PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Determinación de la infección de *Batrachochytrium dendrobatidis* en el Cutín de Quito (*Pristimantis unistrigatus*) y su relación con la infección en renacuajos de la Rana Marsupial de Quito (*Gastrotheca riobambae*) en el Parque Metropolitano Guangüiltagua de Quito.

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en

Ciencias Biológicas

DAVID ANDRÉS NARVÁEZ NARVÁEZ

Quito, 2014

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del candidato David Andrés Narváez Narváez ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Lcdo. Andrés Merino-Viteri

Director de la Disertación

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mis padres, por su apoyo y ayuda incondicional que me dieron para poder realizar este trabajo de investigación.

De igual manera a Vanessa Avilés, por su solidaridad infaltable durante todo el trabajo, tanto en el campo como en el laboratorio.

A mi gran amigo y mentor en el aspecto molecular, Alejandro Cabrera, que sin él este trabajo no se hubiera logrado realizar.

A mi amigo Andrés Calero, por ayudarme a colectar los individuos en casi todos los muestreos realizados.

A la Administración del Parque Metropolitano Guangüiltagua de Quito, perteneciente a la Unidad de Espacio Público de la EPMMOP, por autorizar y facilitar los ingresos al parque en la noche.

Un especial agradecimiento al Dr. César Paz y Miño, por permitirme trabajar en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad de las Américas (UDLA) y prestarme los equipos para poder realizar el trabajo de investigación. De igual manera, a las personas que conforman la UDLA y el IIB, quienes siempre me brindaron su apoyo, ánimo y facilidades para sacar adelante el proyecto (Maira Rojas, Janeth Proaño, Janeth Terraza, Gina Cuenca, Paola Leone, Ma. Eugenia Sánchez, Germán Burgos, Andrés López, Gabriela Jaramillo, Francisco Ramírez y Fabián Porras).

De igual forma agradecer al personal de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, quienes aportaron con un granito para que el trabajo haya salido adelante

(Gabriela Castillo del Laboratorio Molecular de Anfibios, especial agradecimiento al Ing. Julio Sánchez del Laboratorio de Biometría, a la Dra. Ma. Eugenia Ordóñez y al Dr. Santiago Ron).

Igualmente agradecer al proyecto “Dándole continuidad a la Balsa de los Sapos” financiado por la Dirección General Académica de la PUCE, por haber financiado algunos de los reactivos utilizados en este trabajo.

Finalmente, agradecer al Lcdo. Andrés Merino-Viteri, por su ayuda en las correcciones y revisiones para que este trabajo haya quedado finalizado.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS ..... **iv**

TABLA DE CONTENIDOS ..... **vi**

LISTA DE FIGURAS ..... **x**

LISTA DE TABLAS ..... **xi**

LISTA DE ANEXOS ..... **xiii**

1. RESUMEN **1**

2. ABSTRACT **3**

3. INTRODUCCIÓN **5**

3.1 DECLINACIÓN DE ANFIBIOS A NIVEL MUNDIAL 5

3.2 LA QUITRIDIOMICOSIS 6

3.2.1 HONGO PATÓGENO *Batrachochytrium dendrobatidis* 6

3.2.2 *Batrachochytrium dendrobatidis* EN EL ECUADOR 11

3.3 ÁREA DE ESTUDIO 12

3.4 OBJETIVOS 13

3.4.1 OBJETIVO GENERAL 13

3.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 14

4. MATERIALES Y MÉTODOS **15**

4.1 MUESTREOS EN EL PARQUE METROPOLITANO GUANGÜILTAGUA DE QUITO 15

4.2 TOMA DE MUESTRAS DE *Batrachochytrium dendrobatidis* 15

4.2.1 TOMA DE MUESTRAS DE RENACUAJOS DE LA RANA MARSUPIAL DE QUITO (*Gastrotheca riobambae*)…….. .16

4.2.2 TOMA DE MUESTRAS DE CUTINES DE QUITO (*Pristimantis unistrigatus*)..... 17

4.2.3 TOMA DE MUESTRAS OCASIONALES DE METAMORFOS DE LA RANA MARSUPIAL DE QUITO (*Gastrotheca riobambae*)…….....18

4.3 RECOLECCIÓN DE DATOS AMBIENTALES..... 18

4.4 EXTRACCIÓN DE ADN..... 18

4.5 ANÁLISIS DE DIAGNÓSTICO DE *Batrachochytrium dendrobatidis*..... 19

4.5.1 CURVA ESTÁNDAR…….. 20

4.6 NIVELES DE INFECCIÓN POR *Batrachochytrium dendrobatidis*..... 20

4.7 PREVALENCIA DE *Batrachochytrium dendrobatidis*..... 21

4.8 ANÁLISIS DE DATOS..... 21

4.8.1 COMPARACIÓN ENTRE LAS DOS TÉCNICAS MOLECULARES Y TIPOS DE MUESTRAS……... .22

4.8.2 NIVELES DE INFECCIÓN DE CUTINES DE QUITO (*Pristimantis unistrigatus*) CON RESPECTO A LA DISTANCIA HACIA LA POZA.....22

4.8.3 NIVELES DE INFECCIÓN vs. PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD 22

4.8.4 RELACIÓN ENTRE EL PROMEDIO DE INFECCIÓN Y LA PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD CON FACTORES AMBIENTALES (TEMPERATURA Y PRECIPITACIÓN)……....23

5. RESULTADOS 24

5.1 RENACUAJOS DE LA RANA MARSUPIAL DE QUITO (*Gastrotheca riobambae*)..... 24

5.1.1 TEJIDO APARATOS BUCALES..... 24

5.1.2 HISOPOS APARATOS BUCALES..... 25

5.2 CUTINES DE QUITO (*Pristimantis unistrigatus*) 26

5.3 RANAS MARSUPIALES DE QUITO (*Gastrotheca riobambae*)..... 27

5.4 COMPARACIÓN DE TÉCNICAS: PCR DE PUNTO FINAL vs. q-PCR 27

5.5 NIVELES DE INFECCIÓN POR *Batrachochytrium dendrobatidis* 29

5.6 PREVALENCIA DE *Batrachochytrium dendrobatidis* 30

5.7 PROMEDIO DE INFECCIÓN vs. PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD..... 31

5.8 NIVELES DE INFECCIÓN Y PREVALENCIA ENTRE LAS DOS ESPECIES DE ANUROS..... 31

5.9 NIVELES DE INFECCIÓN DE CUTINES DE QUITO (*Pristimantis unistrigatus*) EN RELACION A LA DISTANCIA HACIA LA POZA..... 31

5.10 PROMEDIO DE INFECCIÓN Y PREVALENCIA vs. FACTORES AMBIENTALES 32

6. DISCUSIÓN..... 34

6.1 COMPARACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES (PCR vs. q-PCR)..... 34

6.1.1 FALSOS NEGATIVOS..... 37

6.2 NIVELES DE INFECCIÓN POR *Batrachochytrium dendrobatidis* 39

6.2.1 NIVELES DE INFECCIÓN POR *Bd* EN RENACUAJOS DE LA RANA MARSUPIAL DE QUITO (*Gastrotheca riobambae*) Y EN CUTINES DE QUITO (*Pristimantis unistrigatus*)..... 39

6.3 PREVALENCIA DE *Batrachochytrium dendrobatidis* 42

6.3.1 PREVALENCIA DE *Bd* EN RENACUAJOS DE LA RANA MARSUPIAL DE QUITO (*Gastrotheca riobambae*) Y EN CUTINES DE QUITO (*Pristimantis unistrigatus*)…….. 42

6.4 DISTANCIA HACIA LA POZA Y LOS NIVELES DE INFECCIÓN DE LAS CUTINES DE QUITO (*Pristimantis unistrigatus*) 44

6.5 PROMEDIO DE INFECCIÓN vs. PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD EN LAS DOS ESPECIES DE ANUROS ESTUDIADOS..... 45

6.6 PROMEDIO DE INFECCIÓN Y PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD CON FACTORES AMBIENTALES..... 47

6.6.1 PROMEDIO DE INFECCIÓN vs. TEMPERATURA…… 47

6.6.2 PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD vs. TEMPERATURA…… 49

6.6.3 RELACIÓN ENTRE EL PROMEDIO DE INFECCIÓN Y LA PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD CON LA PRECIPITACIÓN…….....52

7. CONCLUSIONES 54

8. RECOMENDACIONES 56

9. LITERATURA CITADA.....57

10. FIGURAS 70

11. TABLAS 78

12. ANEXOS 86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sitio de Estudio. Poza del Parque Metropolitano de Guangüiltagua de Quito. 70

Figura 2. Renacuajo de la Rana Marsupial de Quito (*Gastrotheca riobambae*). 70

Figura 3. Cutín de Quito (*Pristimantis unistrigatus*)..... 71

Figura 4. Toma de muestras por medio de hisopos a *Pristimantis unistrigatus*. 71

Figura 5. Curva Estándar a partir de Ct's.. 72

Figura 6. Resultado de q-PCR de 96 muestras desconocidas..... 72

Figura 7. Fotografía de gel de agarosa 3% 73

Figura 8. Comparación de los niveles de infección por *Bd* en diferentes estadios larvarios de *Gastrotheca riobambae* 73

Figura 9. Comparación de los niveles de infección por *Bd* en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* a lo largo del tiempo de muestreo..... 74

Figura 10. Comparación de los niveles de infección por *Bd* en *Pristimantis unistrigatus* a lo largo del tiempo de muestreo..... 74

Figura 11. Correlación entre la distancia hacia la poza y los niveles de infección de *Pristimantis unistrigatus*..... 75

Figura 12. Regresión entre el promedio de infección de *Gastrotheca riobambae* vs. temperatura media de la poza..... 76

Figura 13. Regresión entre la prevalencia de *Bd* en renacuajos *Gastrotheca riobambae* vs. temperatura máxima de la poza 77

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Prevalencia de *Bd* en las dos especies de anuros estudiadas. 78

Tabla 2. Prevalencia de *Bd* mediante PCR de punto final y q-PCR con muestras de tejido e hisopos de renacuajos de *Gastrotheca riobambae.* 78

Tabla 3. Renacuajos de *Gastrotheca riobambae* positivos para *Bd* en todos los ensayos realizados. 79

Tabla 4. Carga de zoosporas en los diferentes grupos de estadios larvarios de *Gastrotheca riobambae.* 81

Tabla 5. Niveles de infección en los diferentes grupos de estadios larvarios de *Gastrotheca riobambae.* 81

Tabla 6. Prevalencia de *Bd* en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* por muestreo..... 81

Tabla 7. Prevalencia de *Bd* en *Pristimantis unistrigatus* por muestreo. 82

Tabla 8. Prevalencia y promedio de infección de *Bd* en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* por mes. 83

Tabla 9. Prevalencia y promedio de infección de *Bd* en *Pristimantis unistrigatus* por mes. 83

Tabla 10. Carga de zoosporas en *Pristimantis unistrigatus* con relación a la distancia de la poza. 84

Tabla 11. Niveles de infección en *Pristimantis unistrigatus* con relación a la distancia de la poza. 84

Tabla 12. Regresión entre el promedio de infección en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* vs. temperatura de la poza. 84

Tabla 13. Regresión entre la prevalencia de *Bd* en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* vs. temperatura de la poza. 84

Tabla 14. Regresión entre el promedio de infección en *Pristimantis unistrigatus* vs. temperatura ambiente. 85

Tabla 15. Regresión entre la prevalencia de *Bd* en *Pristimantis unistrigatus* vs. temperatura ambiente. 85

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Valores de precipitación por mes obtenidos de los boletines mensuales meteorológicos del "Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología" 86

Anexo 2. Protocolo para la extracción de ADN para la identificación del quítrido *Bd* 87

Anexo 3. Condiciones para realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de punto final para la identificación del quítrido *Bd* 88

Anexo 4. Condiciones para realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (q-PCR) para la identificación del quítrido *Bd* 89

Anexo 5. Resultado de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar si los datos de prevalencia por *Bd* en muestras de tejido entre las dos técnicas moleculares se encuentran distribuidos normalmente 90

Anexo 6. Resultado de la prueba de t-student para la comparación entre las dos técnicas moleculares utilizando muestras de tejido de aparatos bucales. 90

Anexo 7. Resultado de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar si los datos de prevalencia por *Bd* en muestras de hisopos entre las dos técnicas moleculares se encuentran distribuidos normalmente 91

Anexo 8. Resultado de la prueba de Wilcoxon para la comparación entre las dos técnicas moleculares utilizando hisopos de aparatos bucales 91

Anexo 9. Resultado de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar si los datos de prevalencia por *Bd* entre muestras de tejido de aparatos bucales y muestras tomadas por hisopos utilizando q-PCR se encuentran distribuidos normalmente. 92

Anexo 10. Resultado de la prueba de t-student para la comparación entre muestras de tejido de aparatos bucales vs. muestras tomadas por hisopos utilizando q-PCR 92

Anexo 11. Resultado de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar si los datos de niveles de infección por *Bd* en los estadios larvarios de *Gastrotheca riobambae* se encuentran distribuidos normalmente 93

Anexo 12. Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de los promedios de niveles de infección por *Bd* en diferentes estadios larvarios de *Gastrotheca riobambae*). 93

Anexo 13. Resultado de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar si los datos de niveles de infección por *Bd* en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* se encuentran distribuidos normalmente 94

Anexo 14. Resultado de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar si los datos de niveles de infección por *Bd* en *Pristimantis unistrigatus* se encuentran distribuidos normalmente 94

Anexo 15. Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de los promedios de niveles de infección por *Bd* en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* a lo largo del tiempo de muestreo 95

Anexo 16. Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de los promedios de niveles de infección por *Bd* en *Pristimantis unistrigatus* a lo largo del tiempo de muestreo 95

Anexo 17. Resultado de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar si los datos de prevalencia por *Bd* en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* se encuentran distribuidos normalmente 96

Anexo 18. Resultado de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar si los datos de prevalencia por *Bd* encontrada en *Pristimantis unistrigatus* se encuentran distribuidos normalmente 96

Anexo 19. Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de la prevalencia de *Bd* en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* a lo largo del tiempo de muestreo..... 97

Anexo 20. Comparación de la prevalencia de *Bd* en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* a lo largo del tiempo de muestreo 97

Anexo 21. Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de la prevalencia de *Bd* en *Pristimantis unistrigatus* a lo largo del tiempo de muestreo 98

Anexo 22. Comparación de la prevalencia de *Bd* en *Pristimantis unistrigatus* a lo largo del tiempo de muestreo..... 98

Anexo 23. Resultado de la prueba de regresión lineal para la correlación entre el promedio de infección vs. la prevalencia de *Bd* en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* a lo largo del tiempo de muestreo 99

Anexo 24. Regresión entre el promedio de infección vs. la prevalencia de *Bd* en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* 99

Anexo 25. Resultado de la prueba de regresión lineal para la correlación entre el promedio de infección vs. la prevalencia de *Bd* en *Pristimantis unistrigatus* a lo largo del tiempo de muestreo..... 100

Anexo 26. Rregresión entre el promedio de infección vs. la prevalencia de *Bd* en *Pristimantis unistrigatus* 100

Anexo 27. Resultado de la prueba de regresión lineal para la correlación de los promedios de infección entre las dos especies de anuros estudiados (*G. riobambae* y *P. unistrigatus*)..... 101

Anexo 28. Regresión de los promedios de infección entre las dos especies de anuros estudiados (*G. riobambae* y *P. unistrigatus*)..... 101

Anexo 29. Resultado de la prueba de regresión lineal para la correlación de la prevalencia de la enfermedad entre las dos especies de anuros estudiados (*G. riobambae* y *P. unistrigatus*)..... 102

Anexo 30. Regresión de la prevalencia de la enfermedad entre las dos especies de anuros estudiados (*G. riobambae* y *P. unistrigatus*) 102

Anexo 31. Resultado de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar si los datos de la distancia hacia la poza y los niveles de infección por *Bd* en *Pristimantis unistrigatus* se encuentran distribuidos normalmente 103

Anexo 32. Resultado de la prueba de Spearman para la correlación entre la distancia hacia la poza (m) y los niveles de infección por *Bd* en *Pristimantis unistrigatus* 103

Anexo 33. Resultado de la prueba de U de Mann-Whitney para la comparación de los individuos, positivos y negativos para *Bd*, de *Pristimantis unistrigatus* con respecto a la distancia de la poza 104

Anexo 34. Regresión entre el promedio de infección en *Pristimantis unistrigatus* vs. temperatura máxima 104

Anexo 35. Regresión entre el promedio de infección en *Pristimantis unistrigatus* vs. temperatura media 105

Anexo 36. Regresión entre el promedio de infección en *Pristimantis unistrigatus* vs. temperatura mínima..... 105

Anexo 37. Regresión entre la prevalencia de *Bd* en *Pristimantis unistrigatus* vs. temperatura máxima 106

Anexo 38. Regresión entre la prevalencia de *Bd* en *Pristimantis unistrigatus* vs. temperatura media 106

Anexo 39. Regresión entre la prevalencia de *Bd* en *Pristimantis unistrigatus* vs. temperatura mínima 107

Anexo 40. Resultado de la prueba de regresión lineal para la correlación entre el promedio de infección en *Pristimantis unistrigatus* vs. precipitación 107

Anexo 41. Regresión entre el promedio de infección en *Pristimantis unistrigatus* vs. precipitación 108

Anexo 42. Resultado de la prueba de regresión lineal para la correlación entre la prevalencia en *Pristimantis unistrigatus* vs. precipitación 108

Anexo 43. Regresión entre la prevalencia de *Bd* en *Pristimantis unistrigatus* vs. precipitación 109

1. RESUMEN

El hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd)* se ha convertido en una de las más serias amenazas para las poblaciones de anfibios a nivel mundial.

Un estudio realizado previamente determinó la presencia de *Bd* en una poza del Parque Metropolitano Guangüiltagua de Quito en renacuajos de la Rana Marsupial de Quito (*Gastrotheca riobambae*). Este estudio buscó determinar si los renacuajos de *G. riobambae* continuaban infectados, y de estarlos, determinar la presencia de quitridiomicosis en otra especie de rana que también habita en el parque, el Cutín de Quito (*Pristimantis unistrigatus*). De encontrar individuos positivos, relacionarlos con los niveles de infección de *G. riobambae.* Adicionalmente, se utilizó dos tipos de técnicas moleculares de PCR (punto final y tiempo real) para el diagnóstico de *Bd*, con el fin de establecer sus diferencias y efectividad en la detección del ADN fúngico con los diferentes tipos de muestras tomadas.

Se realizaron muestreos seriados alrededor de la poza, por un periodo de un año entre septiembre de 2012 y agosto de 2013. Se tomaron muestras (por medio de hisopos) de la piel de *P. unistrigatus* y del aparato bucal de renacuajos de *G. riobambae*. En el caso de los renacuajos de *G. riobambae* también se utilizó el tejido del aparato bucal.

Se encontró que las dos especies de ranas se encuentran infectadas con el hongo quítrido. De 382 individuos de *P. unistrigatus*, 57 resultaron positivos para *Bd* (prevalencia del 15%). Igualmente, entre 135 individuos de *G. riobambae* se encontró 53 positivos (prevalencia del 39%).

El individuo con la mayor cantidad de zoosporas tuvo 7556 zoosporas/µL ($\bar{x}$= 556.04 ± 1426.1) y un nivel de infección de 459 zoosporas/mm ($\bar{x}$= 29.27 ± 78.77)

de la población de *P. unistrigatus* estudiada. Los dos tipos de muestra (tejido e hisopos), provenientes de aparatos bucales, presentaron diferencias en la carga de zoosporas/µL ($\bar{x}$= 2977.7 ± 9215.6 vs. $\bar{x}$= 929.5 ± 3653.9).

No se encontró relación entre los niveles de infección entre las dos especies, pero se encontró una correlación de la temperatura mensual máxima y media, tanto de la poza como del ambiente, en los niveles de infección por *Bd* y prevalencia de la enfermedad de las dos especies estudiadas (*P. unistrigatus* y renacuajos de *G. riobambae*).

La técnica de PCR en tiempo real (q-PCR) mostró una sensibilidad de diagnóstico diferente a la técnica de PCR de punto final.

Esta es la primera vez que se determina la presencia de *Bd* en una población de *P. unistrigatus*. Posiblemente los individuos están de alguna manera en contacto con el hongo vía el agua de la poza o juveniles y adultos de *G. riobambae* infectados.

Palabras Claves: *Gastrotheca riobambae*, *Pristimantis unistrigatus*, Quitridiomicosis, Técnicas moleculares diagnóstico.

2. ABSTRACT

The pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) has become one of the most serious threats to amphibian populations worldwide.

A previous study determined the presence of *Bd* in a pond of Quito's Metropolitan Guangüiltagua Park in tadpoles of Quito's Marsupial Frog (*Gastrotheca riobambae*). This study sought to determine whether the tadpoles of *G. riobambae* are still infected, and if they are infected, determine the presence of chytridiomycosis in other frog that also inhabits the park, the Quito Rain-Peeper frog (*Pristimantis unistrigatus*). If we find positive individuals, relate its infection levels with *G. riobambae*. In addition, we used two types of PCR's molecular techniques (real-time and end-point) for the diagnosis of *Bd*, in order to establish their effectiveness and differences in detection of fungal DNA with different types of samples that we used.

Serial sampling around the pond was conducted for a period of one year between September 2012 and August 2013. Samples were taken (through swabs) of the skin of *P. unistrigatus* and mouthparts of tadpoles of *G. riobambae*. For tadpoles of *G. riobambae* their mouthparts tissue were also used.

We found that the two species of frogs are infected with chytrid fungus. From 382 individuals of *P. unistrigatus*, 57 were positive for *Bd* (prevalence of 15%). Likewise, between 135 individuals of *G. riobambae*, 53 (39% prevalence) were positive.

The individual with the largest amount of zoospores had 7556 zoospores/µL ($\bar{x}$= 556.04 ± 1426.1) and an infection level of 459 zoospores/mm ($\bar{x}$= 29.27 ± 78.77) in the population of *P. unistrigatus* studied. The two types of sample (tissue and swabs) from

mouthparts showed differences in the zoospores/µL loads ($\bar{x}$= 2977.7 ± 9215.6 vs. $\bar{x}$= 929.5 ± 3653.9).

No relationship between infection levels between the two species was found, but we found a correlation of the maximum mean monthly temperature in both, the pond and the environment, with the levels of *Bd* infection and disease prevalence of the two studied species (*P. unistrigatus* and tadpoles of *G. riobambae*).

The technique of real-time PCR showed a different diagnostic sensitivity of the endpoint PCR.

This is the first study that identifies the presence of *Bd* in a population of *P. unistrigatus*. Possibly individuals are somehow in contact with the fungus through water from the pond or juveniles and adults infected of *G. riobambae.*

Key words: Chytridiomycosis, Diagnostic molecular techniques, *Gastrotheca riobambae*, *Pristimantis unistrigatus*.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 DECLINACIÓN DE ANFIBIOS A NIVEL MUNDIAL

Durante las pasadas dos décadas, declinaciones significativas y extinciones de anfibios se han observado alrededor del mundo. Existen reportes de descensos poblacionales e inclusive extinciones de anuros en Australia, Centroamérica (Pounds y Crump, 1994; Berger *et al.,* 1998) Sudamérica (Ron *et al.,* 2003; Eterovick *et al.,* 2005; Menéndez-Guerrero y Graham, 2013) y en las regiones altas del oeste de los Estados Unidos (Drost y Fellers, 1996).

Estudios realizados por Houlahan *et al.,* (2000) señalan declinaciones poblacionales significativas durante el periodo de 1970–1997 en Norte América y sugieren que ha existido declinaciones recientes, especialmente en Norte América, Australia y Nueva Zelanda, dos regiones en las que la evidencia anecdótica de declinaciones está bien documentada.

De igual manera, se reportó declinaciones poblacionales en América Latina en la década de los 80s (Lips *et al.,* 2005). Las poblaciones de anfibios han estado disminuyendo desde hace varias décadas atrás (Houlahan *et al.,* 2000).

Actualmente, casi un tercio (32%) de las especies de anfibios del mundo están amenazadas o extintas (IUCN 2014). Se sabe que las poblaciones de al menos el 42% de todas las especies de anfibios están disminuyendo, lo que indica que en el futuro, se puede esperar que aumente el número de especies amenazadas; por el contrario, menos del uno

por ciento de las especies de anfibios a nivel mundial muestran aumentos en las poblaciones (IUCN 2014). Sin embargo, la mayoría de las disminuciones poblacionales de anfibios se debe a la pérdida de hábitat y a la sobreexplotación de los recursos por el hombre (Stuart *et al.*, 2004), pues en la actualidad afecta a cerca de 4000 especies a nivel mundial y es cuatro veces mayor que la siguiente amenaza más común (contaminación) (IUCN 2014).

