTA
A-T---TGAAAAAA-----ATTGAAAATAAATATTA-AAAACAACTTTTGACAACGGATCTCTT
GGCTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA-CGTAATGTGAATTGCAAA
CCTTTGTGAATCATTAAATCTTTGAACGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTT
TGAGAATTATAA

Haplotipo H10

AGTCGAAC--AAAAT--------TTTTTCGACAAAT-TAATTGGAAATTGAA--TAA------TTAAAT
---TGAAAAAA-----ATTGAAAATAAATATTA-AAAACAACTTTTGACAACGGATCTCTTGG
CTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA-CGTAATGTGAATTGCAAACC
TTTGTGAATCATTAAATCTTTGAACGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTG
AGAATTATAA

Haplotipo H11

AGTCGAAC--AAAATTTATTTATTTTTTCGACAAAT-TAATTGGAAATTGAA--TAAT------
TTAA-T---TGAAAAAAA----ATTGAAAATAAATATTA-AAAACAACTTTTGACAACGGATCT
CTTGGCTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA-CGTAATGTGAATTGC
AAACCTTTGTGAATCATTAAATCTTTGAACGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACAT
GTTTGAGAATTATAA

Anexo 6. Categorías de amenaza y modo reproductivo de las especies de anfibios hospederas de las muestras de *Batrachochytrium dendrobatidis*analizadas. CR = Peligro crítico, EN = En peligro, VU = Vulnerable, LC = Preocupación menor, DD = Datos insuficientes.

Familia	Especie	Puesta[◆]	Larva[◆]	Status global[•]	Status Ecuador[•]
Bufonidae	*Atelopus exiguus*	Acuática	arroyo	CR	CR
	Atelopus sp.	Acuática	arroyo		
	Osornophryne guacamayo	Terrestre	desarrollo directo	EN	EN
	Raebo cf. *glaberrimus*	Terrestre	arroyo lento	-	-
Craugastoridae	*Pristimantis achatinus*	Terrestre	desarrollo directo	LC	LC
	Pristimantis aureolineatus	Arborícola	desarrollo directo	LC	DD
	Pristimantis calcarulatus	Arborícola	desarrollo directo	VU	LC
	Pristimantis conspicillatus	Terrestre	desarrollo directo	-	LC
	Pristimantis curtipes	Terrestre	desarrollo directo	LC	LC
	Pristimantis festae	Terrestre	desarrollo directo	EN	LC
	Pristimantis kirklandi	Terrestre	desarrollo directo	-	EN
	Pristimantis lanthanites	Terrestre	desarrollo directo	-	LC
	Pristimantis leoni	Terrestre	desarrollo directo	LC	LC
	Pristimantis ockendeni	Terrestre	desarrollo directo	LC	LC
	Pristimantis sp.	Terrestre	desarrollo directo	-	-
	Pristimantis waoranii	Terrestre	desarrollo directo	DD	DD
Dendrobatidae	*Hyloxalus jacobuspetersi*	Terrestre	arroyo	CR	CR
Hemiphractidae	*Gastrotheca litonedis*	Marsupio	charca	EN	EN
	Gastrotheca pseustes	Marsupio	charca	EN	EN
	Gastrotheca riobambae	Marsupio	charca	EN	VU
	Gastrotheca sp.	Marsupio	charca	-	-
Hylidae	*Agalychnis spurrelli*	Arborícola	charca, troncos huecos	LC	LC
Leptodactylidae	*Engystomops petersi*	Terrestre	charca, arroyos lentos	LC	LC

Anexo 6. Continuación.

Familia	Especie	Puesta◆	Larva◆	Status global•	Status Ecuador•
Leptodactylidae	*Leptodactylus discodactylus*	Terrestre	charca	LC	LC
	Leptodactylus pentadactylus	Terrestre	charca-nido	LC	LC
	Leptodactylus rhodomystax	Terrestre	charca	LC	LC
Microhylidae	*Nelsonophryne aequatorialis*		charca	LC	CR
Plethodontidae	*Bolitoglosssa peruviana*	Arborícola	desarrollo directo	LC	LC

◆ Según Ron *et al.* 2012

• *Status* en Ecuador: Ron *et al*., 2008; *status* global: UICN, 2012.

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, María del Carmen Vizcaíno Barba, C.I. 170877293-2 autora del trabajo de graduación intitulado: “Estructuración genética de muestras del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* en 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 integrado 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 del 2012

Sra. María del Carmen Vizcaíno Barba

C:I: 170877293-2