Las evidencias existentes señalan, que el descenso en las poblaciones de anfibios se pueda deber a varias causas, como los cambios locales en el clima (Pounds *et al.*, 2006; Alford *et al.*, 2007; Bosch *et al.*, 2007), lluvia ácida (Beebee *et al.*, 1990), enfermedades (Berger *et al.*,1998; Lips *et al.*, 2003; Arnhem y Kiessling, 2006; Fisher *et al.*, 2009), aumento de la radiación UV-B (Blaustein *et al.*, 1998), polución y pesticidas (Hayes *et al*., 2002; McMahon *et al*., 2011), especies introducidas (Garwood *et al.*, 2010), comercio de ranas (Picco y Collins, 2008) o diversas combinaciones entre estos factores.

3.2 LA QUITRIDIOMICOSIS

3.2.1 HONGO PATÓGENO *Batrachochytrium dendrobatidis*

Una de las más serias amenazas para las poblaciones de anfibios a nivel mundial, es el hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Este hongo pertenece al phylum Chytridiomycota, clase Chytridiomycetes y orden Chytridiales, presentando características que los separan del resto de hongos quítridos (Longcore *et al.*, 1999). Presenta dos formas principales de vida: un esférico y sésil zoosporangio, y zoosporas flageladas móviles (Berger *et al.*, 2005; Arnhem y Kiessling, 2006). Las zoosporas móviles se adhieren al

sustrato y desarrollan rizoides que darán origen a los zoosporangios. Dentro del zoosporangio se forman las zoosporas y se liberan en el medio ambiente externo a través de tubos de descarga (Arnhem y Kiessling, 2006).

En muchas especies, la infección con este hongo causa una enfermedad que progresa rápidamente, llamada quitridiomicosis (Fisher *et al.,* 2009). Este patógeno se presenta en estructuras queratinizadas de animales post metamórficos infectados (piel) y en renacuajos (partes bucales) (Berger *et al*., 1998; Fellers, *et al*., 2001; Rachowicz y Vredenburg, 2004), infectando a las células en el estrato granuloso y en el estrato córneo de la epidermis superficial (Berger *et al.,* 2005). Los zoosporangios inmaduros se encuentran en la parte más profunda de la mayoría de células viables, mientras que los zoosporangios maduros y los vacíos se encuentran frecuentemente en las capas exteriores queratinizadas (Berger *et al.,* 2005).

La infección por quitridiomicosis casi siempre causa hiperqueratosis en la región del talo del hongo. Otros cambios incluyen: hiperplasia multifocal irregular, la desordenada capa de células epidérmicas, espongiosis, erosiones y ulceraciones ocasionales de la piel (Berger *et al.,* 2005). Se ha reportado que el aumento en la carga de zoosporas está asociada a reducciones en las concentraciones plasmáticas de electrólitos, es decir, aquellos anfibios con una quitridiomicosis severa tendrán una mayor pérdida de solutos (Voyles *et al.*, 2012), sugiriendo que *Bd* altera la función osmoregulatoria cutánea, produciendo un desequilibrio electrolítico y posteriormente la muerte (Voyles *et al.,* 2009).

Se ha determinado, por medio de un conjunto de datos compilados de literatura publicada y no publicada donde se ha localizado *Bd* (más de 36000 individuos), que esta

enfermedad ha sido detectada en 56 de 82 (68%) países, y en 516 de 1240 (42%) especies. Además ha sido ampliamente detectado en las Américas y en parches en África, Asia y Europa (Olson *et al.*, 2013).

Anteriormente, para la detección de quitridiomicosis se utilizaban técnicas como el examen histológico e inmunohistoquímico de los dígitos de los pies de los individuos (Berger *et al.*, 1999; 2002). Estas técnicas son invasivas e insensibles, particularmente en las primeras etapas de la infección cuando el tratamiento puede ser posible (Boyle *et al.*, 2004). La probabilidad de que el quítrido esté presente en el tejido examinado se relaciona con el estadio/tiempo de la infección y si la piel infectada está unida al tejido extirpado (Hyatt *et al*., 2007).

Annis *et al*. (2004) desarrollaron ensayos diagnósticos utilizando técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR de punto final, que amplifican las regiones ITS-1 e ITS-2 de *Bd* para detectar la presencia o ausencia del quítrido de una manera más eficaz. Por otro lado, Boyle *et al.* (2004) desarrollaron y aplicaron un ensayo de PCR en tiempo real o cuantitativo (q-PCR) para la detección del quítrido, con el cual se puede detectar y cuantificar con precisión una zoospora en una muestra diagnóstico (tejido o hisopo), así se podrá facilitar la detección temprana del quítrido, tanto en poblaciones cautivas como silvestres, con un alto grado de sensibilidad y especificidad, convirtiéndose en la técnica no invasiva más confiable para poder detectar la presencia del hongo patógeno (Kriger *et al*., 2006).

Gracias a la implementación de técnicas moleculares para detectar la presencia del quítrido en anfibios, se ha logrado secuenciar diferentes cepas de *Bd* provenientes de todo

el mundo, para compararlas y determinar los diferentes haplotipos que pueden estar presentes en las poblaciones infectadas y de este modo poder llegar a las posibles conclusiones sobre el origen de *Bd* (Rachowicz *et al.,* 2005; Morgan *et al.,* 2007). La diversidad filogenética dentro de *Bd* es grande, y la radiación adaptativa es mucho más antigua de lo que se creía (Farrer *et al*., 2011; Martel *et al*., 2013; Rosenblum *et al*., 2013; Rodríguez *et al*., 2014). Secuencias de todo el genoma muestran al menos cuatro linajes principales dentro de *Bd*: el linaje panzoótico global (*Bd*GPL), el linaje del Cabo (*Bd*Cape), el linaje suizo (*Bd*CH) y el linaje de Brasil (*Bd*Brazil) (Farrer *et al*., 2011; Rosenblum *et al*., 2013; Rodríguez *et al*., 2014).

Todavía existe un gran debate acerca del origen del quítrido, pues se han planteado hipótesis en donde se analiza si este hongo fue recientemente introducido a escala global (hipótesis nuevo patógeno emergente) (Morehouse *et al.,* 2003; James *et al.,* 2009) o si ha sido un patógeno endémico, y la disminución de las poblaciones son el resultado de los cambios en la susceptibilidad del huésped, la virulencia del patógeno, cambios ambientales, o una combinación de estos factores (hipótesis de patógeno endémico) (Rachowicz *et al.,* 2005; Morgan *et al.,* 2007). Las dos hipótesis reflejan dos posibles explicaciones para el origen y propagación de *Bd* en comunidades de anfibios a nivel mundial (Rachowicz *et al.,* 2005).

Se ha visto que el genotipo que presente *Bd* está relacionado con la virulencia del mismo, y los estudios de genética de poblaciones han demostrado que la aparición de quitridiomicosis en el mundo, se ha producido como consecuencia de la aparición de un linaje virulento del siglo XX (Farrer *et al.,* 2011; Olson *et al.,* 2013). De los cuatro linajes principales, el linaje de Brasil fuel el que divergió temprano en la historia filogenética del

patógeno (aprox. hace 104700 años) (Rosenblum *et al*., 2013). Además, se han encontrado genotipos híbridos entre *Bd*GPL y *Bd*Brazil en ranas del sureste de Brasil (Schloegel *et al*., 2012;. Farrer *et al*., 2013), lo que sugiere que la dinámica del patógeno en Brasil es potencialmente más compleja que en otras regiones (Rodríguez *et al*., 2014), infiriendo que Brasil es el candidato más probable para el origen de *Bd* (Rodríguez *et al*., 2014).

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

La distribución del hongo patógeno y la quitridiomicosis es significativamente asociada a variables ambientales, permitiendo de esta manera identificar por medio de modelos ecológicos la distribución de esta y otras enfermedades en regiones que están en riesgo (Fisher *et al.*, 2009). Por esta razón, se ha planteado la hipótesis de la temperatura óptima del quítrido, donde se sugiere que la declinación de anfibios se debe al calentamiento global y a la variabilidad de la temperatura (Pounds *et al.*,2006; Bosch *et al.*, 2007).

Aunque el surgimiento de nuevas enfermedades (Daszak *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2005), como la quitridiomicosis, parece ser una amenaza relativamente menos importante para la declinación de los anfibios, se ha visto que en aquellas especies afectadas por

enfermedades, puede causar declinaciones poblacionales repentinas y dramáticas. Esto ha resultado en extinciones catastróficas y muy rápidas (IUCN 2014), a pesar de que la pérdida de hábitat y la degradación afectan a un número mucho mayor de especies, la velocidad a la que una especie declina suele ser mucho más lento (IUCN 2014).

3.2.2 *Batrachochytrium dendrobatidis* EN EL ECUADOR

El Neotrópico se encuentra entre las áreas más afectadas por las declinaciones de anfibios, pues se ha reportado desde la década de los ochentas hasta la actualidad, pérdidas repentinas de especies de anuros y alta prevalencia de quitridiomicosis en países como Costa Rica, Ecuador, Venezuela, Panamá, Puerto Rico, Argentina, Brasil (Pounds y Crump, 1994; Ron *et al.,* 2003; Burrowes *et al.,* 2004; Bustamante *et al.,* 2005; Merino-Viteri *et al.,* 2005; Oliveira de Queiroz Carnaval *et al.,* 2006; Lips *et al.,* 2006; Longo *et al.,* 2010; Lescano *et al.,* 2013; Guayasamín *et al.,* 2014). El Ecuador está entre los países más afectados por las declinaciones y extinciones poblacionales de anfibios, pues se ubica en tercer lugar a nivel mundial en número de especies amenazadas (IUCN 2014) y casi una de cada tres especies de anfibios ecuatorianos está amenazada con extinción (Ron *et al*., 2014). La declinación de las poblaciones de anfibios en el Ecuador se ha reportado desde principios de la década de 1990 (Coloma, 1995), y el registro más temprano de quitridiomicosis data de 1980 (Ron y Merino-Viteri, 2000), lo que muestra, que el quítrido ha estado presente en las poblaciones silvestres desde antes de que el problema de declinaciones sea notado en el Ecuador. Existe evidencia de que ocurrieron anomalías climáticas en las décadas de 1980 y 1990, junto a la acción de *Bd,* infectando poblaciones de diferentes especies de anuros andinos en el Ecuador (Merino-Viteri *et al.,*

2005) y la evidencia existente sugiere que las poblaciones de al menos 25 especies de ranas pueden haber disminuido en el Ecuador (Ron *et al.*, 2003).

Por estas razones se han realizado varios estudios para entender la biología del quítrido, su distribución y cómo ha afectado y está afectando a la disminución de poblaciones de anuros en el Ecuador (Ron, 2005; Freire *et al*., 2006; Proaño-Bolaños *et al*., 2007). A medida que ha avanzado la tecnología, se ha logrado secuenciar el genoma de *Bd*, en consecuencia, se han realizado trabajos para determinar los haplotipos que pueden encontrarse en las diferentes poblaciones de anfibios ecuatorianos (Sáenz, 2011; Vizcaíno *et al*., 2013).

3.3 ÁREA DE ESTUDIO

El Parque Metropolitano Guangüiltagua de Quito es considerado el parque más grande del Distrito Metropolitano de Quito, con una extensión aproximada de 571 ha, situado a una altura de 2988 m.s.n.m. y con una temperatura promedio anual entre 12 y 18 ºC (Espinoza-Gracia, 2009). Este parque alberga dos especies de anfibios, como es el Cutín de Quito (*Pristimantis unistrigatus*) y la Rana Marsupial de Quito (*Gastrotheca riobambae*). *P. unistrigatus* habita en pastizales, áreas cultivadas y áreas urbanas en los valles interandinos desde el sur de Colombia al centro de Ecuador (2200 y 3400 m.s.n.m.). Es una especie común en los jardines de la ciudad de Quito y sus alrededores en donde se la escucha cantar durante el día y la noche cuando hay lluvias (Ron *et al.*, 2012). Por otro lado, *G. riobambae* suele encontrarse junto a fuentes de agua como canales de riego, pozas, riachuelos, lagunas, ciénagas, etc. (Frenkel *et al.*, 2010). Esta especie es endémica de los

bosques y valles interandinos del norte y centro de Ecuador (aprox. 7310 km^2) entre las provincias andinas de Carchi y Chimborazo (1578 y 3500 m.s.n.m.) (Frenkel *et al.*, 2010).

Un estudio en la población larvaria de *G. riobambae* en el Parque Metropolitano Guangüiltagua de Quito reportó renacuajos infectados con el hongo patógeno (Manzano, 2010). La proporción de renacuajos infectados estuvo correlacionada positivamente con la temperatura media del agua y el tamaño del renacuajo (más infección en renacuajos más grandes) (Manzano, 2010). Este estudio buscó determinar la posible infección de quitridiomicosis en *P. unistrigatus* en el parque Metropolitano Guangüiltagua de Quito, pues esta especie coexiste en el mismo sitio y está expuesta a un hábitat donde se encuentran renacuajos de *G. riobambae* infectados, y posiblemente juveniles y adultos infectados de esta misma especie. Además, *P. unistrigatus* tiene biología reproductiva diferente (desarrollo directo) de *G. riobambae*, lo cual también podría influenciar en su posibilidad de ser infectados.

3.4 OBJETIVOS

3.4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si el Cutín de Quito (*Pristimantis unistrigatus*) es portador de quitridiomicosis, debido a que está expuesta a un hábitat donde se encuentran renacuajos de la Rana Marsupial de Quito (*Gastrotheca riobambae*) infectados o su posible contacto con juveniles o adultos infectados de esta misma especie.

3.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar la presencia del quítrido *Batrachochytrium dendrobatidis* y cuantificar la cantidad de zoosporas que pueden presentar los renacuajos de la Rana Marsupial de Quito (*Gastrotheca riobambae*) de una poza del Parque Metropolitano Guangüiltagua de Quito.

2. Determinar la presencia del quítrido *Batrachochytrium dendrobatidis* y cuantificar la cantidad de zoosporas que pueden presentar juveniles y adultos de el Cutín de Quito (*Pristimantis unistrigatus*) en los alrededores de una poza positiva para quitridiomicosis del Parque Metropolitano Guangüiltagua de Quito.

3. Determinar el número de zoosporas, máximos y mínimos a lo largo del tiempo, para comprender la dinámica de la enfermedad entre estas dos especies, correlacionando los resultados obtenidos con factores ambientales durante un periodo de tiempo.

4. Establecer las diferencias entre las técnicas moleculares para la detección del quítrido *Batrachochytrium dendrobatidis* y el efecto del tipo de muestra tomada a los renacuajos de la Rana Marsupial de Quito (*Gastrotheca riobambae*).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MUESTREOS EN EL PARQUE METROPOLITANO GUANGÜILTAGUA DE QUITO

El estudio se realizó en una poza permanente, ubicada en el Parque Metropolitano Guangüiltagua de Quito (Figura 1) (00°11’01’’S, 078°28’08’’O). Se realizaron muestreos cada 15 días, a lo largo de 12 meses entre septiembre de 2012 y agosto de 2013.

Se realizaron 19 muestreos para la recolección de renacuajos de *G. riobambae* (Figura 2) y 21 para la recolección de *P. unistrigatus* (Figura 3), con el fin de determinar la prevalencia de infección de *Bd*, por medio de análisis moleculares.

4.2 TOMA DE MUESTRAS DE *Batrachochytrium dendrobatidis*

Por medio de hisopos (MW100, Medical Wire y Equipment Co.) se tomaron muestras de cada renacuajo de *G. riobambae*, introduciendo el hisopo dentro de los aparatos bucales y girándolo de cinco a siete veces (Hyatt *et al.*, 2007) sin hacer mayor daño al individuo. En los adultos y juveniles de *P. unistrigatus*, el hisopo se lo pasó de 10 a 12 veces a través del parche pélvico y de tres a cinco veces entre los dígitos de los dedos, haciendo que el individuo agarre al hisopo (modificado del grupo de investigación Briggs NIH, 2009) (Figura 4). Cada hisopo fue colocado en un tubo con su código individual.

4.2.1 TOMA DE MUESTRAS DE RENACUAJOS DE LA RANA MARSUPIAL DE QUITO (*Gastrotheca riobambae*)

La recolección de los renacuajos de *G. riobambae* se los realizó durante horas del día con la ayuda de redes de malla. Se barrió con una red de malla (30 cm x 30 cm), con agujeros moderados (0.7 mm de diámetro) y mangos de madera (1.7 m) toda la poza, especialmente cerca de las orillas, pues en esos sitios era más fácil encontrar los individuos.

Se recolectaron entre cinco y diez renacuajos en cada muestreo, tomando en cuenta el estadio de desarrollo, según la guía de Gosner (1960). Se procuró colectar renacuajos en estadios de desarrollo avanzado (28–46), debido a que ya poseen todas las partes del aparato bucal queratinizadas (mandíbulas y dientes), importante para el desarrollo del quítrido (Berger *et al.*, 1999).

Cada renacuajo capturado fue colocado en recipientes individuales para evitar contaminación cruzada, y fueron trasladados al Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (QCAZ) para la toma de muestras de cada aparato bucal por medio de hisopos. Se midió la longitud de cada renacuajo, desde la boca hasta el extremo posterior de la cola con la ayuda de un calibrador digital. Todos los hisopos fueron catalogados y almacenados en una refrigeradora (2–4 °C) hasta su posterior extracción de ADN.

Cada renacuajo fue sacrificado deshidratándolo en etanol al 95% y conservado individualmente en alcohol al 70% para la posterior extirpación del aparato bucal, con el objetivo de comparar el diagnóstico entre el tejido y el hisopo.

Para extirpar cada aparato bucal, se utilizaron tijeras y pinzas previamente esterilizadas, en donde por cada extirpación, a las herramientas se les sometía a un lavado rápido con hipoclorito de sodio al 5%, seguido de un enjuague con agua, luego se sumergían las puntas en alcohol al 95% y por último se flameaba las puntas con la ayuda de un mechero, de esta manera se eliminaba cualquier posible residuo que pueda contaminar la siguiente muestra. El aparato bucal extirpado se cortó en finos pedazos (aprox. 5 a 10 mm) y los pedazos se colocaron dentro de tubos eppendorf de 1.5 ml para continuar con la extracción de ADN.

4.2.2 TOMA DE MUESTRAS DE CUTINES DE QUITO (*Pristimantis unistrigatus*)

P. unistrigatus se buscó y colectó en la noche, debido a que esta especie de anuro es nocturna. Los muestreos se realizaron desde las nueve de la noche, puesto que en esta hora ya se encuentran activas, y duraron entre dos a tres horas o hasta recolectar de 15 a 20 ranas. Las ranas fueron buscadas en el suelo, entre la hojarasca, entre la maleza de la base y en las ranuras de los árboles de eucalipto.

Se atrapó y colocó a cada individuo en fundas plásticas individuales para la posterior toma de muestras por medio de hisopos. Se registró el lugar donde se capturó cada individuo (dentro o fuera de la poza) y la distancia a la que se encontraba de la poza. Se midió la longitud rostro-cloacal (LRC) con la ayuda de un calibrador digital. Se anotó la actividad que realizaba el individuo al momento de la captura (saltar, caminar o inactivo).

4.2.3 TOMA DE MUESTRAS OCASIONALES DE METAMORFOS DE LA RANA MARSUPIAL DE QUITO (*Gastrotheca riobambae*)

Durante el tiempo de muestreo se encontraron metamorfos de *G. riobambae*, a los cuales también se les tomó muestras por medio de hisopos para la detección de *Bd*, aplicando la misma metodología antes mencionada.

4.3 RECOLECCIÓN DE DATOS AMBIENTALES

Se colocaron dos registradores automáticos de temperatura (iButton® temperature loggers DS1922L), uno dentro y uno fuera de la poza (aprox. 3 m desde el nivel de la poza), se tomaron datos cada hora durante todo el periodo de muestreo.

Adicionalmente, se obtuvieron los valores de precipitación por cada mes por medio de los boletines mensuales meteorológicos del "Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología" (INAMHI) correspondientes al periodo 2012–2013 (Anexo 1).

Finalmente, los niveles de infección y la prevalencia de la enfermedad se correlacionaron (Ver sección 4.8.4 para detalles).

4.4 EXTRACCIÓN DE ADN

Se extrajo ADN de las muestras de los hisopos y del tejido de los aparatos bucales de renacuajos de *G. riobambae* y de los hisopos provenientes de la piel de *P. unistrigatus*.

Para extraer el ADN, tanto los tejidos como los hisopos, fueron colocados en tubos eppendorf de 1.5 ml, con 0.02 a 0.03 g de perlas de Zirconia (0.5 mm diameter, Biospec Products). Se utilizó el buffer PrepMan Ultra (Sample Preparation Reagent. Applied Biosystems), siguiendo el protocolo de Boyle *et al.*, 2004, Hyatt *et al.*, 2007 y Manzano, 2010, con ciertas modificaciones (Anexo 2).

4.5 ANÁLISIS DE DIAGNÓSTICO DE *Batrachochytrium dendrobatidis*

Se aplicaron dos técnicas de PCR a cada una de las muestras: PCR de punto final para detectar la presencia de *Bd* y PCR en tiempo real (q-PCR) para detectar y cuantificar la presencia del quítrido, tanto en los renacuajos de *G. riobambae* como en *P. unistrigatus*. Para la PCR de punto final se utilizaron cebadores específicos para el quítrido: ITS1-3 Chytr y el 5.8S Chytr (Boyle *et al.*, 2004) (Anexo 3). Para la cuantificación de zoosporas de *Bd* por medio de q-PCR, se utilizaron sondas marcadas con fluorocromos (sondas TaqMan, Chytr MGB2) y los mismos cebadores que para la PCR de punto final (Boyle *et al.*, 2004) (Anexo 4).

Por cada ensayo realizado de PCR de punto final se utilizaron controles positivos (muestras: SC39472, SC39491 y vial de plásmido más concentrado), para de esta manera verificar que las condiciones de PCR estén correctas y amplifiquen los fragmentos de aquellas muestras positivas. Estas muestras (SC39472 y SC39491) no pudieron ser cuantificadas por q-PCR, debido a que el ADN se agotó. También se utilizaron controles negativos para comprobar que no haya ocurrido contaminación (colocar en lugar de ADN agua).

Cuatro muestras, provenientes de tejido de aparatos bucales, resultantes dudosas (positivas para PCR de punto final pero negativas para q-PCR) fueron analizadas nuevamente, mediante un ensayo con controles positivos y negativos, para de esta manera asegurarse de que no fueran resultados equívocos.

4.5.1 CURVA ESTÁNDAR

Para el análisis mediante q-PCR se generó una curva estándar mediante la cuantificación absoluta de siete viales de plásmido (*Pisces Molecular*) con concentraciones diferentes de *Bd*, en un rango de 2.1 moléculas de *Bd* x 10^6/μL (máxima concentración) hasta 2.1 moléculas de *Bd* x 10^0/μL (mínima concentración). El programa Mxpro que tiene el equipo Stratagene Mx 3005 para la q-PCR, nos permite obtener el valor del primer ciclo de la PCR donde empieza la fase exponencial (Ct) para cada concentración analizada. Este valor es inversamente proporcional al número de zoosporas determinadas, es decir, mientras mayor es el número de zoosporas, menor es el valor de Ct (Figura 5).

4.6 NIVELES DE INFECCIÓN POR *Batrachochytrium dendrobatidis*

Para determinar si existían diferencias significativas entre los niveles de infección de *Bd* y los estadios larvarios de *G. riobambae*, se comparó el número de zoosporas que se detectó para cada muestra positiva en q-PCR, con su respectivo estadio de desarrollo. Para los subsecuentes análisis, los niveles de infección por *Bd* se obtuvieron dividiendo la cantidad de copias de ADN (zoosporas/μL) de cada muestra que se detecta como positiva en la PCR de tiempo real, para el tamaño de cada individuo, representado por la longitud-rostro-cloaca (mm) en el caso de *P. unistrigatus* (adultos y juveniles) y longitud- rostro-

cola (mm) en el caso de los renacuajos de *G. riobambae*. Así, se ajusta el nivel de infección en las dos especies estudiadas, a un valor más preciso en base de su tamaño.

4.7 PREVALENCIA DE *Batrachochytrium dendrobatidis*

La prevalencia de la enfermedad en las dos poblaciones de anuros estudiadas se obtuvo calculando el porcentaje de individuos positivos para *Bd* en cada muestreo.

Por otro lado en las regresiones, la prevalencia de la enfermedad se obtuvo calculando mensualmente el porcentaje de individuos positivos para *Bd*.

4.8 ANÁLISIS DE DATOS

Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el software IBM SPSS Statitics 22. Para comprobar si existen diferencias significativas entre los niveles de infección y la prevalencia de la enfermedad en las dos especies a lo largo del tiempo, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, la cual compara promedios entre rangos. Al no contar con suficientes repeticiones (mínimo dos muestreos por mes) y en algunos meses tener entre 3–5 individuos para analizar, los meses fueron agrupados por periodos de tres meses, de esta manera se cumplían todos los requisitos para poder realizar esta prueba. Los meses de junio a agosto, en la población de renacuajos de *G. riobambae*, no fueron considerados debido a que solo se encontró un individuo positivo para *Bd*, por lo que no se podía sacar el promedio de nivel de infección en ese periodo. El mismo procedimiento se utilizó para evaluar la significación de los niveles de infección entre los estadios larvarios, donde, fueron agrupados por rangos de tres estadios por grupo; el grupo uno corresponde a los estadios desde 28–30 hasta los estadios 40–42 pertenecientes al quinto grupo.

4.8.1 COMPARACIÓN ENTRE LAS DOS TÉCNICAS MOLECULARES Y TIPOS DE MUESTRAS

Para poner a prueba la existencia de diferencias entre PCR y q-PCR y entre los dos tipos de muestras (tejido e hisopo) analizadas, primero se analizaron los datos para determinar si presentan una distribución normal. Para ello se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Si la distribución fue normal se utilizó la prueba de t-student para muestras relacionadas, caso contrario se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para dos muestras relacionadas. Los datos utilizados para este análisis fueron los porcentajes de individuos positivos para *Bd* que se obtuvieron por cada muestreo realizado en cada una de las técnicas utilizadas.

4.8.2 NIVELES DE INFECCIÓN DE CUTINES DE QUITO (*Pristimantis unistrigatus*) CON RESPECTO A LA DISTANCIA HACIA LA POZA

Se analizó los niveles de infección por *Bd* con respecto a la distancia de la poza (m) en la población de *P. unistrigatus*, para determinar si la poza es determinante en el nivel de infección en esos individuos.

4.8.3 NIVELES DE INFECCIÓN Y PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD

Para determinar si existe alguna relación entre los promedios mensuales de infección por *Bd* con la prevalencia de la enfermedad, se realizaron regresiones entre las variables promedio de infección y prevalencia, tanto dentro de la población de cada especie como entre las dos especies.

Las regresiones de las dos variables (promedio de infección y prevalencia) se realizaron con los datos de cada mes de muestreo. No obstante, algunos meses tuvieron que ser excluidos del análisis, debido a que no se encontraron individuos positivos (no prevalencia) o solamente se diagnosticó positivo a un individuo, por lo que no se podía obtener el promedio del nivel de infección en ese mes.

4.8.4 RELACIÓN ENTRE EL PROMEDIO DE INFECCIÓN Y LA PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD CON FACTORES AMBIENTALES (TEMPERATURA Y PRECIPITACIÓN)

Para determinar si existe alguna relación entre los promedios de infección por *Bd* y la prevalencia de la enfermedad en las dos poblaciones de anuros estudiadas con factores ambientales (temperatura y precipitación), se calcularon las temperaturas máximas, medias y mínimas de la poza y del ambiente por cada mes, obtenidos de los registradores automáticos de temperatura, y se correlacionó con cada uno de los promedios de infección y prevalencia de la enfermedad mensuales durante todo el tiempo de muestreo en los renacuajos de *G. riobambae* y adultos y juveniles de *P. unistrigatus*. Adicionalmente, se utilizaron los promedios mensuales de precipitación reportados por el INAMHI para correlacionarlos con los promedios de infección y prevalencia de la enfermedad en la población de *P. unistrigatus.*

5. RESULTADOS

5.1 RENACUAJOS DE LA RANA MARSUPIAL DE QUITO (*Gastrotheca riobambae*)

La visualización de muestras positivas en PCR de punto final se encuentran representadas por bandas prominentes de ADN teñidas con bromuro de etidio, reactivo fluorescente bajo luz UV (Figura 6). En cambio en q-PCR, el software MxPro nos indica la visualización de muestras positivas mediante la detección de fluorescencia que emite la sonda (fragmento de ADN que leva adherida una molécula fluorescente) al ser iluminada con el láser del equipo Stratagen (Figura 7).

Se recolectó un total de 154 renacuajos de *G. riobambae* en todos los muestreos. Se obtuvieron 154 muestras en hisopo, pero solo 137 en tejidos de aparatos bucales, pues algunos aparatos bucales se perdieron al momento de realizar la extirpación del mismo, debido a que los renacuajos recolectados eran de estadios muy tempranos, en consecuencia, el aparato bucal era pequeño y difícil de manipular.

5.1.1 TEJIDO APARATOS BUCALES

De 135 muestras de tejido analizados por medio de q-PCR, 53 (39%) resultaron positivos (Tabla 1). El renacuajo con la mayor cantidad de zoosporas presentó 48795 zoosporas/µL ($\bar{x}$= 2977.7 ± 9215.6) con un nivel de infección de 816 zoosporas/mm ($\bar{x}$= 52.5 ± 153.8).

De los 42 (31%) individuos positivos para *Bd* mediante PCR de punto final, 40 individuos fueron confirmados positivos para *Bd* (dos muestras fueron controles positivos), es decir, todas las muestras que fueron diagnosticadas positivas por medio de PCR de punto final, fueron cuantificadas por q-PCR.

Cuatro muestras fueron catalogadas como dudosas, debido a que se les catalogó como positivas en PCR de punto final pero negativas en q-PCR. Estas muestras se analizaron nuevamente para confirmar si presentan o no *Bd.*

De igual manera, de los 91 individuos que se diagnosticaron negativos para *Bd* mediante PCR de punto final, 68 individuos (86%) fueron confirmados negativos. Sin embargo, los restantes 13 (14%) resultaron positivos para q-PCR. Estas últimas muestras fueron catalogadas como falsos negativos en el análisis por medio de PCR de punto final.

5.1.2 HISOPOS APARATOS BUCALES

De 154 muestras analizadas por medio de q-PCR, 22 (14%) resultaron positivas (Tabla 1). El renacuajo con la mayor cantidad de zoosporas tuvo 17269 zoosporas/µL ($\bar{x}$= 929.5 ± 3653.9) y un nivel de infección de 238 zoosporas/mm ($\bar{x}$= 13.8 ± 50.1).

Los seis (4%) individuos que se diagnosticaron positivos para *Bd* mediante PCR de punto final fueron confirmados positivos por medio de q-PCR. De los 148 individuos negativos mediante PCR de punto final, 132 individuos (89%) fueron confirmados negativos. Sin embargo, los restantes 16 (11%) resultaron positivos para q-PCR. Estas

últimas muestras fueron catalogadas como falsos negativos en el análisis por medio de PCR de punto final.

5.2 CUTINES DE QUITO (*Pristimantis unistrigatus*)

Se recolectaron un total de 382 *P. unistrigatus* a lo largo de los 12 meses de muestreo, de las cuales se tomaron muestras de piel por medio de hisopos.

De las 382 muestras analizadas por medio de PCR de punto final, 2 (0.5%) fueron positivas para *Bd* (Tabla 1).

De las 382 muestras analizadas por medio de q-PCR, 57 (15%) resultaron positivas (Tabla 1). El individuo con la mayor cantidad de zoosporas tuvo 7556 zoosporas/µL ($\bar{x}$= 556.04 ± 1426.1) y un nivel de infección de 459 zoosporas/mm ($\bar{x}$= 29.27 ± 78.77).

Los dos individuos que se diagnosticaron positivos para *Bd* mediante PCR de punto final fueron confirmados positivos por medio de q-PCR. De igual manera, de los 380 individuos que se diagnosticaron negativos para *Bd* mediante PCR de punto final, 325 individuos (86%) fueron confirmados negativos para *Bd*, sin embargo, los restantes 55 (14%) resultaron positivos para q-PCR. Estas últimas muestras fueron catalogadas como falsos negativos en el análisis por medio de PCR de punto final.

5.3 RANAS MARSUPIALES DE QUITO (*Gastrotheca riobambae*)

Ocasionalmente se encontraron ocho metamorfos de *G. riobambae* a los cuales se tomaron muestras de piel por medio de hisopos.

De las ocho muestras analizadas por medio de q-PCR, 5 (62%) resultaron positivas. El individuo con la mayor cantidad de zoosporas tuvo 78302 zoosporas/µL ($\bar{x}$= 21206 ± 33408.40) y un nivel de infección de 3494 zoosporas/mm ($\bar{x}$= 879.50 ± 1494.45).

5.4 COMPARACIÓN DE TÉCNICAS: PCR DE PUNTO FINAL vs. q-PCR

Las cuatro muestras dudosas (positivas para PCR de punto final pero negativas para q-PCR) no mostraron ninguna banda en el ensayo realizado para comprobar la presencia o ausencia de *Bd*. Por lo que a estas muestras se les catalogó como negativas en ambas técnicas moleculares empleadas.

Se utilizó la prueba de t-student para muestras relacionadas para analizar si existen diferencias significativas entre la prevalencia de la enfermedad (porcentaje de individuos positivos) con muestras de tejido, debido a que la prueba de Kolmogorov-Smirnov (PCR: p = 0.677 y q-PCR: p = 0.417) mostró que los datos se encuentran distribuidos normalmente (Anexo 5).

Como las dos técnicas moleculares fueron usadas con las mismas muestras de tejido, se pudo utilizar esta prueba, dando como resultado la significación (p = 0.049;

Anexo 6) en el uso entre las dos técnicas moleculares de PCR de punto final y q-PCR al analizar muestras provenientes de tejido (Tabla 2). Las prevalencias encontradas con cada una de las técnicas utilizadas fueron diferentes (31% y 39%).

Se utilizó la prueba no paramétrica para dos muestras relacionadas de Wilcoxon para analizar si existen diferencias entre la prevalencia con muestras de hisopos, debido a que la prueba de Kolmogorov-Smirnov (PCR: $p < 0.01$ y q-PCR: $p = 0.056$) demostró que los datos de PCR no se encuentran distribuidos normalmente (Anexo 7).

La prueba de Wilcoxon mostró diferencias significativas ($p = 0.018$; Anexo 8) entre el PCR de punto final y el q-PCR (Tabla 2). Las diferencias se reflejaron en las prevalencias obtenidas, ya que en q-PCR se diagnosticaron 22 (14%) individuos positivos y en PCR apenas 6 (4%).

Se utilizó la prueba de t-student para muestras relacionadas para analizar si existen diferencias entre muestras de tejido de aparatos bucales y muestras tomadas por hisopos utilizando q-PCR, debido a que la prueba de Kolmogorov-Smirnov (q-PCR tejido: $p = 0.417$ y q-PCR hisopos: $p = 0.056$) demostró que los datos se encuentran distribuidos normalmente (Anexo 9). La prueba de t-student reveló diferencias altamente significativas ($p < 0.01$; Anexo 10) entre las dos técnicas de toma de la muestra (Tabla 2). Las diferencias se reflejaron en las prevalencias obtenidas, ya que se diagnosticaron 53 (39%) individuos positivos por medio de muestras de tejido y apenas 16 (12%) por medio de muestras tomadas por hisopos.

De las muestras analizadas (aparatos bucales e hisopos), se encontraron cinco individuos positivos en todos los ensayos realizados y cinco individuos positivos en todos los ensayos excepto en el PCR de punto final de hisopo, dando un total de diez muestras positivas para *Bd* en tres de los cuatro ensayos realizados (Tabla 3).

5.5 NIVELES DE INFECCIÓN POR *Batrachochytrium dendrobatidis*

Para comprobar si existieron diferencias significativas entre los niveles de infección entre diferentes estadios larvarios, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, debido a que la prueba de Kolmogorov-Smirnov (zoosporas/µL: $p < 0.01$) demostró que al menos una variable no tuvo distribución normal (Anexo 11). No se encontraron diferencias significativas al comparar los niveles de infección por *Bd* entre estadios larvarios ($p = 0.248$; Anexo 12)**.** El mayor promedio de nivel de infección detectado fue en el grupo de estadios de 34 a 36 en comparación con el resto de estadios (Tabla 4 y 5; Figura 8).

Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comprobar si existen diferencias en los niveles de infección por *Bd* a lo largo del tiempo, debido a que la prueba de Kolmogorov-Smirnov (zoosporas/mm renacuajos: $p < 0.01$; zoosporas/mm Ranas Cutines*:* $p < 0.01$ y meses: $p < 0.01$) demostró que los datos no se encontraron distribuidos normalmente (Anexo 13 y 14). No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de infección por *Bd* en los renacuajos de *G. riobambae* ($p = 0.208$) a lo largo del tiempo de muestreo (Anexo 15). El mayor promedio de nivel de infección detectado fue en el periodo de marzo a mayo en comparación con el resto de periodos (Figura 9).

Los promedios de niveles de infección por *Bd* en *P. unistrigatus* variaron a lo largo del tiempo de muestreo, pues se encontraron diferencias significativas ($p = 0.023$) entre los meses (Anexo 16). El mayor promedio de nivel de infección detectado fue en el periodo de junio a agosto en comparación con el resto de periodos (Figura 10).

5.6 PREVALENCIA DE *Batrachochytrium dendrobatidis*

Para comprobar si existieron diferencias entre la prevalencia en las dos especies de ranas a lo largo del tiempo, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. A pesar de que la prueba de Kolmogorov-Smirnov (meses: $p = 0.493$ y prevalencia renacuajos: $p = 0.417$; meses: $p = 0.439$ y prevalencia Ranas Cutines: $p = 0.905$) indicó que los datos se encontraron distribuidos normalmente (Anexo 17 y 18), el ANOVA mostró un coeficiente de variación que sobrepasó el límite de aceptación (> 20%), razón por la cual no se pudo utilizar una prueba paramétrica y se utilizó una prueba no paramétrica como Kruskal-Wallis.

No se encontraron diferencias significativas en la prevalencia de *Bd* en los renacuajos de *G. riobambae* ($p = 0.349$; Anexo 19) a lo largo del tiempo de muestreo (Tabla 6). El mayor promedio de prevalencia de *Bd* detectado fue en el periodo de septiembre a noviembre en comparación con el resto de periodos (Anexo 20).

Tampoco se encontraron diferencias significativas en la prevalencia de *Bd* en *P. unistrigatus* ($p = 0.274$; Anexo 21) a lo largo del tiempo de muestreo (Tabla 7). El mayor promedio de prevalencia de *Bd* detectado fue en el periodo de diciembre a febrero en comparación con el resto de periodos (Anexo 22).

5.7 PROMEDIO DE INFECCIÓN vs. PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD

Al correlacionar las dos variables, promedio de infección y prevalencia de *Bd* a lo largo del tiempo en la población de renacuajos de *G. riobambae* (Tabla 8), no se encontró una regresión significativa ($r^2 = 0.331$ y $p = 0.177$; Anexo 23 y 24).

De igual manera, al correlacionar las dos variables a lo largo del tiempo en la población de *P. unistrigatus* (Tabla 9), tampoco se encontró una regresión significativa ($r^2 = 0.059$ y $p = 0.563$; Anexo 25 y 26).

5.8 NIVELES DE INFECCIÓN Y PREVALENCIA ENTRE LAS DOS ESPECIES DE ANUROS

Al correlacionar los promedios de infección entre las dos especies no se encontró una regresión significativa ($r^2 = 0.180$ y con un $p = 0.476$; Anexo 27 y 28). De igual forma, al correlacionar la prevalencia de la enfermedad entre las dos especies tampoco se encontró una regresión significativa ($r^2 = 0.274$ y con un $p = 0.365$; Anexo 29 y 30).

5.9 NIVELES DE INFECCIÓN DE CUTINES DE QUITO (*Pristimantis unistrigatus*) EN RELACION A LA DISTANCIA HACIA LA POZA

Debido a que la prueba de Kolmogorov-Smirnov (distancia: $p < 0.01$ y zoosporas/mm Ranas Cutines: $p < 0.01$) demostró que los datos no son normales (Anexo 31), se utilizó la correlación de Spearman (no paramétrica), para correlacionar los

niveles de infección, de todos los individuos colectados (positivos y negativos), con la distancia (m) a la que se encontraban de la poza.

Se obtuvo una correlación significativa ($p = 0.011$) entre las dos variables (distancia y nivel de infección) (Anexo 32), dando como resultado una correlación negativa de Spearman (-0.130), en donde mientras más alejados se encontraron los individuos de la poza menores fueron los niveles de infección (Figura 11). Además, para verificar si existieron diferencias significativas entre los individuos positivos y negativos con respecto a la distancia de la poza, se utilizó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney, dando como resultado diferencias significativas ($p = 0.042$; Anexo 33) entre los individuos positivos y negativos con respecto a la distancia de la poza (Tabla 10 y 11). En base a la Figura 11 se puede ver que la tendencia fue que los individuos positivos se encontraron más cerca de la poza, mientras que los individuos negativos pudieron estar cerca o lejos de la misma.

5.10 PROMEDIO DE INFECCIÓN Y PREVALENCIA vs. FACTORES AMBIENTALES

Las regresiones entre las diferentes temperaturas (máximas, medias y mínimas) con los niveles de infección en la población de renacuajos de *G. riobambae*, mostraron que la temperatura media fue significativa (Tabla 12) mientras que los otros parámetros no mostraron significación (temperatura máxima y temperatura mínima). A pesar de que la prueba resultó significativa, se puede observar que el punto más externo es el que arrastra la regresión. Posiblemente exista una tendencia en donde, mientras aumenta la temperatura en la poza, disminuye el promedio de infección por *Bd* en la población de renacuajos

estudiada (Figura 12). Se puede observar que tal vez exista más infección en temperaturas que oscilan entre 13.50–13.70 °C.

Por otro lado, los resultados de los ANOVAS de las regresiones entre las diferentes temperaturas (máximas, medias y mínimas) con la prevalencia de la enfermedad en la población de los renacuajos de *G. riobambae*, mostraron que la temperatura máxima fue altamente significativa (Tabla 13), mientras que los otros parámetros no mostraron significación (temperatura media y temperatura mínima). Se pudo apreciar claramente una tendencia en donde, mientras aumentó la temperatura en la poza, aumentó la prevalencia de la enfermedad en la población (Figura 13).

Las regresiones entre las diferentes temperaturas (máximas, medias y mínimas) con los niveles de infección en la población de *P. unistrigatus*, mostraron que ninguna temperatura fue significativa (temperatura máxima, temperatura media y temperatura mínima) (Tabla 14; Anexo 34–36**)**. Las regresiones entre las diferentes temperaturas (máximas, medias y mínimas) con la prevalencia de la enfermedad en la población de *P. unistrigatus*, también mostraron que ninguna temperatura fue significativa (temperatura máxima, temperatura media y temperatura mínima) (Tabla 15; Anexo 37–39).

Por otra parte, los ANOVAS de las regresiones entre la precipitación y los niveles de infección en la población de *P. unistrigatus*, no mostraron significación (r^2 = 0.062, p = 0.552; Anexo 40 y 41). Los resultados de los ANOVAS de las regresiones entre la precipitación y la prevalencia de la enfermedad en la población de *P. unistrigatus*, tampoco mostraron significación (r^2 = 0.005, p = 0.841 Anexo 42 y 43).

6. DISCUSIÓN

6.1 COMPARACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES (PCR vs. q-PCR)

Al comparar las dos técnicas moleculares empleadas en este estudio (PCR de punto final y PCR en tiempo real), y dependiendo del tipo de muestra a analizar (tejido e hisopos) se encontraron diferencias significativas. Se pudo comprobar que PCR en tiempo real (q-PCR) es mucho más sensible y eficaz que PCR de punto final, debido a que tanto en las muestras de tejido (aparatos bucales) como en las muestras tomadas por medio de hisopos la prevalencia resultó mayor con esta técnica molecular. Esto se debe principalmente a que q-PCR amplifica exponencialmente pequeñas cantidades de ADN (Schmittgen *et al*., 2000). Al comparar las dos técnicas con muestras provenientes directamente del tejido (aparatos bucales) se encontraron diferencias significativas, detectando mayor prevalencia con q-PCR (39%) que con PCR de punto final (31%). Esto se puede deber a que la técnica al ser más sensible permite la cuantificación de números muy bajos de ADN, con límites de detección tan bajos como la detección de dos copias de un gen (Fey *et al*., 2004; Smith y Osborn, 2009).

Al comparar las dos técnicas moleculares (PCR de punto final y q-PCR) con muestras tomadas por medio de hisopos (aparatos bucales) se encontraron diferencias significativas, en donde, la prevalencia del quítrido encontrado en la población de renacuajos de *G. riobambae* se incrementó al usar q-PCR (4 y 14% respectivamente).

La diferencia de los resultados de las prevalencias encontradas en este estudio, son semejantes a las reportadas por Guayasamín *et al.* (2014), en donde, utilizaron las mismas

dos técnicas moleculares que se usaron en este estudio, y obtuvieron una prevalencia del 42% con q-PCR y una prevalencia del 22% con PCR de punto final. Los autores argumentaron que la diferencia entre las prevalencias se debió probablemente al método de detección, y al ser q-PCR más sensible se esperaba encontrar mayor prevalencia.

Al comparar los dos tipos de muestras (tejido e hisopos) analizadas por medio de PCR en tiempo real (q-PCR), también se encontraron diferencias significativas. La prevalencia del quítrido en la población de renacuajos de *G. riobambae* se incrementó al usar tejido como muestra para diagnosticar, ya que de un 14% de prevalencia de quitridiomicosis detectada por medio de hisopos, aumentó a un 39% por medio de tejido de aparatos bucales. Los resultados obtenidos por Retallick *et al.* (2006) (prevalencia tejido 41.1% y prevalencia promedio hisopos 21.4%) y los obtenidos por Hyatt *et al.* (2007) (prevalencia hisopos 15–22%) son parecidos a los resultados encontrados en el presente estudio, entonces se puede concluir que q-PCR puede detectar mayor frecuencia de zoosporas a principios de la infección en muestras provenientes de tejido que de hisopos, y posiblemente se deba al ciclo de vida de *Bd* (Hyatt *et al.*, 2007).

Las diferencias se pueden deber al tipo de muestra a analizar, ya que con el tejido es más fácil recuperar el ADN. Al tener q-PCR la capacidad de detectar una baja frecuencia de zoosporas en estadios tempranos de infección (Hyatt *et al.*, 2007) hace que la prevalencia aumente. Adicionalmente, en el hisopo se pueden presentar diversos problemas que ocasionen la inhibición de la PCR (Ballagi-Pordany y Belak, 1996), como por ejemplo la limpieza del hisopo, pues puede presentar material extraño (suciedad) o detritos. La superficie del individuo a analizar o la etapa de vida en la que se encuentre también puede afectar la amplificación. Asimismo, el ciclo de vida en la que se encuentre el quítrido

puede influenciar, pues en estadios tempranos de infección es poco probable la detección del hongo por medio de hisopos, en consecuencia la prevalencia detectada disminuirá en comparación con la del tejido (Hyatt *et al.,* 2007). Adicionalmente, en la mayoría de muestras provenientes de tejido, el nivel de infección (número de zoosporas) fue mayor que en muestras tomadas con hisopos, dato parecido al reportado por Hyatt *et al*. (2007), salvo en el individuo SC39493, en donde la muestra tomada por medio de hisopo, presentó una gran cantidad de zoosporas en comparación con la del tejido. Esto posiblemente se debió a que esta muestra de tejido fue la primera en diagnosticar positivo para *Bd*, y se la utilizó como control positivo para el resto de análisis, y al momento de cuantificar la muestra no se tenía suficiente volumen de ADN, caso contrario hubiera presentado una mayor cantidad de zoosporas.

En definitiva, se puede deducir que la mejor técnica de PCR para detectar *Bd* es q-PCR (Hyatt *et al.,* 2007), y la mejor metodología para tomar la muestra es la extracción del disco oral. No obstante, se pueden tomar muestras de los aparatos bucales por medio de hisopos y analizarlos por medio de q-PCR, de esta manera se convierte en una técnica no invasiva y valedera para detectar la prevalencia de *Bd* en una población determinada (Retallick *et al.,* 2006; Kriger *et al.,* 2006; Hyatt *et al.,* 2007), por esta razón Retallick *et al.* (2006) sugiere tomar más individuos para estimar la prevalencia de la enfermedad en un nivel de confianza comparable al muestreo destructivo.

Finalmente, una de las grandes ventajas que tiene la q-PCR es que nos permite cuantificar la cantidad de ADN presente en una muestra, por lo que nos permite evaluar no solo la prevalencia de la enfermedad sino los niveles de infección que presenta el quítrido en las dos especies de anuros estudiados.

6.1.1 FALSOS NEGATIVOS

Cuando se presentan muestras dudosas, es decir, el diagnóstico inicial puede ser equívoco, es necesario realizar un nuevo ensayo con las muestras originales (Hyatt *et al*., 2007), para de esta manera confirmar si presentan o no *Bd.* Por esta razón a las cuatro muestras resultantes positivas para PCR de punto final pero negativas para q-PCR se volvió a realizar una PCR de punto final, dando como resultado la no presencia de bandas, por lo que el diagnóstico inicial, por la poca resolución que presenta el gel de agarosa estuvo equivocada, catalogando a estas muestras como positivas, pero en realidad fueron negativas.

Todos los individuos diagnosticados positivos con PCR de punto final fueron confirmados positivos con q-PCR, sin embargo no todos los individuos detectados negativos con PCR de punto final dieron negativos con q-PCR, obteniéndose falsos negativos. Estas muestras no presentaron ninguna banda en los geles de agarosa. Realizar un estudio determinando solamente la prevalencia de la enfermedad (PCR de punto final) en una población dada puede llevar a conclusiones erróneas, por lo que es recomendable usar la técnica más sensible y específica. La PCR al ser un sistema complejo, altamente sensible e influenciada por varios componentes y parámetros, puede ocasionar este tipo de problemas (Ballagi-Pordany y Belak, 1996).

La presencia de falsos negativos en la PCR puede deberse por tres motivos: el primero y más común se debe a efectos inhibidores de ciertos ingredientes que afectan la PCR y/o errores de pipeteo al preparar la Máster Mix (Ballagi-Pordany y Belak,1996). Los efectos inhibitorios pueden producirse por alteraciones del pH, de Magnesio u otras concentraciones de iones y por la viscosidad del medio (Ballagi-Pordany y Belak, 1996).

El método de extracción de ADN también es un factor determinante para el funcionamiento de la PCR. La eficiencia de extracción de ADN varía considerablemente entre diferentes métodos y el rendimiento final dependerá, tanto del método utilizado como del tipo de muestra ambiental que se está estudiando (Smith y Osborn, 2009). El segundo motivo es no colocar el ADN de la muestra a analizar por descuido, por lo que no habría amplicón y por lo tanto al no detectar ninguna señal se establece como negativa a esa muestra (Hyatt *et al.*, 2007).

Adicionalmente, por la baja cantidad de ADN, no se observan bandas en los geles de agarosa, pues una banda está conformada por miles de millones de copias de ADN. En PCR de punto final, las proporciones de los amplificados numéricamente dominantes no reflejan las abundancias reales de secuencias presentes en el medio (Smith y Osborn, 2009). Se ha observado que para aquellas muestras que presentan bandas brillosas y prominentes, éstas tienen una alta cuantificación de zoosporas; mientras que en aquellas muestras que presentan bandas muy tenues o poco visibles, el número de zoosporas disminuye considerablemente. Es por esto que el tercer motivo pueda deberse a estadios tempranos de la infección (Hyatt *et al.*, 2007), pues al ser pequeña la cantidad de zoosporas presentes (ADN quítrido), no ocurre amplificación en la PCR de punto final. Así, en los individuos donde se detectaron la mayor cantidad de zoosporas tanto en renacuajos de *G. riobambae* como en *P. unistrigatus*, se observaron bandas muy brillosas y prominentes, en comparación con aquellos individuos que presentaron poca cantidad de zoosporas, donde las bandas resultantes fueron tenues.

La sensibilidad del q-PCR, por medio de sondas TaqMan, es equivalente a 0.1 zoosporas (Hyatt *et al.*, 2007), por esta razón, sin presentar mayor cantidad de ADN, la

q-PCR puede diagnosticar positiva a una muestra que resultó negativa en la PCR de punto final. La detección basada en fluorescencia, por parte de q-PCR, ofrece mayor sensibilidad y permite la discriminación de los números de genes a través de un rango dinámico más amplio (Smith y Osborn, 2009).

6.2 NIVELES DE INFECCIÓN POR *Batrachochytrium dendrobatidis*

6.2.1 NIVELES DE INFECCIÓN POR *Bd* EN RENACUAJOS DE LA RANA MARSUPIAL DE QUITO (*Gastrotheca riobambae*) Y EN CUTINES DE QUITO (*Pristimantis unistrigatus*)

En cuanto a los niveles de infección por *Bd* en los estadios de desarrollo de los renacuajos de *G. riobambae* no se encontraron diferencias significativas, es decir, el nivel de infección es similar entre los diferentes estadios larvarios, con lo que la presencia del quítrido puede estar en cualquier etapa de desarrollo de los renacuajos.

Este resultado difiere a lo reportado por Manzano (2010), quién propuso que mientras más desarrollado se encuentra el renacuajo, más grande se hallará el aparato bucal, por lo tanto mayor cantidad de hongo se encontrará. Al esperar encontrar más quítrido, más zoosporas deberá presentar el aparato bucal, de tal manera que el nivel de infección tendría que aumentar, por esta razón se esperaba encontrar más nivel de infección en estadios más avanzados. No obstante, Retallick *et al.* (2006), en su estudio tampoco encontró diferencias significativas entre el tamaño o los estadios de desarrollo de los renacuajos con los niveles de infección. Se pudo observar que en el grupo de estadios

de 34–36 existió mayor infección que en los otros grupos de estadios, pero no difirieron significativamente.

Por otro lado, al analizar los niveles de infección por *Bd* a lo largo del tiempo en la población de renacuajos de *G. riobambae,* no se encontraron diferencias significativas, pues los niveles de infección no variaron significativamente durante todo el tiempo de muestreo. El mayor promedio de nivel de infección detectado fue en el periodo de marzo a mayo en comparación con el resto de periodos. Así, en el periodo de marzo a mayo la temperatura promedio de estos tres meses fue la menor (13.91 °C) en comparación con los otros dos periodos, seguido, igualmente de la temperatura promedio de los meses de diciembre a febrero (14.07 °C) y por último el periodo donde se registró la mayor temperatura promedio, que fue en los meses de septiembre a noviembre (14.57 °C). Esto sugiere que potencialmente mientras menor es la temperatura mayor será el nivel de infección.

A diferencia del análisis de los niveles de infección a lo largo del tiempo en la población de renacuajos de *G. riobambae*, en la población de *P. unistrigatus* se encontraron diferencias significativas, es decir, existió una variación en los niveles de infección por *Bd* a lo largo del tiempo, siendo los meses de junio a agosto en donde se encontró mayor nivel de infección.

Se pudo observar que existió una fluctuación en los niveles de infección a medida que pasó el tiempo, ya que primero los niveles de infección disminuyeron y luego volvieron a incrementar. Estos resultados se asemejan a los resultados encontrados por Longo *et al.* (2010), en donde encontraron que los niveles de infección por *Bd* en dos

especies de ranas, *Eleutherodactylus coqui* y *E. portoricensi*s de Puerto Rico variaron significativamente entre las dos estaciones climáticas que posee dicho país.

Durante los meses de junio a agosto se registraron las temperaturas ambientales más altas (junio 28.33 °C, julio 27.88 °C y agosto 23.89 °C), y las más bajas precipitaciones (junio 0.30 mm, julio 0.60 mm y agosto 18.40 mm) durante todo el tiempo de estudio. Estas condiciones de temperatura y precipitación pudieron ser factores determinantes para el aumento de infección por *Bd* en la población de *P.unistrigatus*. Estas condiciones pudieron ejercer un estrés en los individuos, ya que estas especies de ranas tropicales son sensibles a los cambios climáticos sutiles (Burrowes *et al.,* 2004). La precipitación es un factor muy importante para los anfibios, debido a que éstos pierden agua a través de su piel, y sus riñones son incapaces de conservar el agua ya que la producción de orina es concentrada (Burrowes *et al.,* 2004). Se ha visto que estas especies de ranas dependen de la humedad de la vegetación para rehidratarse (Burrowes *et al.,* 2004), por lo que extensiones de la época seca pueden producir estrés afectando a su actividad reproductiva y al reclutamiento de los individuos (Burrowes *et al.,* 2004). Adicionalmente, con el aumento de las temperaturas también podría existir un incremento en la radiación ultravioleta B (UV-B), la cual puede afectar el sistema inmunológico del individuo (Blaustein *et al.,* 1998; Kiesecker *et al.,* 2001; Whitfield *et al.,* 2012) favoreciendo al desarrollo del quítrido y aumentado el nivel de infección en los individuos.

6.3 PREVALENCIA DE *Batrachochytrium dendrobatidis*

6.3.1 PREVALENCIA DE *Bd* EN RENACUAJOS DE LA RANA MARSUPIAL DE QUITO (*Gastrotheca riobambae*) Y EN CUTINES DE QUITO (*Pristimantis unistrigatus*)

Se pudo observar que a medida que transcurrieron los meses, existió una disminución en la prevalencia de la enfermedad en la población de renacuajos de *G. riobambae*, que correspondió a la dinámica anual que tuvo la población de ranas. El mayor promedio de prevalencia de *Bd* detectado fue en el periodo de septiembre a noviembre en comparación con el resto de periodos. Estos resultados difieren de los niveles de infección obtenidos en la población de renacuajos de *G. riobambae*, pues en los meses donde se encontró más prevalencia (septiembre a noviembre) existió menos nivel de infección, por lo que se puede asumir que estas dos variables no se encuentran relacionadas entre sí.

En este estudio la prevalencia (39%) encontrada en la población de renacuajos de *G. riobambae* fue mayor a la reportada por Manzano (2010) (33.94%). Esto puede deberse a que en este estudio se utilizó q-PCR, y al ser ésta más sensible y específica, puede detectar de mejor manera aquellos individuos que se encuentran con niveles muy bajos de infección con *Bd*, lo que en la PCR de punto final es menos probable (Hyatt *et al.*, 2007).

No obstante, la prevalencia encontrada no difiere significativamente a la reportada por Manzano (2010), debido principalmente a que las muestras analizadas provinieron del tejido de aparatos bucales, caso contrario, si hubieran provenido de hisopos, la diferencia que se esperaría encontrar entre las dos técnicas moleculares tendría una significación

mayor, como se vio anteriormente en la prevalencia detectada con PCR de punto final (4%) y q-PCR (14%) en muestras tomadas por medio de hisopos. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos por Manzano (2010), bajo la misma metodología empleada (PCR de punto final y muestras provenientes de tejido), se encontraron resultados similares, pues se detectó una prevalencia del 31% utilizando PCR en punto final y Manzano (2010) reporta una prevalencia del 33.94%, con lo que se puede suponer que la prevalencia de la enfermedad se ha mantenido estable en estos dos muestreos.

En cuanto a la prevalencia de la enfermedad en *P. unistrigatus*, no se encontraron diferencias significativas a lo largo del tiempo de muestreo, pues al parecer la prevalencia permanece constante a diferencia de los niveles de infección. Se pudo observar que en los meses de diciembre a febrero se encontró más prevalencia de *Bd* en comparación con los otros meses de muestreo. Además, se pudo ver que existieron pequeñas fluctuaciones (aumento y reducción) de la prevalencia de la enfermedad a lo largo del tiempo, pero al ser éstas muy pequeñas no fueron significativas. Se deduce que el quítrido presentó una dinámica anual en la población de *P. unistrigatus* y pudo estar ligada a factores ambientales como temperatura y precipitación. En los meses de diciembre a febrero se registró la menor temperatura media ambiental en comparación con los otros meses (13.19 °C), y una precipitación promedio de 99.5 mm. Se ha visto en el laboratorio que a temperaturas entre 7–10 °C, grandes cantidades de zoosporas, de *Bd*, son producidas por zoosporangio (Woodhams *et al.*, 2008), al haber lluvias, *P. unistrigatus* está en actividad reproductiva, por lo que más individuos se pueden contagiar al estar en contacto unos con otros.

Finalmente, no se encontraron diferencias significativas en la prevalencia de la enfermedad a lo largo del tiempo en las dos especies de anuros estudiados. En los periodos donde se encontró más prevalencia en *P. unistrigatus* (diciembre a febrero), no fue la mayor prevalencia registrada en la población de renacuajos de *G. riobambae* (septiembre a noviembre), con lo que la dinámica que presentó la enfermedad fue distintas en ambas especies (renacuajos de *G. riobambae* y *P. unistrigatus*).

Esto sugiere que cada especie reacciona de manera diferente ante un agente patógeno, ya que su dinámica no es igual al comparar las dos especies. Por esto, algunas especies son más susceptibles que otras (Kriger y Hero, 2007). De igual manera, al tener hábitats diferentes la ecología del quítrido cambiará (Kriger y Hero, 2007), pues los requerimientos no serán los mismos, ya que la una especie se encuentra en el agua (renacuajos), mientras que la otra especie es terrestre, y por su desarrollo directo no está directamente relacionada a pozas de agua.

6.4 DISTANCIA HACIA LA POZA Y LOS NIVELES DE INFECCIÓN DE LAS CUTINES DE QUITO (*Pristimantis unistrigatus*)

Al correlacionar la distancia a la que se encontraba cada individuo (*P. unistrigatus*) colectado de la poza con los niveles de infección (individuos positivos y negativos), se pudo observar una correlación significativa, en donde, los individuos resultantes positivos para *Bd* se encontraron más cerca de la poza. De igual manera se obtuvieron diferencias significativas entre los individuos positivos y negativos con respecto a la distancia de la poza, comprobando de esta manera que aquellos individuos positivos se encontraron más

cerca de la poza ($\bar{x}$= 25.56 m) y aquellos individuos negativos se encontraron más alejados ($\bar{x}$= 34.78 m).

Por último, se pudo observar individuos con infección por *Bd* hasta los 50 m de la poza, en donde, mientras más cerca de la poza estuvieran mayor fue el nivel de infección. Posiblemente, la causa para la contaminación en *P. unistrigatus* se deba al hábitat del sitio de la poza, debido a que se pueden encontrar juveniles o adultos de *G. riobambae* infectados por *Bd,* que probablemente al compartir refugios húmedos con *P. unistrigatus,* cuando las condiciones ambientales son estresantes, entren en contacto y sean contagiados. También existe la posibilidad de que en estos refugios se encuentren zoosporas de *Bd* enquistadas (Woodhams *et al.*, 2008), siendo otra posible causa para que *P. unistrigatus* se infecte con el quítrido. Por estas razones, mientras más alejados se encontraran la población de *P. nistrigatus* del sitio de la poza, tuvieran menos probabilidad de contraer la enfermedad

6.5 PROMEDIO DE INFECCIÓN vs. PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD EN LAS DOS ESPECIES DE ANUROS ESTUDIADOS

Al correlacionar el promedio de infección con la prevalencia en las poblaciones de renacuajos de *G. riobambae* y *P. unistrigatus*, no se encontraron regresiones significativas, demostrando que tanto el nivel de infección como la prevalencia, en las dos especies, son variables independientes (no depende una de la otra). Se encontraron pocos individuos contaminados por *Bd* (baja prevalencia) pero con un alto nivel de infección. De igual manera, se encontraron varios individuos contaminados por *Bd* (alta prevalencia), pero los niveles de infección no eran altos.

A pesar de no encontrar relación entre las dos variables (promedio de infección y prevalencia) en las poblaciones de las dos especies estudiadas, las diferencias entre la prevalencia y el promedio de infección fueron importantes, debido a que la prevalencia describe el estatus de infección en la población en un tiempo determinado, mientras que los niveles de infección proporcionan información sobre la respuesta de un subgrupo de individuos (infectados) al quítrido (Longo *et al.,* 2010). De tal manera que, cuando la quitridiomicosis se convierte en una enfermedad enzoótica, y las condiciones ambientales no son estresantes para los anfibios o actúan a favor de la fisiología del hongo, la prevalencia de la enfermedad puede ser alta, mientras que el nivel de infección es bajo (Longo *et al.,* 2010). Por otro lado, cuando las condiciones ambientales son estresantes para los anfibios (baja precipitación), la prevalencia no cambia significativamente, pero los individuos contaminados presentan altos niveles de infección por *Bd* (Longo *et al.,* 2010), por lo tanto, la baja prevalencia de la enfermedad no necesariamente implica un bajo nivel de infección o baja susceptibilidad a este patógeno en las ranas terrestres como ha sido sugerido por Kriger y Hero (2007).

Además, al correlacionar cada variable (promedio de infección y prevalencia) entre la población de las dos especies, para comprobar si existió alguna relación en el contagio por *Bd* entre renacuajos de *G. riobambae* y *P. unistrigatus*, no se encontraron regresiones significativas. Esto sugiere que la presencia del quítrido en *P. unistrigatus* no es consecuencia de la prevalencia de la enfermedad en los renacuajos, y el contagio, por el quítrido, puede deberse a otros factores. *P. unistrigatus*, al tener desarrollo directo, reducen de alguna manera su exposición a la fase infecciosa acuática de *Bd* (Olson *et al.,* 2013), por lo que una de las posibles causas por las cuales estén contrayendo el hongo puede deberse

al potencial contacto con la piel infectada (Kriger y Hero, 2007) de metamorfos o adultos de *G. riobambae*.

Algunos metamorfos (8) que fueron ocasionalmente encontrados durante el tiempo de muestreo, fueron analizados y presentaron grandes cantidades de zoosporas (un metamorfo encontrado dentro del sitio de la poza tuvo 78302 zoosporas/µL y el nivel más alto registrado 3494 zoosporas/mm), con lo que posiblemente sean la principal fuente de contagio para *P. unistrigatus*.

6.6 PROMEDIO DE INFECCIÓN Y PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD CON FACTORES AMBIENTALES

Al no encontrar relación de las variables entre las dos poblaciones de anuros estudiadas, se puede presumir que la dinámica del hongo patógeno podría estar relacionada con factores ambientales, como la temperatura y la precipitación (Kriger y Hero, 2006; Pounds *et al.*, 2006; Bosch *et al.*, 2007; Longo *et al.*, 2010).

6.6.1 PROMEDIO DE INFECCIÓN vs. TEMPERATURA

Al correlacionar el promedio de infección encontrado en la población de renacuajos de *G. riobambae* con la temperatura de la poza, se pudo observar que existió una correlación negativa en todas las temperaturas analizadas (máxima, media y mínima), indicando que posiblemente a medida de que aumentó la temperatura el promedio de infección disminuyó. Sin embargo, se puede ver que el punto que se encuentra alejado, es aquel que está arrastrando a la regresión. A pesar de que el rango óptimo para el desarrollo

de quítrido se encuentra entre 17–25 °C (Piotrowski *et al.*, 2004), se pudo observar que posiblemente más individuos se encuentren infectados en temperaturas que se encuentran entre los 13.50–13.70 °C, resultado de las temperaturas medias de la poza.

Las temperaturas máximas de la poza registradas fueron desde los 13 °C hasta los 15 °C, en donde se pudo ver más individuos infectados desde los 13.60 °C hasta los 15 °C. Estas son temperaturas en las cuales el desarrollo del quítrido es favorable, a pesar de que no se encuentra en su rango óptimo para su crecimiento (17–25 °C) (Piotrowski *et al.*, 2004), pero por sus características puede crecer en un amplio rango de temperaturas (4–25 °C) (Piotrowski *et al.*, 2004).

Por otro lado, al correlacionar el promedio de infección encontrado en la población de *P. unistrigatus* con la temperatura ambiental, se puede observar que existe una correlación positiva, en donde, al correlacionar las temperaturas máximas y medias ambientales con el promedio de infección, se puede observar que a medida de que aumenta la temperatura aumenta el promedio de infección, a diferencia de lo que pasa en la población de renacuajos.

Las temperaturas máximas ambientales registradas van desde los 17.50 °C hasta los 30 °C, en donde se puede ver más individuos infectados desde los 17.50 °C hasta los 25 °C, coincidiendo con las temperaturas óptimas para el crecimiento del quítrido.

Sin embargo, al correlacionar el promedio de infección con las temperaturas mínimas ambientales, la correlación resultó ser negativa, indicando que a medida de que

sube la temperatura el promedio de infección disminuye. Se puede observar que la mayoría de individuos infectados se encuentran entre los 9–10 °C.

Al tener el quítrido un amplio rango de temperaturas para su desarrollo, le permite la habilidad de persistir y de crecer a temperaturas bajas (4 °C), aunque sea lentamente, e inclusive de pasar el invierno en el hospedero y a medida de que las temperaturas se vayan incrementando, el quítrido luego puede reproducirse rápidamente, afectando al hospedero (Piotrowski *et al.*, 2004).

Se han realizado algunos estudios en el laboratorio donde se indica que el quítrido crece de mejor manera en condiciones frías (Longcore *et al.*, 1999; Piotrowski *et al.*, 2004), adicionalmente estudios realizados por Retallick *et al.* (2004) mostraron un pico estacional de infección por *Bd* durante los meses más fríos del año en una región geográfica de Australia. De igual manera Kriger y Hero (2006) encontraron que las ranas que se infectaron durante el invierno podrían eliminar la infección durante los meses más cálidos, pues encontraron que la prevalencia y severidad de la enfermedad aumenta a temperaturas más frías. Longo *et al.* (2010), encontró que los niveles de infección en dos especies de ranas de Puerto Rico (*Eleutherodactylus coqui* y *E. portoricensi*s), fueron significativamente altos en la estación seca-fría, por lo que el nivel de infección puede estar relacionado de mejor manera con temperaturas bajas que altas.

6.6.2 PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD vs. TEMPERATURA

Al analizar la prevalencia de la enfermedad presente en la población de renacuajos de *G. riobambae* y correlacionarla con las diferentes temperaturas (máxima y media), se

pudo observar claramente que existió una correlación significativa, en donde, mientras aumentó la temperatura en la poza, aumentó la prevalencia de la enfermedad en la población. Tanto en las temperaturas máximas como medias de la poza, la prevalencia de la enfermedad aumentó a medida de que subió la temperatura. Lo contrario ocurrió al correlacionar la prevalencia con las temperaturas mínimas, pues no se observó una regresión significativa y al parecer la prevalencia se mantuvo a cualquier temperatura mínima. Se puede inferir que la prevalencia de la enfermedad en la población de renacuajos de *G. riobambae* está estrechamente relacionada con el incremento de las temperaturas máximas de la poza. Manzano (2010), también reporta que la prevalencia de la enfermedad está relacionada con la temperatura de la poza, indicando que a mayor temperatura más prevalencia se encontrará, coincidiendo con los resultados aquí expuestos, pues la regresión es altamente significativa. Al parecer la temperatura es un factor clave para que más renacuajos contraigan la infección (Pounds *et al.,* 2006; Alford *et al.,* 2007); a diferencia del análisis del promedio de infección, el cual resultó ser inversamente proporcional a la temperatura.

Por otra parte, al correlacionar la prevalencia de la enfermedad presente en la población de *P. unistrigatus* con la temperatura ambiental, se pudo observar que existió una correlación negativa en todas las temperaturas analizadas (máxima, media y mínima), indicando que a medida de que aumentó la temperatura la prevalencia de la enfermedad disminuyó. Esto difiere de la correlación encontrada entre la prevalencia de la enfermedad con la temperatura ambiental en la población de renacuajos.

Esta diferencia entre las dos especies, puede deberse al diferente hábitat que habitan, pues los renacuajos se encuentran en el agua, donde la temperatura es diferente a

la del ambiente y no varía tanto, en cambio *P. unistrigatus* experimentan temperaturas ambientales que varían mucho a lo largo del día. Al ser especies diferentes y estar en ambientes distintos, la dinámica del quítrido en las poblaciones de anuros estudiados fue diferente. El incremento de temperatura favoreció al aumento de la prevalencia de la enfermedad en los renacuajos de *G. riobambae*, mientras que lo contrario ocurrió en la población de *P. unistrigatus*, donde la disminución de la temperatura favoreció al incremento de la prevalencia.

Al correlacionar la prevalencia de la enfermedad encontrada en la población de *P. unistrigatus* con las temperaturas máximas ambientales, se pudo observar que la mayoría de individuos infectados se encontraron entre los rangos de 17.50 °C hasta 25 °C, coincidiendo con las temperaturas óptimas para el crecimiento del quítrido. No obstante, al correlacionar la prevalencia de la enfermedad encontrada en la población de *P. unistrigatus* con las temperaturas mínimas ambientales, se pudo observar de una manera más clara que a medida de que aumentó la temperatura, la prevalencia de la enfermedad disminuyó. Lo contrario se observó al correlacionar los niveles de infección por *Bd* de la población de *P. unistrigatus*, donde a medida que aumentó la temperatura, los niveles de infección también aumentaron.

Whitfield *et al.* (2012), indican una fuerte variación estacional en la prevalencia de *Bd*, con mayor prevalencia de la enfermedad en los meses con temperaturas más frías. Adicionalmente, encontraron una fuerte relación negativa entre la prevalencia y la temperatura media del aire, donde la prevalencia aumenta exponencialmente a medida que la temperatura disminuye.

6.6.3 RELACIÓN ENTRE EL PROMEDIO DE INFECCIÓN Y LA PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD CON LA PRECIPITACIÓN

Al correlacionar las dos variables, promedio de infección y prevalencia, de la población de *P. unistrigatus* con la precipitación, se pudo observar que mientras más lluvia se registró, disminuyó el promedio de infección. En consecuencia, se pudo ver que existió más infección a menos precipitación, resultado que concuerda con los obtenidos por Longo *et al.* (2010), en donde, reporta que existe mayor nivel de infección en aquellas épocas secas con temperaturas frías.

Los cambios en la temperatura y precipitación (cambios climáticos) provocan a los anfibios un impacto negativo en su comportamiento y almacenamiento de energía, y como consecuencia los individuos tienden a moverse, lo que les hace más vulnerables a enfermedades (Burrowes *et al.,* 2004).

En la época de lluvias fue muy difícil encontrar a *P. unistrigatus* dentro de la poza, posiblemente porque al haber humedad y agua en la vegetación no requerían buscar la humedad de la poza. Sin embargo, en la época seca, se encontraron bastantes individuos junto a la poza, pues al estar el terreno seco, las ranas bajan al sitio para encontrar humedad. La agregación de la población en la poza podría facilitar el contagio de la enfermedad, pues al encontrarse estresadas por falta de agua, se desplazan a micro hábitats más húmedos, en donde, puede haber una fuente de infección con quítrido (Burrowes *et al.,* 2004).

Resultados contrarios se obtuvieron cuando se correlacionó la prevalencia de la enfermedad con la precipitación, ya que no se vio una tendencia de aumento o disminución de la prevalencia. Se puede asumir que la prevalencia de quitridiomicosis no está relacionada con la precipitación, pues existió prevalencia con o sin lluvias. Kriger y Hero (2006) en su estudio encontraron una relación significativa pero negativa entre la precipitación y la prevalencia de la enfermedad, resultado que contradice lo que se esperaba, ya que *Bd* es un patógeno que se transmite por el agua. Adicionalmente, Whitfield *et al.* (2012) en su estudio señala que no hay una relación directa entre la prevalencia de la enfermedad y la precipitación. La prevalencia de la enfermedad, en la población de *P. unistrigatus* no está estrechamente relacionada con la precipitación, pues se pudo observar que los individuos pueden estar infectados con niveles altos o bajos de lluvia. Esto a diferencia de lo que se observó en los niveles de infección, puesto que existieron más individuos infectados a precipitaciones más bajas. La falta de lluvias obligan a *P. unistrigatus* a compartir refugios húmedos durante el día, por lo que en esta época es más probable que se encuentren con juveniles o adultos de *G. riobambae* que puedan estar infectados.

7. CONCLUSIONES

El uso de PCR en tiempo real (q-PCR) es una herramienta con mayor sensibilidad para la detección del hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), al compararla con PCR de punto final, por lo que se sugiere su uso como método para diagnosticar quitridiomicosis en poblaciones de anuros. En todos los ensayos realizados, q-PCR obtuvo como resultado mayor prevalencia de *Bd.*

La presencia de falsos negativos puede ser un factor determinante para estimar con un margen de error la prevalencia real de la enfermedad en la población que se requiera estudiar. Por esta razón, utilizar la técnica más sensible sería la mejor opción.

Para evitar el sacrificio de los individuos y diagnosticar presencia de *Bd*, se puede tomar la muestra por medio de hisopos y analizarla con q-PCR, de esta manera se convierte en una técnica no letal y una alternativa aconsejable para el diagnóstico de quitridiomicosis.

Se confirma que todavía existe presencia del quítrido en la población de renacuajos de *Gastrotheca riobambae* que habitan en una poza del parque Metropolitano de Quito, con una prevalencia de la enfermedad del 39% en la población estudiada.

El presente estudio reporta por primera vez la presencia de *Bd* en la población de *Pristimantis unistrigatus* que habita cerca de la poza del Parque Metropolitano Guangüiltagua de Quito.

Los niveles de infección por *Bd* presentes en *Pristimantis unistrigatus* variaron a lo largo del tiempo.

Se encontró un alto grado de relación entre los individuos positivos (*Pristimantis unistrigatus*), con altos niveles de infección por *Bd*, y su cercanía a la poza.

No hubo una relación significativa entre el promedio de infección y la prevalencia de la enfermedad dentro y entre las dos especies de anuros estudiados.

La presencia del quítrido en la población de *Pristimantis unistrigatus* aparentemente no es por causa directa de la prevalencia de la enfermedad en la población de los renacuajos de *Gastrotheca riobambae*. Existe la posibilidad de que *Pristimantis unistrigatus* se contamine por compartir refugios húmedos, en donde, probablemente pudieron estar en contacto con adultos o juveniles infectados de *Gastrotheca riobambae*.

Se encontró una regresión significativa entre la temperatura máxima de la poza y la prevalencia de la enfermedad en los renacuajos de *Gastrotheca riobambae*, pues a medida que aumentó la temperatura, aumentó la prevalencia en la población.

No se encontraron regresiones significativas entre la temperatura ambiental, la precipitación y la prevalencia de la enfermedad en la población de *P. unistrigatus*.

8. RECOMENDACIONES

Tomar muestras celulares por medio de hisopos a renacuajos con estadios mayores a 34, debido a que el hisopo puede ingresar de una manera más fácil en la boca del renacuajo; con estadios menores, hay que tener cuidado, ya que el hisopo es muy grande y puede ocasionar daños al individuo.

Utilizar la técnica molecular más sensible y eficaz para la detección del quitrido, en este caso PCR en tiempo real (q-PCR) para de esta manera eliminar los posibles falsos positivos y falsos negativos que puedan presentarse.

Para obtener resultados más precisos en el diagnóstico de *Bd* en cualquier población a estudiar, utilizar q-PCR con muestras provenientes de tejido; pero si no se requiere sacrificar al individuo se puede tomar muestras celulares con hisopos y analizarlos con q-PCR.

Es muy importante trabajar en un lugar estéril, libre de residuos de ADN que puedan contaminar las muestras y resultar en falsos positivos.

Es importante realizar estudios de factores asociados con posibles extinciones en anuros, por lo que se sugiere analizar la dinámica de quitridiomicosis en investigaciones *ex situ.*

9. LITERATURA CITADA

Alford, R. A., Bradfield, K. S., y Richards, S. J. 2007. Ecology: global warming and amphibian losses. *Nature*, *447*(7144), E3–4.

Annis, S. L., Dastoor, F. P., Ziel, H., Daszak, P., y Longcore, J. E. 2004. A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases*, *40*(3), 420–8.

Arnhem, C., y Kiessling, N. 2006. Infection of amphibians with chytrid fungus resulting in chytridiomycosis. (pp. 1–70).

Ballagi-Pordany, A., y Belak, S. 1996. The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. *Molecular and Cellular Probes*, *10*, 159–164.

Beebee, T. J. C., Flower, R. J., Stevenson, A. C., Patrick, S. T., Appleby, P. G., Fletcher, C., Marsh, C., Natkanski, J., Rippey, B., y Battarbee, R. W. 1990. Decline of the Natterjack Toad *Bufo calamita* in Britain: Palaeoecological, Documentary and Experimental Evidence for Breeding Site Acidification. *Biological Conservation*, *53*, 1–20.

Berger, L., Hyatt, A. D., Olsen, V., Hengstberger, S. G., Boyle, D., Marantelli, G., Humphreys, K., y Longcore, J. E. 2002. Production of polyclonal antibodies to *Batrachochytrium dendrobatidis* and their use in an immunoperoxidase test for chytridiomycosis in amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms*, *48*, 213–20.

Berger, L., Hyatt, A. D., Speare, R., y Longcore, J. E. 2005. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, *68*(1), 51–63.

Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A. A., Goggin, C. L., Slocombe, R., Ragan, M. A., Hyatt, A. D., McDonald, K. R., Hines, H. B., Lips, K. R., Marantelli, G., y Parkes, H. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 95*, 9031–9036.

Berger, L., Speare, R., y Kent, A. 1999. Diagnosis of chytridiomycosis in amphibians by histologic examination. *Zoos' print journal*, *15*(1), 184–190.

Blaustein, A. R., Kiesecker, J. M., Chivers, D. P., Hokit, D. G., Marco, A., Belden, L. K., y Hatch, A. 1998. Effects of ultraviolet radiation on amphibians: field experiments. *American Zoologist*, *38*, 799–812.

Bosch, J., Carrascal, L. M., Durán, L., Walker, S., y Fisher, M. C. 2007. Climate change and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of Central Spain; is there a link? *Proceedings of the Royal Society*, *274*, 253–60.

Boyle, D. G., Boyle, D. B., Olsen, V., Morgan, J. A. T., y Hyatt, A. D. 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis *(Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, *60*, 141–8.

Briggs, C., y Vredenberg, V. 2009. Chytrid Swab Protocol. BriggsNIH Group, UC Berkeley. http://www.amphibiaweb.org/chytrid/swab_protocol.html. [Consultado: Noviembre 2014].

Burrowes, P., Joglar, R., y Green, D. 2004. Potential causes for amphibian declines in Puerto Rico. *Herpetologica*, *60*(2), 141–154.

Bustamante, M. R., Ron, S. R., y Coloma, L. A. 2005. Cambios en la Diversidad en Siete Comunidades de Anuros en los Andes de Ecuador. *Biotropica*, *37*(2), 180–189.

Coloma, L. 1995. Ecuadorian frogs of the genus *Colostethus* (Anura: Dendrobatidae). *Miscellaneous Publications of the Natural History Museum, Univ. of Kansas*, (87), 1–72.

Daszak, P., Cunningham, A., y Hyatt, A. D. 2003. Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*, *9*, 141–150.

Drost, C., y Fellers, G. 1996. Collapse of a regional frog fauna in the Yosemite area of the California Sierra Nevada, USA. *Conservation Biology*, *10*(2), 414–425.

Espinoza-Gracia, I. 2009. *Identificación, reproducción e inoculación de hongos del suelo del Parque Metropolitano Guangüiltagua en eucalipto utilizando técnicas de compostaje*. Doctoral dissertation, Universidad Internacional SEK.

Eterovick, P., Oliveira de Queiroz Carnaval, A. C., Borges-Nojosa, D., Silvano, D., Segalla, M., y Sazima, I. 2005. Amphibian Declines in Brazil: An Overview. *Biotropica*, *37*(2), 166–179.

Farrer, R. A., Henk, D. A., Garner, T. W. J., Balloux, F., Woodhams, D. C., y Fisher, M. C. 2013. Chromosomal copy number variation, selection and uneven rates of recombination reveal cryptic genome diversity linked to pathogenicity. *PLoS Genetics*, *9*(8), e1003703.

Farrer, R., Weinert, L., Bielby, J., Garner, T., Balloux, F., Clare, F., Boschc, J., Cunningham, A. A., Weldond, Ch., du Preez, L. H., Anderson, L., Kosakovsky Pond, S. L., Shahar-Golan, R., y 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*, *108*(46), 18732–18736.

Fellers, G. M., Green, D. E., y Longcore, J. E. 2001. Oral hytridiomycosis in the mountain yellow-legged frog (*Rana muscosa*). *Copeia*, *4*, 945–953.

Fey, A., Eichler, S., Flavier, S., Christen, R., Hofle, M. G., y Guzmán, C. A. 2004. Establishment of a Real-Time PCR-Based Approach for Accurate Quantification of Bacterial RNA Targets in Water, Using *Salmonella* as a Model Organism. *Microbiology*, *70*, 3618–3623.

Fisher, M. C., Bosch, J., Yin, Z., Stead, D. A., Walker, J., Selway, L., Alistair, J., Brown, P., Walker, L. A., Gow, N. A., Stajich, J. E. y Garner, T. W. 2009. Proteomic and phenotypic profiling of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* shows that genotype is linked to virulence. *Molecular Ecology*, *18*(3), 415-429.

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

Freire, D., Fernández, C., y Nogales, F. 2006. Analysis of the presence of the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis Bd*. in the Amphibian populations of 8 localities in the southern Ecuadorian Andes. *Lyonia*, *9*(1), 7–18.

Frenkel, C., Vallejo, A., Félix-Novoa, C., y Ron, S. R. 2010. *Gastrotheca riobambae.* En: Ron, S. R., Guayasamín, J. M., Yanez-Muñoz, M. H., Merino-Viteri, A., Ortiz, D. A. y Nicolalde, D. A. 2014. AmphibiaWebEcuador. Version 2014.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <http://zoologia.puce.edu.ec/vertebrados/anfibios/FichaEspecie.aspx?Id=1136> [Consultado: Noviembre 2014].

Garwood, J., Anderson, C., y Ricker, S. 2010. Bullfrog predation on a juvenile coho salmon in Humboldt County, California. *Northwestern Naturalist*, *91*, 99–101.

Guayasamín, J. M., Mendoza, A. M., Longo, A. V., Zamudio, K. R., y Bonaccorso, E. 2014. High prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in an Andean frog community (Reserva Las Gralarias , Ecuador). *Amphibian y Reptile Conservation*, *8*(1), 33–44.

Hayes, T. B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A. A., y Vonk, A. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(8), 5476–80.

Houlahan, J., Findlay, C., Schmidt, B., Meyer, A., y Kuzmin, S. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature*, *404*, 752–755.

Hyatt, A. D., Boyle, D. G., Olsen, V., Boyle, D. B., Berger, L., Obendorf, D., Dalton, A., Kriger, K., Hero, M., Hines, H., Phillott, R., Campbell, R., Marantelli, G., Gleason, F., y Coiling, A. 2007. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, *73*, 175–92.

IUCN 2014. *The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3*. <http://www.iucnredlist.org>. [Consultado: Noviembre 2014].

James, T., Litvintseva, A., Vilgalys, R., Morgan, J., Taylor, J., Fisher, M., Berger, L., Weldon, Ch., du Preez, L., y Longcore, J. E. 2009. Rapid global expansion of the fungal disease chytridiomycosis into declining and healthy amphibian populations. *PLoS Pathogens*, *5*(5), e1000458.

Kiesecker, J., Blaustein, A., y Belden, L. 2001. Complex causes of amphibian population declines. *Nature*, *410*, 681–684.

Kriger, K. M., Hero, J. M., y Ashton, K. J. 2006. Cost efficiency in the detection of chytridiomycosis using PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, *71*, 149–54.

Kriger, K. M., y Hero, J. M. 2006. Large-scale seasonal variation in the prevalence and severity of chytridiomycosis. *Journal of Zoology*, *271*(3), 1-8.

Kriger, K. M., y Hero, J. M. 2007. The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is non-randomly distributed across amphibian breeding habitats. *Diversity and Distributions*, *13*, 781–788.

Kriger, K. M., Hines, H. B., Hyatt, A. D., Boyle, D. G., y Hero, J. M. 2006. Techniques for detecting chytridiomycosis in wild frogs: comparing histology with real-time Taqman PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, *71*, 141–8.

Lescano, J. N., Longo, S., y Robledo, G. 2013. Chytridiomycosis in endemic amphibians of the mountain tops of the Córdoba and San Luis ranges, Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms*, *102*, 249–54.

Lips, K. R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J. D., Alford, R. A., Voyles, J., Carey, C., Livo, L., Pessier, A. P., y Collins, J. P. 2006. Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(9), 3165–3170.

Lips, K. R., Burrowes, P. A., Mendelson, J. R., y Parra-Olea, G. 2005. Amphibian population declines in Latin America: A Synthesis1. *Biotropica*, *37*(2), 222–226.

Lips, K. R., Burrowes, P. A., Mendelson, J. R., y Parra-Olea, G. 2005. Amphibian Declines in Latin America : Widespread Population Declines Extinctions, and Impacts. *Biotropica*, *37*(2), 163–165.

Lips, K., Green, D., y Papendick, R. 2003. Chytridiomycosis in wild frogs from southern Costa Rica. *Journal of Herpetology*, *37*(1), 215–218.

Longcore, J. E., Pessier, A., y Nichols, D. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, *91*(2), 219–227.

Longo, A. V., Burrowes, P. A., y Joglar, R. L. 2010. Seasonality of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in direct-developing frogs suggests a mechanism for persistence. *Diseases of Aquatic Organisms*, *92*, 253–60.

Manzano, A. (2010). *Prevalencia de quitridiomicosis en la población larvaria de Gastrotheca riobambae del Parque Metropolitano de Quito*. Tesis de Ingeniería en Biotecnología, Escuela Politécnica del Ejército (ESPE).

Martel, A., Spitzen-van der Sluijs, A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M. C., Woeltjes, A., Bosman, W., Chiers, K., Bossuyt, F., y Pasmans, F. 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*, 15325–9.

McMahon, T. A., Halstead, N. T., Johnson, S., Raffel, T. R., Romansic, J. M., Crumrine, P. W., Boughton, R. K., Martin, L. B., y Rohr, J. R. 2011. The fungicide chlorothalonil is nonlinearly associated with corticosterone levels, immunity, and mortality in amphibians. *Environmental Health Perspectives*, *119*(8), 1-29.

Menéndez-Guerrero, P., y Graham, C. 2013. Evaluating multiple causes of amphibian declines of Ecuador using geographical quantitative analyses. *Ecography*, *36*, 1-14.

Merino-Viteri, A., Coloma, L. A., y Almendáriz, A. 2005. Los *Telmatobius* de los Andes de Ecuador y su disminución poblacional. *Monografías de Herpetología*, *7*, *9-37.*

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

Morgan, J. A. T., Vredenburg, V. T., Rachowicz, L. J., Knapp, R. A., Stice, M. J., Tunstall, T., Bingham, R. E., Parker, J. M., Longcore, J. E., Moritz, C., Briggs, C. J., y Taylor, J. W. 2007. Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(34), 13845–50.

Oliveira de Queiroz Carnaval, A. C., Puschendorf, R., Peixoto, O. L., Verdade, V. K., y Rodrigues, M. T. 2006. Amphibian Chytrid Fungus Broadly Distributed in the Brazilian Atlantic Rain Forest. *EcoHealth*, *3*, 41–48.

Olson, D. H., Aanensen, D. M., Ronnenberg, K. L., Powell, C. I., Walker, S. F., Bielby, J., Garner, T. W. J., Weaver, G., y Fisher, M. C. 2013. Mapping the global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the amphibian chytrid fungus. *PloS One*, *8*(2), e56802.

Pereira, C., Rosa Di, I., Fagotti, A., Simoncelli, F., Pascolini, R., y Mendoza, L. 2005. The pathogen of frogs *Amphibiocystidium ranae* is a member of the order dermocystida in the class mesomycetozoea. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(1), 192–198.

Picco, A. M., y Collins, J. P. 2008. Amphibian commerce as a likely source of pathogen pollution. *Conservation Biology*, *22*(6), 1582–9.

Piotrowski, J. S., Annis, S. L., y Longcore, J. E. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a Chytrid Pathogen of Amphibians. *Mycologia*, *96*(1), 9–15.

Pounds, J. A., Bustamante, M. R., Coloma, L. A., Consuegra, J. A., Fogden, M. P., Foster, P. N., La Marca, E., Masters, K. L., Merino-Viteri, A., Puschendorf, R., Ron, S. R., Sánchez-Azofeifa, G. A., Still, C. J.,y Young, B. E. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, *439*, 161–167.

Pounds, A. J., y Crump, L. M. 1994. Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Conservation Biology*, *8*(1), 72–85.

Proaño-Bolaños, C., Merino-Viteri, A., Peña-Loyola, P., y Salazar-V, D. 2007. A Midlatitude report of *Batrachochytrium dendrobatidis* In Ecuador. *Froglog*, (82), 1–4.

Rachowicz, L. J., Hero, J. M., Alford, R. A., Taylor, J. W., Morgan, J. A. T., Vredenburg, V. T., Collins, J. P., y Briggs, C. J. 2005. The Novel and Endemic Pathogen Hypotheses: Competing Explanations for the Origin of Emerging Infectious Diseases of Wildlife. *Conservation Biology*, *19*(5), 1441–1448.

Rachowicz, L., y Vredenburg, V. 2004. Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Diseases of Aquatic Organisms*, *61*, 75–83.

Retallick, R. W. R., McCallum, H., y Speare, R. 2004. Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community post-decline. *PLoS Biology*, *2*(11), e351.

Retallick, R. W. R., Miera, V., Richards, K. L., Field, K. J., y Collins, J. P. 2006. A non-lethal technique for detecting the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* on tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms*, *72*(1), 77–85.

Rodríguez, D., Becker, C. G., Pupin, N. C., Haddad, C. F. B., y Zamudio, K. R. 2014. Long-term endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic Forest of Brazil. *Molecular Ecology*, *23*(4), 774–87.

Ron, S. R., Duellman, W. E., Coloma, L. A., y Bustamante, M. R. 2003. Population decline of the Jambato toad *Atelopus ignescens* (Anura: Bufonidae) in the Andes of Ecuador. *Journal of Herpetology*, *37*(1), 116–126.

Ron, S. R., Frenkel, C., Varela-Jaramillo, A., y Guayasamín, J. M. 2012. *Pristimantis unistrigatus.* En: Ron, S. R., Guayasamín, J. M., Yanez-Muñoz, M. H., Merino-Viteri, A., Ortiz, D. A, y Nicolalde, D. A. 2014. AmphibiaWebEcuador. Version 2014.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

<http://zoologia.puce.edu.ec/vertebrados/anfibios/FichaEspecie.aspx?Id=1489> [Consultado: Noviembre 2014].

Ron, S. R., Guayasamín, J. M., Yanez-Muñoz, M. H., Merino-Viteri, A., Ortiz, D. A., y Nicolalde, D. A. 2014. AmphibiaWebEcuador. Version 2014.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/anfibios> [Consultado: Noviembre 2014].

Ron, S., y Merino-Viteri, A. 2000. Declinación de anfibios del Ecuador: Información general y primer reporte de chytridiomycosis para Sudamérica. *FrogLog*, *42*: 2–3.

Ron, S. 2005. Predicting the Distribution of the Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica*, *37*(2), 209–221.

Rosenblum, E. B., James, T. Y., Zamudio, K. R., Poorten, T. J., Ilut, D., Rodríguez, D., Eastman, J., Richards–Hrdlicka, K., Joneson, S., Jenkinson, T. S., Longcore, J. E., Parra Olea, G., Toledo, L. F., Arellano, M. L., Medina, E. M., Restrepo, S., Flechas, S. V., Berger, L., Briggs, C. J., y Stajich, J. E. 2013. Complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed with genome resequencing data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(23), 9385–90.

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.

Schloegel, L. M., Toledo, L. F., Longcore, J. E., Greenspan, S. E., Vieira, C. A., Lee, M., Zhao, S., Wangen, C., Ferreira, C. M., Hipolito, M., Davies, A. J., Cuomo, C.,

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

Schmittgen, T. D., Zakrajsek, B. A., Mills, A. G., Gorn, V., Singer, M. J., y Reed, M. W. 2000. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Analytical Biochemistry*, *285*, 194–204.

Smith, C. J., y Osborn, A. M. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, *67*, 6–20.

Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S., Fischman, D. L., y Waller, R. W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, *306*(5702), 1-5.

Vizcaíno, M. C., Barnes, C. W., y Ordóñez, M. E. 2013. Estructuración genética de muestras del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* en Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, (34), 47–60.

Voyles, J., Vredenburg, V. T., Tunstall, T. S., Parker, J. M., Briggs, C. J., y Rosenblum, E. B. 2012. Pathophysiology in mountain yellow-legged frogs (*Rana muscosa*) during a chytridiomycosis outbreak. *PloS One*, *7*(4), e35374.

Voyles, J., Young, S., Berger, L., Campbell, C., Voyles, W. F., Dinudom, A., Cook, D., Webb, R., Alford, R. A., Skerratt, L. F., y Speare, R. 2009. Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science*, *326*, 582–585.

Whitfield, S. M., Kerby, J., Gentry, L. R., y Donnelly, M. A. 2012. Temporal Variation in Infection Prevalence by the Amphibian Chytrid Fungus in Three Species of Frogs at La Selva, Costa Rica. *Biotropica*, *44*(6), 779–784.

Woodhams, D. C., Alford, R. A., Briggs, C. J., Johnson, M., y Rollins-Smith, L. A. 2008. Life-history trade-offs influence disease in changing climates: Strategies of an amphibian pathogen. *Ecology*, *89*(6), 1627–1639.

10. FIGURAS



Figura 1. Sitio de Estudio. Poza del Parque Metropolitano de Guangüiltagua de Quito.



Figura 2. Renacuajo de la Rana Marsupial de Quito (*Gastrotheca riobambae*).



Figura 3. Cutín de Quito (*Pristimantis unistrigatus*).



Figura 4. Toma de muestras por medio de hisopos a *Pristimantis unistrigatus*.

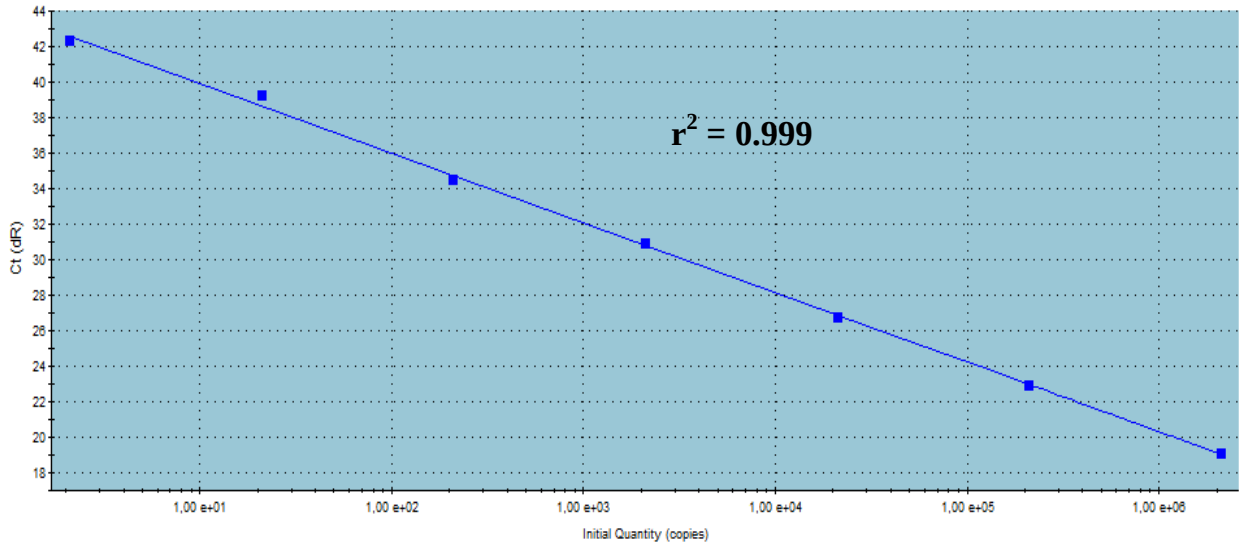


Figura 5. Curva Estándar a partir de valores de Ct. Rango de 2.1 moléculas de *Bd* x $10e^{6}$/µl (máxima concentración) hasta 2.1 moléculas de *Bd* x $10e^{0}$/µl (mínima concentración).

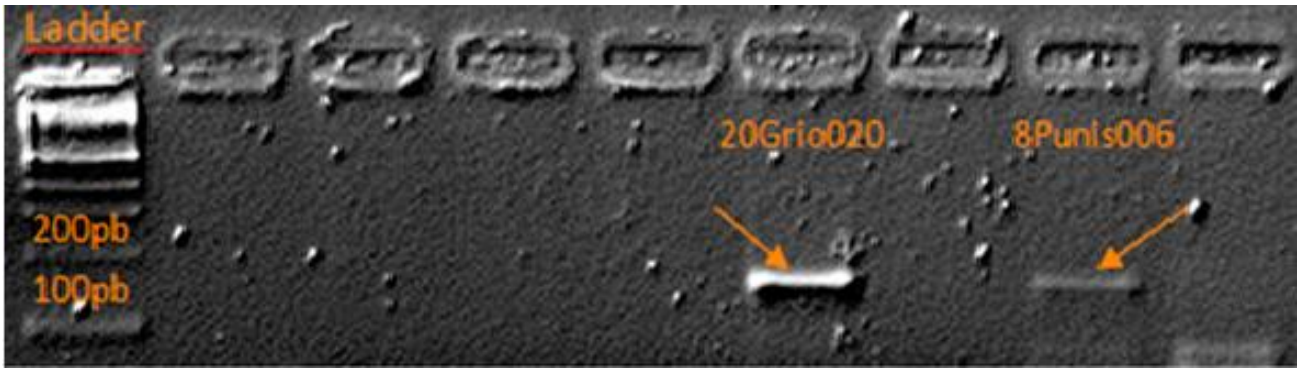


Figura 6. Fotografía de gel de agarosa 3%. Se muestra el producto de la amplificación de las regiones ITS-1 e ITS-2 (147pb) del quítrido *Batrachochytrium dendrobatidis* de dos muestras positivas (20Grio020 y 8Punis006, carriles 5 y 7 respectivamente). En el primer carril se corrió un marcador de peso de 100pb. El último carril es un control negativo.

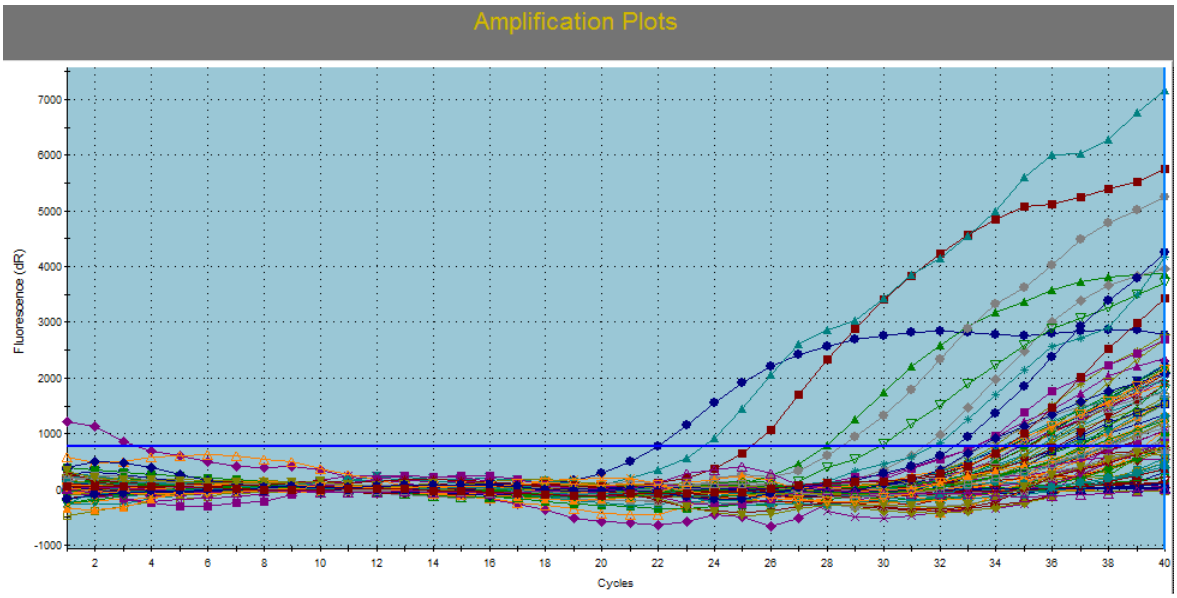


Figura 7. Resultados q-PCR de 96 muestras desconocidas. Análisis en programa Mxpro. Aquellas muestras que sobrepasan el umbral de fluorescencia (línea azul) son positivas y para cada una se otorga un valor de Ct que será inversamente proporcional a la cantidad de zoosporas.

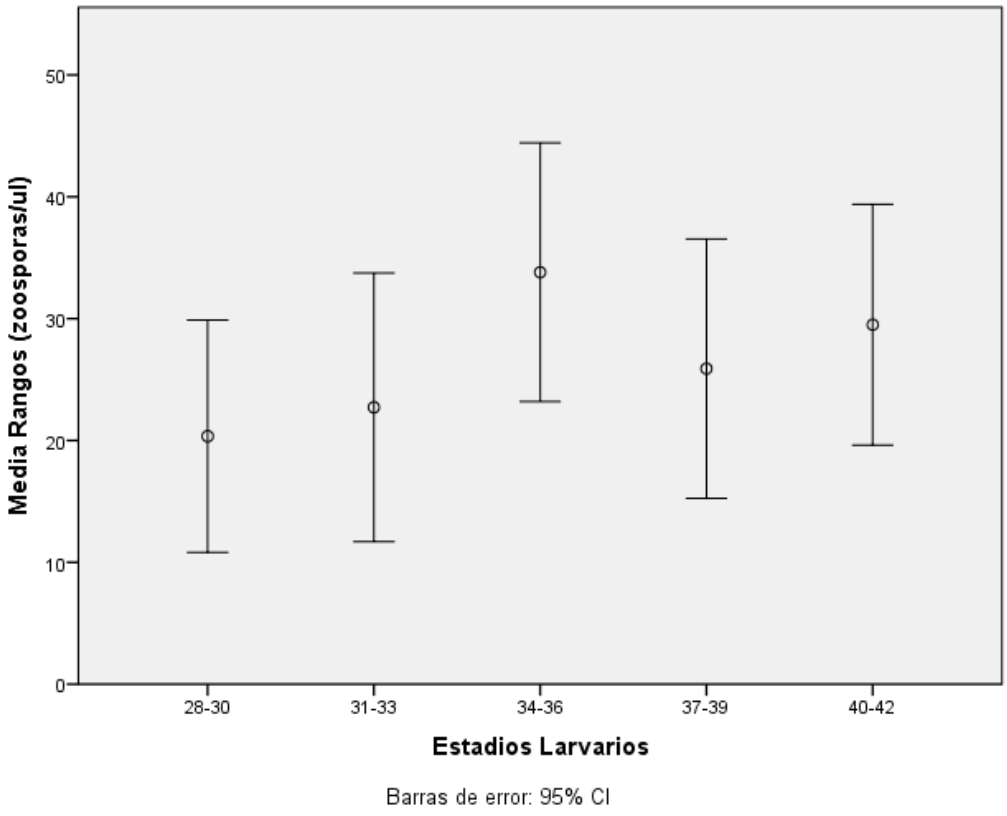


Figura 8. Comparación de los promedios de niveles de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en diferentes estadios larvarios de *Gastrotheca riobambae*. *N* = 53 individuos positivos para *Bd*.

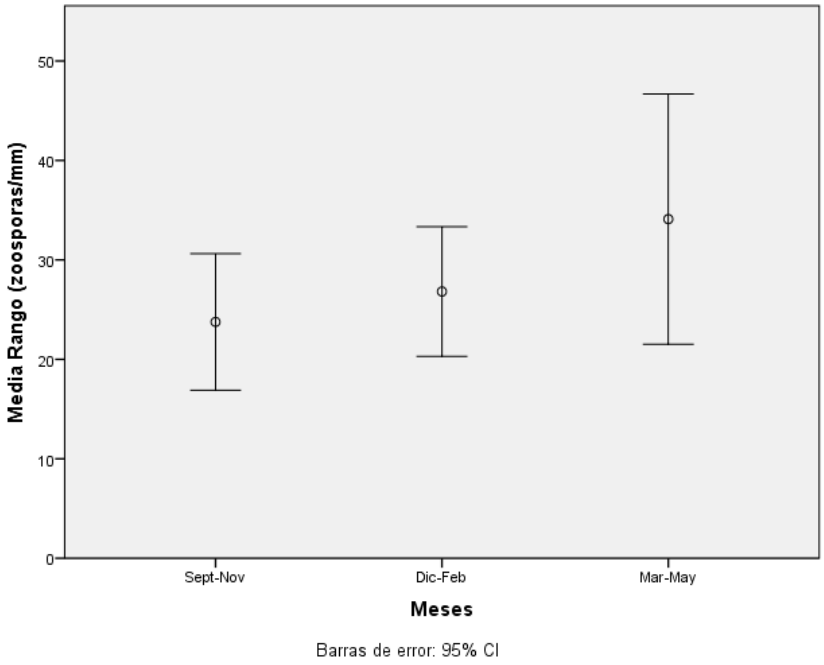


Figura 9. Comparación de los promedios de niveles de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* a lo largo del tiempo de muestreo. *N* = 52 individuos positivos para *Bd*.

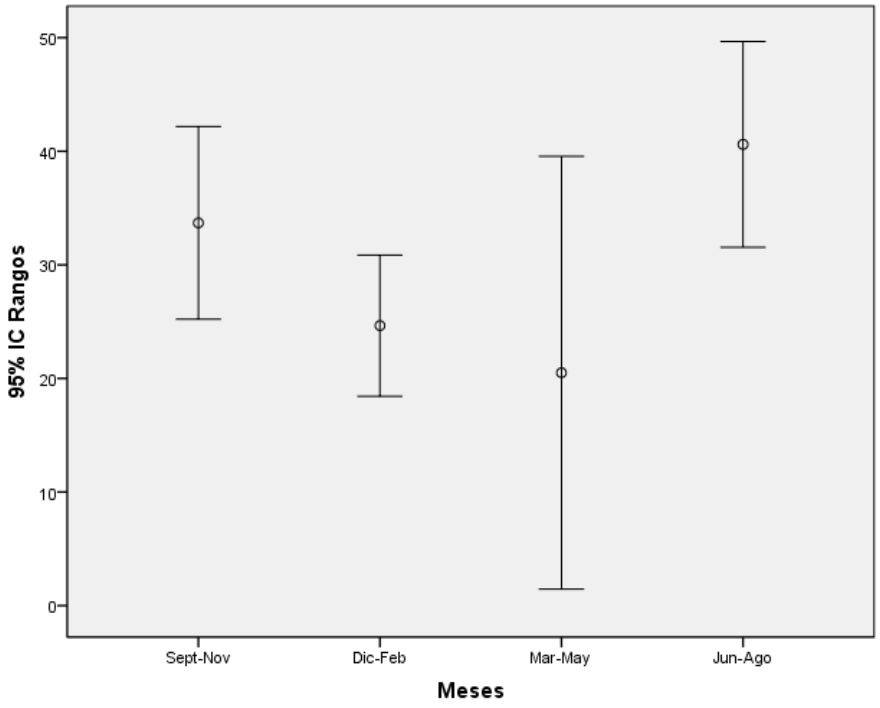


Figura 10. Comparación de los promedios de niveles de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Pristimantis unistrigatus* a lo largo del tiempo de muestreo. *N* = 57 individuos positivos para *Bd*.

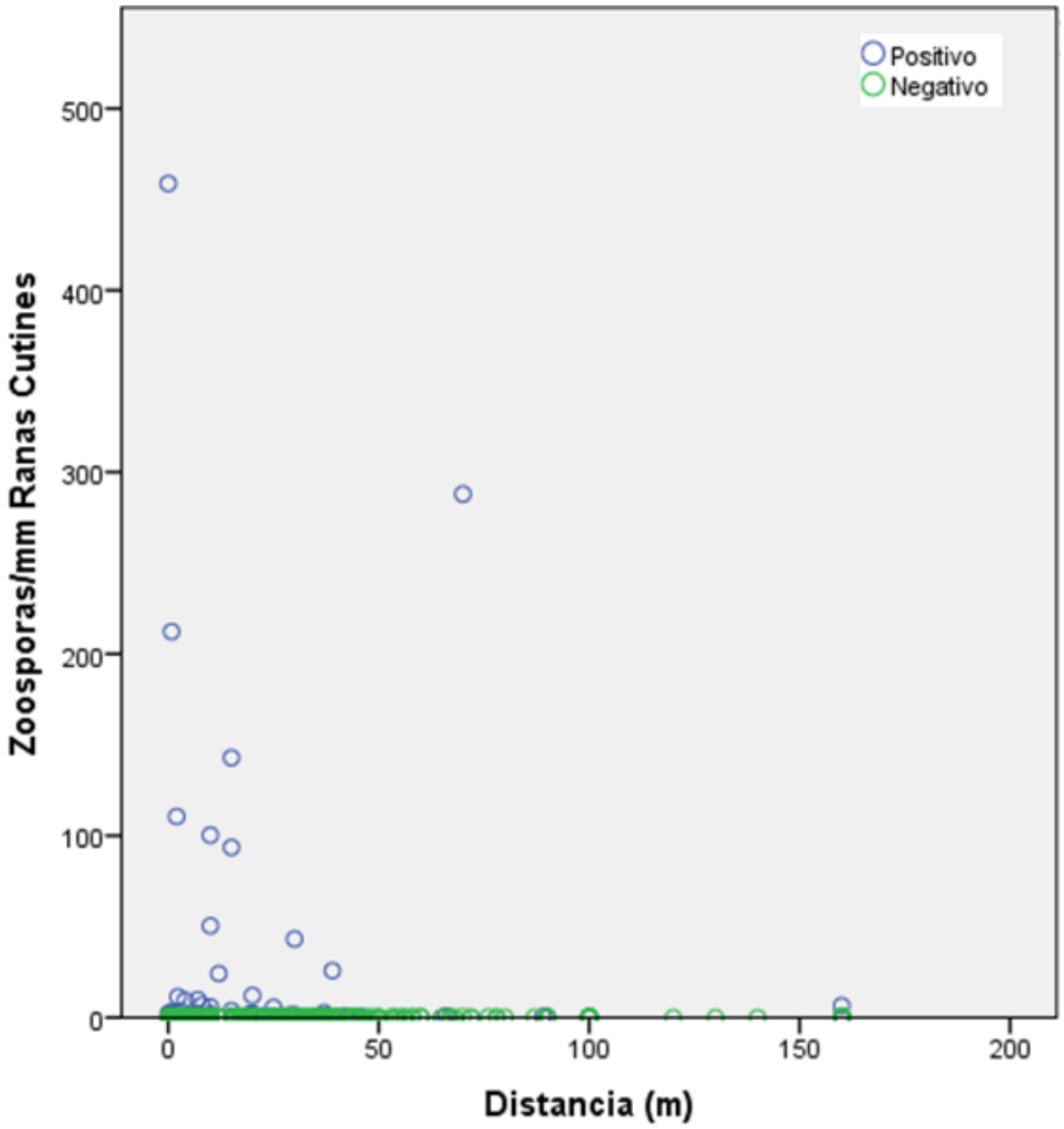


Figura 11. Correlación entre la distancia hacia la poza y los niveles de infección de *Pristimantis unistrigatus*. Individuos positivos y negativos para *Bd*. La correlación fue significativa (p = 0.011). N = 382 individuos colectados durante todo el tiempo de muestreo.

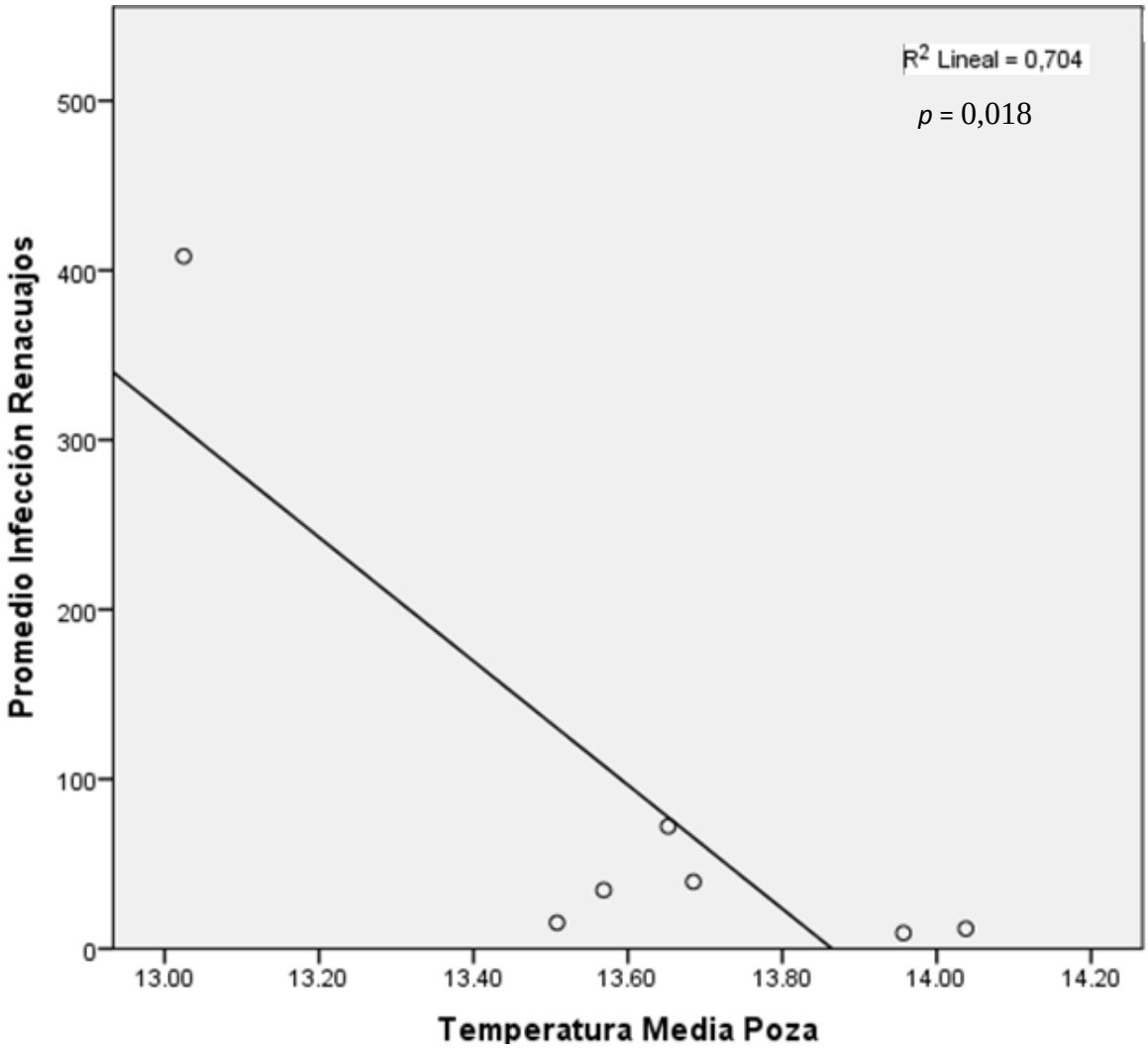


Figura 12. Regresión entre el promedio de infección en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* vs. temperatura media de la poza. *N* = 7 meses en los cuales ambas variables presentan datos para correlacionar.

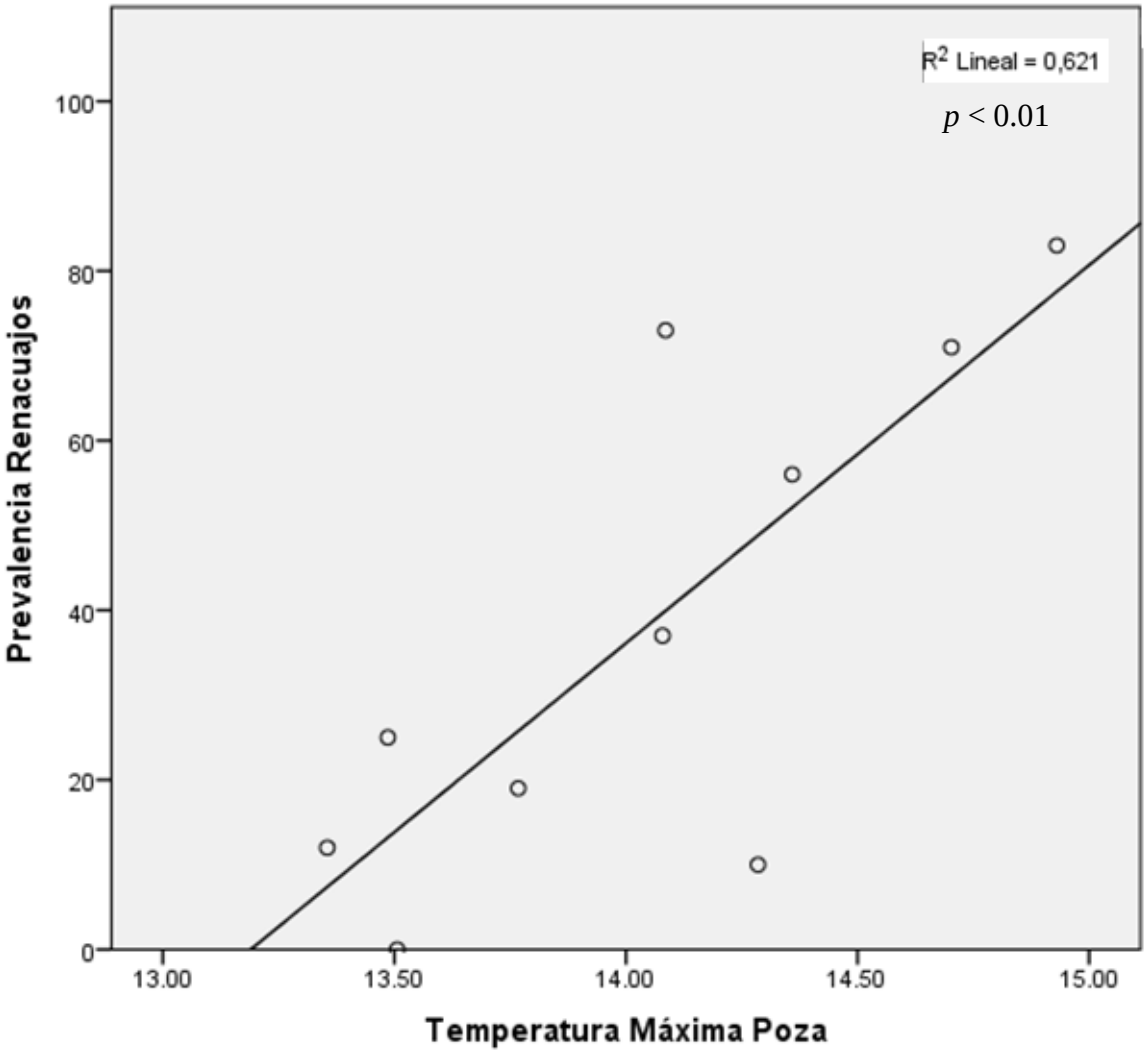


Figura 13. Regresión entre la prevalencia de la enfermedad en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* vs. temperatura máxima de la poza. *N* = 10 meses en los cuales ambas variables presentan datos para correlacionar.

11. TABLAS

Tabla 1. Prevalencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en las dos especies de anuros estudiadas.

Muestra	PCR punto final			q-PCR		
	Positivos	Negativos	Total	Positivos	Negativos	Total
Aparatos Bucales *G.riobambae*	42 (31%)	95 (69%)	137	53 (39%)	82 (61%)	135
Hisopos Apar. Bucales *G.riobambae*	6 (4%)	148 (96%)	154	22 (14%)	132 (86%)	154
Hisopos *P. unistrigatus*	2 (0,5%)	380 (99,5%)	382	57 (15%)	325 (85%)	382
TOTAL			673			671

Tabla 2. Prevalencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* mediante PCR de punto final y q-PCR utilizados con muestras de tejido e hisopos de renacuajos de *Gastrotheca riobambae.*

Muestreo	PCR Prevalencia (%) Tejido	q-PCR Prevalencia (%) Tejido	PCR Prevalencia (%) Hisopo	q-PCR Prevalencia (%)Hisopo
1	63	75	13	25
2	67	67	33	33
3	67	78	0	20
4	0	0	0	0
5	67	83	0	33
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	33	67	0	14
10	20	47	0	24
11	19	19	6	6
12	10	10	0	0
13	40	40	0	0
14	56	33	0	0
15	11	0	0	0
16	22	25	0	10
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	40	25	20	40

Tabla 3. Renacuajos de *Gastrotheca riobambae* positivos para *Bd* en todos los ensayos realizados.

Código	Estadio	LRCola (mm)	PRESENCIA *Bd* Hisopo	PRESENCIA *Bd* Aparatos bucales	q-PCR Hisopo	q-PCR Aparatos bucales	N° de zoosporas (zoosporas/µL) hisopo	N° zoosporas (zoosporas/µL) Aparatos Bucales
SC39348	39	62,40	PRESENCIA	PRESENCIA	POSITIVO	POSITIVO	63	885
SC39352	40	67,03	PRESENCIA	PRESENCIA	POSITIVO	POSITIVO	296	1192
SC39353	38	64,81	PRESENCIA	PRESENCIA	POSITIVO	POSITIVO	242	118
SC39426	35	47,86	PRESENCIA	PRESENCIA	POSITIVO	POSITIVO	10	155
SC39493	36	72,70	PRESENCIA	PRESENCIA	POSITIVO	POSITIVO	17269	724
SC39361	41	68,16	AUSENCIA	PRESENCIA	POSITIVO	POSITIVO	30	1535
SC39364	41	64,65	AUSENCIA	PRESENCIA	POSITIVO	POSITIVO	16	68
SC39377	33	40,92	AUSENCIA	PRESENCIA	POSITIVO	POSITIVO	11	127
SC39389	30	22,31	AUSENCIA	PRESENCIA	POSITIVO	POSITIVO	25	57
SC39474	36	69,19	AUSENCIA	PRESENCIA	POSITIVO	POSITIVO	24	20

Tabla 4. Carga de zoosporas en los diferentes grupos de estadios larvarios de *Gastrotheca riobambae.*

Estadios	N	promedio ± desviación estándar	Rango Carga (zooposras/µL)
28–30	10	259.80 ± 307.10	20–821
31–33	9	354.89 ± 509.73	31–1535
34–36	13	6633.23 ± 13666.40	20–48795
37–39	10	4469.80 ± 13371.49	11–42519
40–42	11	1917.73 ± 4676.82	31–15911

Tabla 5. Niveles de infección en los diferentes grupos de estadios larvarios de *Gastrotheca riobambae.*

Estadios	N	promedio ± desviación estándar	Nivel de Infección (zoosporas/mm)
28–30	10	10.02 ± 10.88	0.80–31.24
31–33	9	13.90 ± 19.13	0.78–56.48
34–36	13	119.35 ± 237.82	0.29–816.24
37–39	10	70.74 ± 211.94	0.17–673.84
40–42	11	27.13 ± 65.52	0.46–223.06

Tabla 6. Prevalencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* por muestreo.

Mes	Muestreo	Positivos[a] (ind.)	Prevalencia (%)	Negativos[b] (ind.)	Prevalencia (%)	TOTAL
Sept	M1	6	75	2	25	8
	M2	4	67	2	33	6
Oct	M3	7	78	2	22	9
	M4	1	_	1	_	2
Nov	M5	5	83	1	17	6
	M6	0	_	0	_	0
Dic	M7	1	_	0	_	1
	M8	0	_	0	_	0
Ene	M9	8	67	4	33	12
	M10	7	47	8	53	15
Feb	M11	3	19	13	81	16
Mar	M12	1	10	9	90	10
Abr	M13	4	40	6	60	10
	M14	3	33	6	67	9
May	M15	0	0	9	100	9
	M16	2	25	6	75	8
Jun	M17	0	0	10	100	10
	M18	0	_	0	_	0
Jul	M19	1	25	3	75	4
	TOTAL	53		82		135

a. Número de individuos positivos para *Bd* por medio de q-PCR
b. Número de individuos negativos para *Bd* por medio de q-PCR

Tabla 7. Prevalencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Pristimantis unistrigatus* por muestreo.

Mes	Muestreo	Positivos[a] (ind.)	Prevalencia (%)	Negativos[b] (ind.)	Prevalencia (%)	TOTAL
Sept	M1	1	13	7	88	8
	M2	5	26	14	74	19
Oct	M3	1	_	1	_	2
	M4	0	_	0	_	0
Nov	M5	2	9	20	91	22
	M6	4	14	25	86	29
Dic	M7	10	30	23	70	33
	M8	4	20	16	80	20
Ene	M9	3	14	19	86	22
	M10	1	6	17	94	18
Feb	M11	3	15	17	85	20
	M12	6	30	14	70	20
Mar	M13	0	0	20	100	20
	M14	0	0	20	100	20
Abr	M15	5	33	10	67	15
	M16	1	6	16	94	17
May	M17	1	5	20	95	21
Jun	M18	5	23	17	77	22
Jul	M19	0	0	20	100	20
Ago	M20	3	16	16	84	19
	M21	2	13	13	87	15
	TOTAL	57		325		382

a. Número de individuos positivos para *Bd* por medio de q-PCR
b. Número de individuos negativos para *Bd* por medio de q-PCR

Tabla 8. Prevalencia y promedio de infección de *Batrachochytrium dendrobatidis* en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* por mes.

Mes[a]	Positivos (ind.)	Prevalencia (%)	Negativos (ind.)	Prevalencia (%)	Prom de infección (zoosporas/mm)	TOTAL
Septiembre	10	71	4	29	72.1	14
Octubre	8	73	3	27	34.48	11
Noviembre	5	83	1	17	9.18	6
Diciembre	1	_	0	_	_	1
Enero	15	56	12	44	11.82	27
Febrero	3	19	13	81	15.28	16
Marzo	1	10	9	90	_	10
Abril	7	37	12	63	39.43	19
Mayo	2	12	15	88	408.27	17
Junio	0	0	10	100	_	10
Julio	1	25	3	75	_	4
TOTAL	53		82			135

a. Meses que se encuentran con color rojo, no se tomaron en cuenta por no tener prevalencia y no poder sacar los promedios de infección.

Tabla 9. Prevalencia y promedio de infección de *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Pristimantis unistrigatus* por mes.

Mes[a]	Positivos (ind.)	Prevalencia (%)	Negativos (ind.)	Prevalencia (%)	Prom de infección (zoosporas/mm)	TOTAL
Septiembre	6	22	21	78	22.55	27
Octubre	1	_	1	_	_	2
Noviembre	6	12	45	88	21.45	51
Diciembre	14	26	39	74	7.68	53
Enero	4	10	36	90	1.61	40
Febrero	9	23	31	78	11.88	40
Marzo	0	0	40	100	_	40
Abril	6	19	26	81	50.04	32
Mayo	1	5	20	95	_	21
Junio	5	23	17	77	12.78	22
Julio	0	0	20	100	_	20
Agosto	5	15	29	85	163.49	34
TOTAL	57		325			382

a. Meses que se encuentran con color rojo, no se tomaron en cuenta por no tener prevalencia y no poder sacar los promedios de infección.

Tabla 10. Carga de zoosporas en *Pristimantis unistrigatus* con relación a la distancia de la poza.

Individuo	N	promedio ± desviación estándar	Rango Carga (zooposras/µL)	Distancia Promedio (m)
Positivos	57	556.04 ± 1426.14	10–7556	25.56
Negativos	325	1.89 ± 2.26	0–9	34.78

Tabla 11. Niveles de infección en *Pristimantis unistrigatus* con relación a la distancia de la poza.

Individuo	N	promedio ± desviación estándar	Nivel de Infección (zoosporas/mm)	Distancia Promedio (m)
Positivos	57	29.27 ± 78.77	0.45–458.77	25.56
Negativos	325	0.09 ± 0.11	0–0.53	34.78

Tabla 12. Regresión entre el promedio de infección en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* vs. temperatura de la poza.

Temperatura	r^2	F	*p*	Grados libertad
Máxima	0.428	3.741	0.111	6
Media	0.704	11.878	0.018	6
Mínima	0.218	1.391	0.291	6

Tabla 13. Regresión entre la prevalencia de la enfermedad en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* vs. temperatura de la poza.

Temperatura	r^2	F	*p*	Grados libertad
Máxima	0.621	13.094	0.007	9
Media	0.310	3.601	0.094	9
Mínima	0.001	0.006	0.942	9

Tabla 14. Regresión entre el promedio de infección en *Pristimantis unistrigatus* vs. temperatura ambiente.

Temperatura	r^2	F	*p*	Grados libertad
Máxima	0.080	0.521	0.498	7
Media	0.025	0.152	0.710	7
Mínima	0.028	0.172	0.692	7

Tabla 15. Regresión entre la prevalencia de la enfermedad en *Pristimantis unistrigatus* vs. temperatura ambiente.

Temperatura	r^2	F	*p*	Grados libertad
Máxima	0.022	0.201	0.664	10
Media	0.034	0.314	0.589	10
Mínima	0.209	2.384	0.157	10

12. ANEXOS

Anexo 1. Valores de precipitación por mes, obtenidos de los boletines mensuales meteorológicos del "Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología" (INAMHI) correspondientes al periodo 2012-2013, perteneciente a la estación Iñaquito de Quito.

Meses	Precipitación (mm)
sep-12	12.50
oct-12	133.50
nov-12	145.90
dic-12	60.80
ene-13	42.70
feb-13	195.10
mar-13	82.70
abr-13	110.90
may-13	115.70
jun-13	0.30
jul-13	0.60
ago-13	18.40

Anexo 2. Protocolo para la extracción de ADN de aparatos bucales de renacuajos de la Rana Marsupial de Quito (*Gastrotheca riobambae)* para la identificación del quítrido *Batrachochytrium dendrobatidis.*

A partir del tejido almacenado en alcohol al 70% se procedió con el protocolo de extracción de ADN modificado de Hyatt *et al*, 2007, Boyle *et al*, 2004 y Manzano, 2010.

Cortar el aparto bucal lo más finamente posible, conservando todas las piezas queratinizadas y añadirlas a un tubo eppendorf de 1.5 ml.

Pesar de 0.02 a 0.03 g de perlas de Zirconia y colocarlas en el tubo anteriormente mencionado conjuntamente con 50 µL de PrepMan Ultra (Sample Preparation Reagent. Applied Biosystems).

Homogenizar la muestra con vortex durante dos minutos, permitiendo que la muestra entre en contacto con las perlas de zirconia uniformemente.

Centrifugar por dos minutos a 13000 gravedades.

Volver a homogenizar la muestra con vortex durante dos minutos
Centrifugar nuevamente por dos minutos a 13000 gravedades.

Incubar la muestra en un termobloque a 92 °C durante diez minutos.

Enfriar la muestra durante cinco minutos.

Centrifugar la muestra durante 8 minutos a 13000 gravedades.

Transvasar el sobrenadante del tubo en un tubo nuevo de 1.5 ml (~35µL). En el sobrenadante se encontrará el ADN extraído.

Almacenar el ADN a -20 grados centígrados para conservar la calidad de la muestra.

El mismo procedimiento se realiza para la extracción de ADN de muestras tomadas por medio de hisopos, tanto de aparatos bucales como de piel (parche pélvico y extremidades superiores e inferiores).

Anexo 3. Condiciones para realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de punto final para la identificación del quítrido *Batrachochytrium dendrobatidis.*

Reactivo	**[Final]**	**Volx1**
DNA	450ng	10µL
Buffer	1X	2.5µL
$MgCl_2$	2mM	1µL
dNTP's	0.2mM	0.5µL
Fw	0.2µM	1µL
Rv	0.2µM	1µL
Taq Pol	2.5U	0.3µL
H_2O		8.7µL
Vol Total		25µL

Los cebadores utilizados para la PCR de punto final se anclarán en regiones conservadas y amplificarán un fragmento de ~147pb.

El primer forward ITS-1Chytr3 (5'-CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC-3') y el reverse 5.8Schytr (5'-TCGGTTCTCTAGGCAACAGTTT-3') amplifican la región ITS1 y la región 5.8 S ribosomal respectivamente.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador (Agilent) empleando las siguientes condiciones de amplificación:

Denaturación inicial de 93 ºC por 10 minutos

35 ciclos de:

a) 45 segundos a 93 ºC (Denaturación)

b) 40 segundos a 64 ºC (Anillamiento)

c) 45 segundos a 72 ºC (Elongación)

Elongación final de 72 ºC por 10 minutos

Anexo 4. Condiciones para realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real para la identificación del quítrido *Batrachochytrium dendrobatidis.*

Reactivo	**[Final]**	**Volx1**
DNA		4µL
Master Mix	1X	10µL
Fw	0.2µM	0.8µL
Rv	0.2µM	0.8µL
Sonda	0.25µM	1µL
H_2O		3.4µL
Vol Total		20µL

Los cebadores utilizados para la PCR en tiempo real se anclarán en regiones conservadas y amplificarán un fragmento de ~147pb.

El primer forward ITS-1Chytr3 (5'-CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC-3') y el reverse 5.8Schytr (5'-TCGGTTCTCTAGGCAACAGTTT-3') amplifican la región ITS1 y la región 5.8 S ribosomal respectivamente.

Se utilizó la sonda: Chytr MGB2 5'- 6-FAM-CGAGTCGAACAAAAT-MGBNFQ-3' TaqMan MGB Probe, Up to 30pb, 6000pmol. (Applied Biosystems).

También se usó una Master Mix GoTaq® Probe qPCR.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador de tiempo real (Stratagene) empleando las siguientes condiciones de amplificación:

Denaturación inicial de 95 ºC por 2 minutos

40 ciclos de:

a) 15 segundos a 95 ºC (Denaturación)

b) 1 minuto a 64 ºC (Anillamiento)

Anexo 5. Resultado de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar si los datos de prevalencia por *Batrachochytrium dendrobatidis* encontrada en muestras de tejido entre las dos técnicas moleculares se encuentran distribuidos normalmente. *N* = 19 muestreos realizados durante todo el estudio.

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		PCR	q-PCR
N		19	19
Parámetros normales[a,b]	Media	27,11	29,95
	Desviación típica	26,213	30,863
Diferencias más extremas	Absoluta	,165	,202
	Positiva	,165	,202
	Negativa	-,151	-,166
Z de Kolmogorov-Smirnov		,720	,883
Sig. asintót. (bilateral)		,677	,417

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

Anexo 6. Resultado de la prueba de t-student para la comparación entre las dos técnicas moleculares utilizando muestras de tejido de aparatos bucales. *N* = 19 muestreos realizados durante todo el estudio.

Estadísticas de muestras emparejadas

		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	PCR	24,42	19	24,539	5,630
	q_PCR	29,95	19	30,863	7,080

Prueba de muestras emparejadas

	Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia Inferior	Superior			
Par 1 PCR - q_PCR	-5,526	11,423	2,621	-11,032	-,021	-2,109	18	,049

Anexo 7. Resultado de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar si los datos de prevalencia por *Batrachochytrium dendrobatidis* encontrada en muestras obtenidas por medio de hisopos entre las dos técnicas moleculares se encuentran distribuidos normalmente. *N* = 19 muestreos realizados durante todo el estudio.

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		PCR	q-PCR
N		19	19
Parámetros normales[a,b]	Media	3,79	10,79
	Desviación típica	8,886	13,943
Diferencias más extremas	Absoluta	,455	,307
	Positiva	,455	,307
	Negativa	-,335	-,220
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,982	1,337
Sig. asintót. (bilateral)		,001	,056

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

Anexo 8. Resultado de la prueba de Wilcoxon para la comparación entre las dos técnicas moleculares utilizando hisopos de aparatos bucales. *N* = 19 muestreos realizados durante todo el estudio.

Rangos

		N	Rango promedio	Suma de rangos
q-PCR - PCR	Rangos negativos	0[a]	,00	,00
	Rangos positivos	7[b]	4,00	28,00
	Empates	12[c]		
	Total	19		

a. q-PCR < PCR

b. q-PCR > PCR

c. q-PCR = PCR

Estadísticos de prueba[a]

	q-PCR - PCR
Z	-2,371[b]
Sig. asintótica (bilateral)	,018

a. Prueba de Wilcoxon de los rangos con signo

b. Se basa en rangos negativos.

Anexo 9. Resultado de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar si los datos de prevalencia por *Batrachochytrium dendrobatidis* encontrada entre muestras de tejido de aparatos bucales (q-PCRAB) y muestras tomadas por hisopos (q-PCRHI) utilizando PCR en tiempo real se encuentran distribuidos normalmente. *N* = 19 muestreos realizados durante todo el estudio.

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		q-PCRAB	q-PCRHI
N		19	19
Parámetros normales[a,b]	Media	29,95	10,79
	Desviación típica	30,863	13,943
Diferencias más extremas	Absoluta	,202	,307
	Positiva	,202	,307
	Negativa	-,166	-,220
Z de Kolmogorov-Smirnov		,883	1,337
Sig. asintót. (bilateral)		,417	,056

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

Anexo 10. Resultado de la prueba de t-student para la comparación entre muestras de tejido de aparatos bucales (q-PCRAB) vs muestras tomadas por hisopos (q-PCRHI) utilizando PCR en tiempo real (q-PCR). *N* = 19 muestreos realizados durante todo el estudio.

Estadísticas de muestras emparejadas

		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	q-PCRAB	29,95	19	30,863	7,080
	q-PCRHI	10,79	19	13,943	3,199

Prueba de muestras emparejadas

		Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	q-PCRAB – q-PCRHI	19,158	22,721	5,213	8,207	30,109	3,675	18	,002

Anexo 11. Resultado de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar si los datos de niveles de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en los estadios larvarios de *Gastrotheca riobambae* se encuentran distribuidos normalmente. *N* = 53 individuos positivos para *Bd.*

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Zoosporas/µL	Estadios larvarios
N		53	53
Parámetros normales[a,b]	Media	2977,68	3,06
	Desviación típica	9215,574	1,406
Diferencias más extremas	Absoluta	,430	,145
	Positiva	,430	,132
	Negativa	-,374	-,145
Z de Kolmogorov-Smirnov		3,131	1,056
Sig. asintót. (bilateral)		,000	,215

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

Anexo 12. Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de los promedios de niveles de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en diferentes estadios larvarios de *Gastrotheca riobambae*). *N* = 53 individuos positivos para *Bd*.

Rangos

	Estadios	N	Rango promedio
Zoosporas/µL	28-30	10	20,35
	31-33	9	22,72
	34-36	13	33,81
	37-39	10	25,90
	40-42	11	29,50
	Total	53	

Estadísticos de prueba[a,b]

	Zoosporas/µL
Chi-cuadrado	5,412
gl	4
Sig. asintótica	,248

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Estadios

Anexo 13. Resultado de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar si los datos de niveles de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* se encuentran distribuidos normalmente. *N* = 53 individuos positivos para *Bd.*

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Zoosporas/mm Renacuajos	Meses
N		53	53
Parámetros normales[a,b]	Media	52.5049	1,79
	Desviación típica	153.79032	,817
Diferencias más extremas	Absoluta	,397	,268
	Positiva	,397	,268
	Negativa	-,367	-,166
Z de Kolmogorov-Smirnov		2,894	1,950
Sig. asintót. (bilateral)		,000	,001

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

Anexo 14. Resultado de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar si los datos de niveles de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Pristimantis unistrigatus* se encuentran distribuidos normalmente. *N* = 57 individuos positivos para *Bd.*

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Meses	Zoosporas/mm Ranas Cutines
N		57	57
Parámetros normales[a,b]	Media	2,25	29.2747
	Desviación típica	1,005	78.76590
Diferencias más extremas	Absoluta	,298	,393
	Positiva	,298	,393
	Negativa	-,175	-,357
Z de Kolmogorov-Smirnov		2,252	2,970
Sig. asintót. (bilateral)		,000	,000

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

Anexo 15. Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de los promedios de niveles de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* a lo largo del tiempo de muestreo. *N* = 52 individuos positivos para *Bd*.

Rangos

	Meses	N	Rango promedio
Zoosporas/mm Renacuajos	Sept-Nov	23	23,43
	Dic-Feb	19	26,47
	Mar-May	10	33,60
	Total	52	

Estadísticos de prueba[a,b]

	Zoosporas/mm Renacuajos
Chi-cuadrado	3,136
gl	2
Sig. asintótica	,208

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Meses

Anexo 16. Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de los promedios de niveles de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Pristimantis unistrigatus* a lo largo del tiempo de muestreo. *N* = 57 individuos positivos para *Bd*.

Rangos

	Meses	N	Rango promedio
Zoosporas /mm Ranas Cutines	Sept-Nov	13	33,62
	Dic-Feb	27	24,67
	Mar-May	7	20,57
	Jun-Ago	10	40,60
	Total	57	

Estadísticos de prueba[a,b]

	Zoosporas/mm Ranas Cutines
Chi-cuadrado	9,535
gl	3
Sig. asintótica	,023

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Meses

Anexo 17. Resultado de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar si los datos de prevalencia por *Batrachochytrium dendrobatidis* encontrada en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* se encuentran distribuidos normalmente. *N* = 19 muestreos realizados durante todo el estudio.

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Meses	Prevalencia Renacuajos
N		19	19
Parámetros normales[a,b]	Media	2,26	29,95
	Desviación típica	1,098	30,863
Diferencias más extremas	Absoluta	,191	,202
	Positiva	,191	,202
	Negativa	-,170	-,166
Z de Kolmogorov-Smirnov		,832	,883
Sig. asintót. (bilateral)		,493	,417

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. b. Se han calculado a partir de los datos.

Anexo 18. Resultado de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar si los datos de prevalencia por *Batrachochytrium dendrobatidis* encontrada en *Pristimantis unistrigatus* se encuentran distribuidos normalmente. *N* = 21 muestreos realizados durante todo el estudio.

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Meses	Prevalencia Ranas Cutines
N		21	21
Parámetros normales[a,b]	Media	2,33	13,00
	Desviación típica	1,111	10,803
Diferencias más extremas	Absoluta	,189	,124
	Positiva	,189	,124
	Negativa	-,154	-,114
Z de Kolmogorov-Smirnov		,868	,567
Sig. asintót. (bilateral)		,439	,905

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

Anexo 19. Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de la prevalencia de la enfermedad por *Batrachochytrium dendrobatidis* en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* a lo largo del tiempo de muestreo. *N* = 19 muestreos realizados durante todo el estudio.

Rangos

	Meses	N	Rango promedio
Prevalencia	Sept-Nov	6	12,92
	Dic-Feb	5	9,30
	Mar-May	5	9,50
	Jun-Ago	3	6,17
	Total	19	

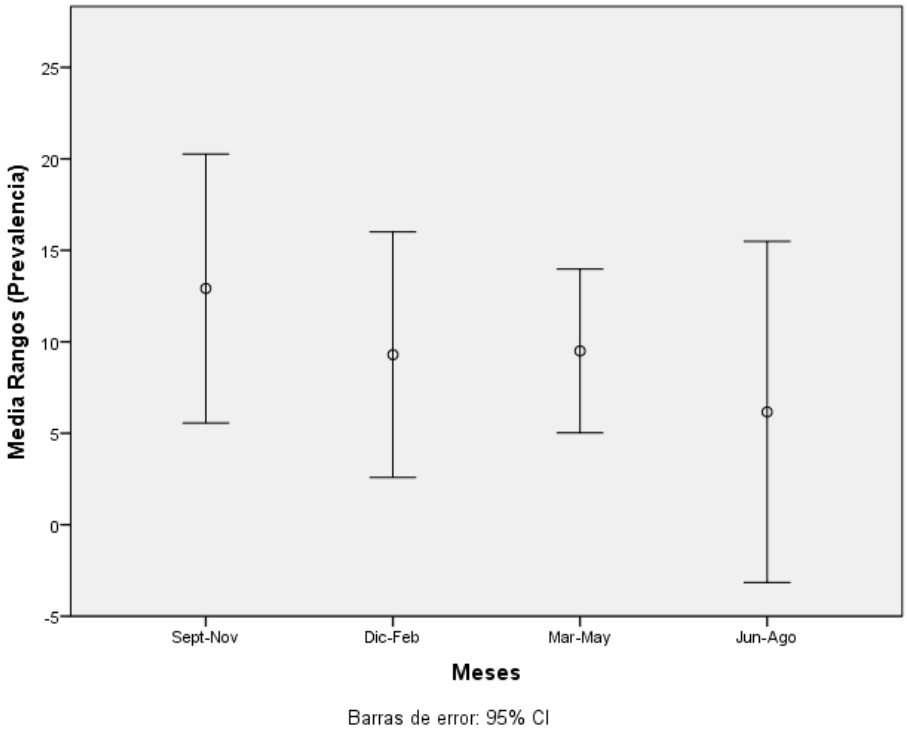
Estadísticos de prueba[a,b]

	Prevalencia
Chi-cuadrado	3,288
gl	3
Sig. asintótica	,349

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Meses

Anexo 20. Comparación de la prevalencia de la enfermedad por *Batrachochytrium dendrobatidis* en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* a lo largo del tiempo de muestreo. *N* = 19 muestreos realizados durante todo el estudio.



Anexo 21. Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de la prevalencia de la enfermedad por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Pristimantis unistrigatus* a lo largo del tiempo de muestreo. *N* = 21 muestreos realizados durante todo el estudio.

Rangos

	Meses	N	Rango promedio
Prevalencia	Sept-Nov	6	9,33
	Dic-Feb	6	14,83
	Mar-May	5	8,10
	Jun-Ago	4	11,38
	Total	21	

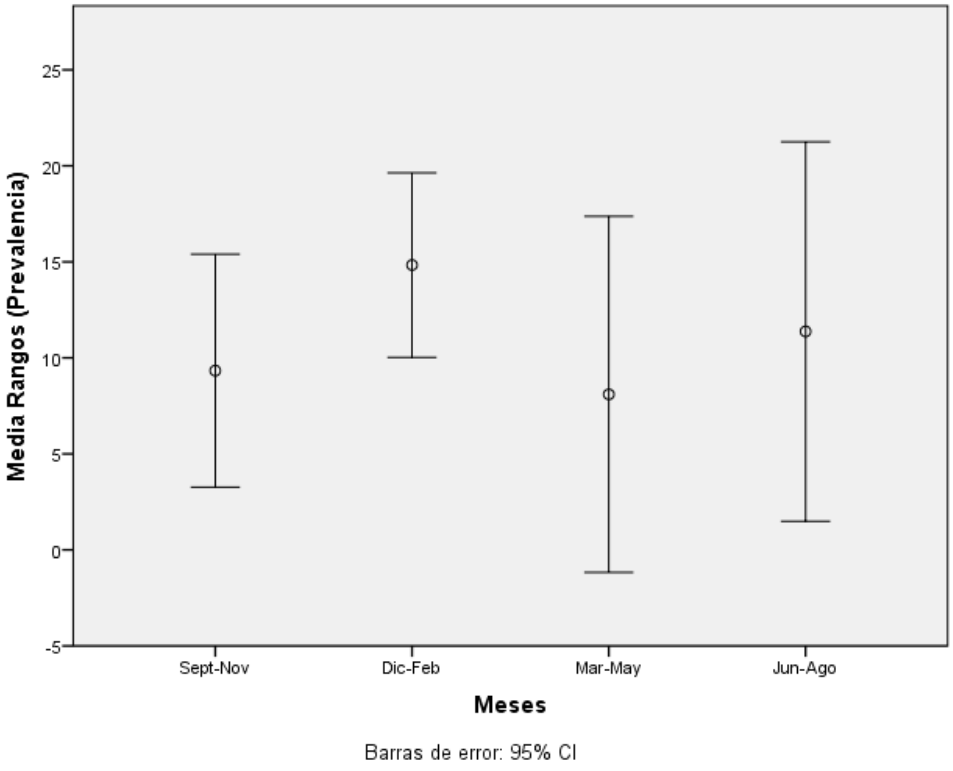
Estadísticos de prueba[a,b]

	Prevalencia
Chi-cuadrado	3,890
gl	3
Sig. asintótica	,274

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Meses

Anexo 22. Comparación de la prevalencia de la enfermedad por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Pristimantis unistrigatus* a lo largo del tiempo de muestreo. *N* = 21 muestreos realizados durante todo el estudio.



Anexo 23. Resultado de la prueba de regresión lineal para la correlación entre el promedio de infección vs. la prevalencia de la enfermedad en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* a lo largo del tiempo de muestreo. *N* = 7 meses en los cuales ambas variables presentan datos para correlacionar.

Correlaciones

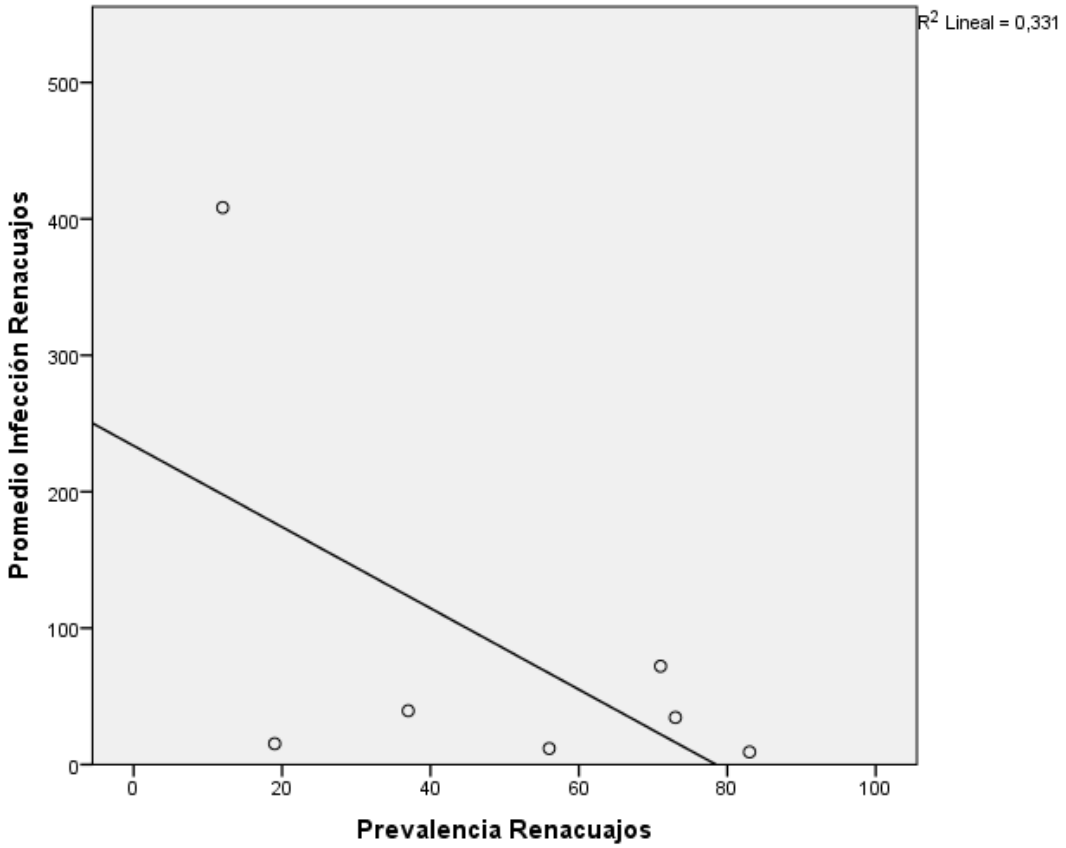
		Prevalencia Renacuajos	Promedio Infección Renacuajos
Correlación de Pearson	Promedio Infección	1,000	-,575
	Prevalencia	-,575	1,000
Sig. (unilateral)	Promedio Infección	.	,088
	Prevalencia	,088	.
N	Promedio Infección	7	7
	Prevalencia	7	7

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	Estadísticas de cambios Sig. Cambio en F
1	,575[a]	,331	,177

a. Predictores: (Constante), Prevalencia

Anexo 24. Regresión entre el promedio de infección vs. la prevalencia de la enfermedad en renacuajos de *Gastrotheca riobambae*). *N* = 7 meses en los cuales ambas variables presentan datos para correlacionar.



Anexo 25. Resultado de la prueba de regresión lineal para la correlación entre el promedio de infección vs. la prevalencia de la enfermedad en *Pristimantis unistrigatus* a lo largo del tiempo de muestreo. *N* = 8 meses en los cuales ambas variables presentan datos para correlacionar.

Correlaciones

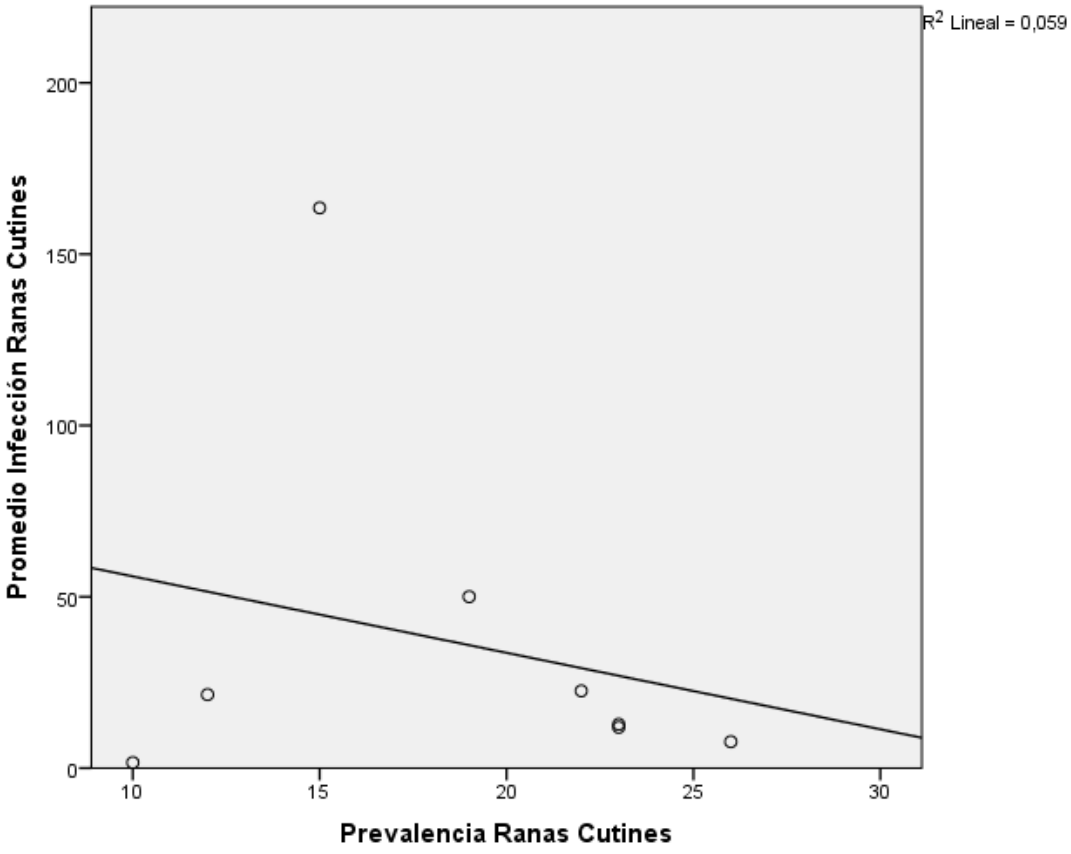
		Promedio Infección Ranas Cutines	Prevalencia Ranas Cutines
Correlación de Pearson	Promedio Infección	1,000	-,243
	Prevalencia	-,243	1,000
Sig. (unilateral)	Promedio Infección	.	,281
	Prevalencia	,281	.
N	Promedio Infección	8	8
	Prevalencia	8	8

Resumen del modelo

			Estadísticas de cambios
Modelo	R	R cuadrado	Sig. Cambio en F
1	,243[a]	,059	,563

a. Predictores: (Constante), Prevalencia

Anexo 26. Rregresión entre el promedio de infección vs. la prevalencia de la enfermedad en *Pristimantis unistrigatus*. *N* = 8 meses en los cuales ambas variables presentan datos para correlacionar.



Anexo 27. Resultado de la prueba de regresión lineal para la correlación de los promedios de infección entre las dos especies de anuros estudiados (*G. riobambae* y *P. unistrigatus*). *N* = 5 meses en los cuales ambas variables presentan datos para correlacionar.

Correlaciones

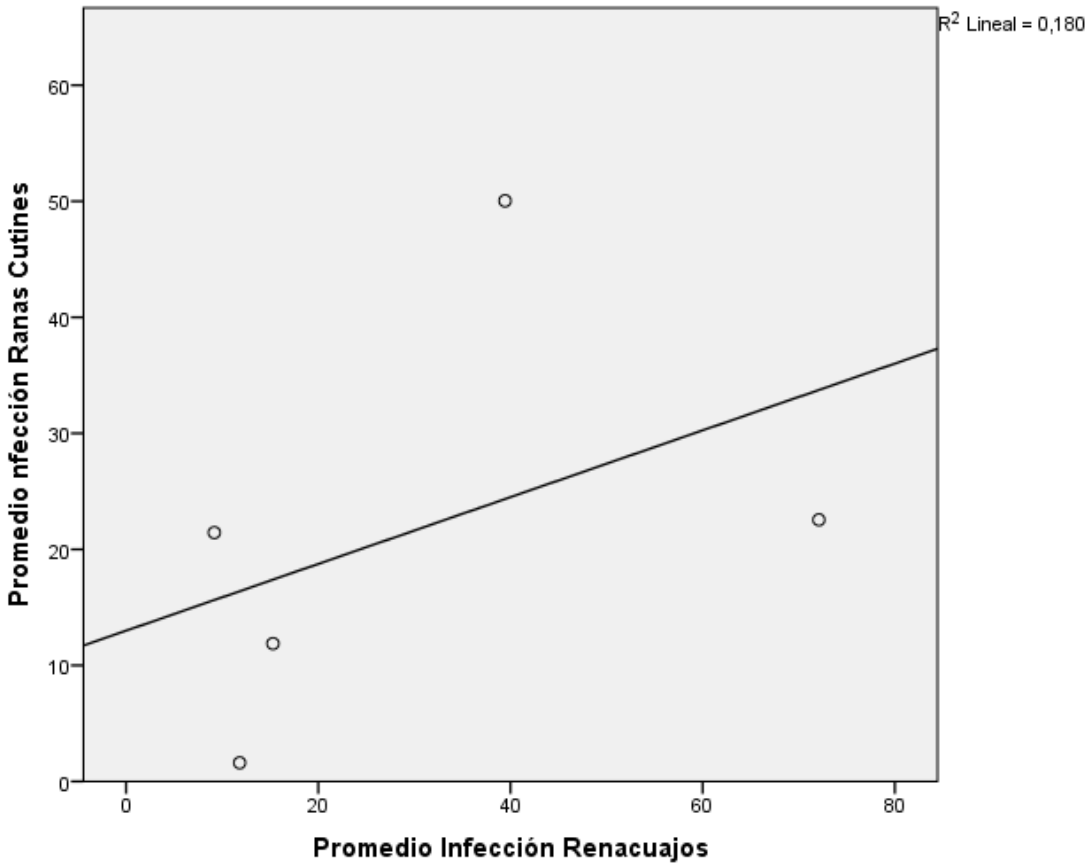
		Promedio Infección Renacuajos	Promedio Infección Ranas Cutines
Correlación de Pearson	Promedio Infección Renacuajos	1,000	,425
	Promedio Infección Ranas	,425	1,000
Sig. (unilateral)	Promedio Infección Renacuajos	.	,238
	Promedio Infección Ranas	,238	.
N	Promedio Infección Renacuajos	5	5
	Promedio Infección Ranas	5	5

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	Estadísticas de cambios: Sig. Cambio en F
1	,425[a]	,180	,476

a. Predictores: (Constante), Promedio Infección Ranas

Anexo 28. Regresión de los promedios de infección entre las dos especies de anuros estudiados (*G. riobambae* y *P. unistrigatus*). *N* = 5 meses en los cuales ambas variables presentan datos para correlacionar.



Anexo 29. Resultado de la prueba de regresión lineal para la correlación de la prevalencia de la enfermedad entre las dos especies de anuros estudiados (*G. riobambae* y *P. unistrigatus*). *N* = 5 meses en los cuales ambas variables presentan datos para correlacionar.

Correlaciones

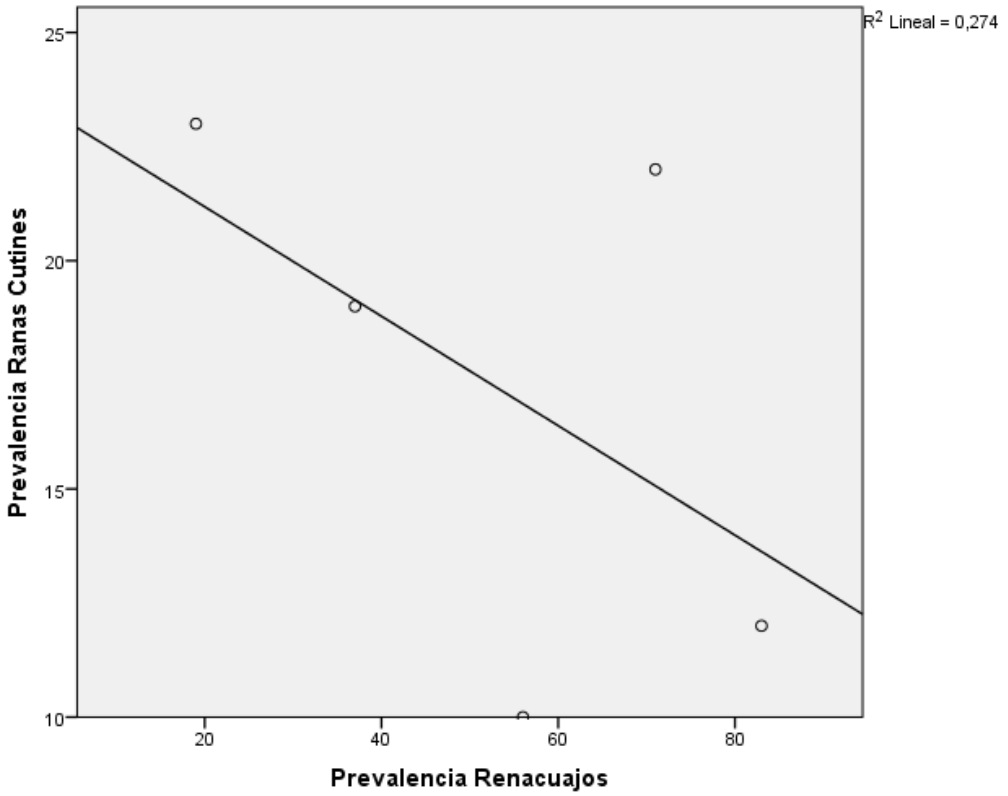
		Prevalencia Renacuajos	Prevalencia Ranas Cutines
Correlación de Pearson	Prevalencia Renacuajos	1,000	-,524
	Prevalencia Ranas Cutines	-,524	1,000
Sig. (unilateral)	Prevalencia Renacuajos	.	,183
	Prevalencia Ranas Cutines	,183	.
N	Prevalencia Renacuajos	5	5
	Prevalencia Ranas Cutines	5	5

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	Estadísticas de cambios: Sig. Cambio en F
1	,524[a]	,274	,365

a. Predictores: (Constante), Prevalencia Ranas

Anexo 30. Regresión de la prevalencia de la enfermedad entre las dos especies de anuros estudiados (*G. riobambae* y *P. unistrigatus*). *N* = 5 meses en los cuales ambas variables presentan datos para correlacionar.



Anexo 31. Resultado de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar si los datos de la distancia hacia la poza y los niveles de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Pristimantis unistrigatus* se encuentran distribuidos normalmente. *N* = 382 individuos colectados durante todo el tiempo de muestreo.

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Distancia	Zoosporas/mm
N		382	382
Parámetros normales[a,b]	Media	33,4055	84,30
	Desviación típica	37,56264	581,446
Diferencias más extremas	Absoluta	,187	,467
	Positiva	,187	,467
	Negativa	-,187	-,442
Z de Kolmogorov-Smirnov		3,655	9,133
Sig. asintót. (bilateral)		,000	,000

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

Anexo 32. Resultado de la prueba de Spearman para la correlación entre la distancia hacia la poza (m) y los niveles de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* de *Pristimantis unistrigatus*). *N* = 382 individuos colectados durante todo el tiempo de muestreo.

Correlaciones

			Distancia (m)	Zoosporas/mm Ranas cutines
Rho de Spearman	Distancia (m)	Coeficiente de correlación	1,000	-,130*
		Sig. (bilateral)	.	,011
		N	382	382
	Zoosporas/mm Ranas Cutines	Coeficiente de correlación	-,130*	1,000
		Sig. (bilateral)	,011	.
		N	382	382

*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Anexo 33. Resultado de la prueba de U de Mann-Whitney, para la comparación de los individuos, positivos y negativos para *Bd*, de *Pristimantis unistrigatus* con respecto a la distancia de la poza. *N* = 382 individuos colectados durante todo el tiempo de muestreo (57 individuos positivos y 325 negativos).

Rangos

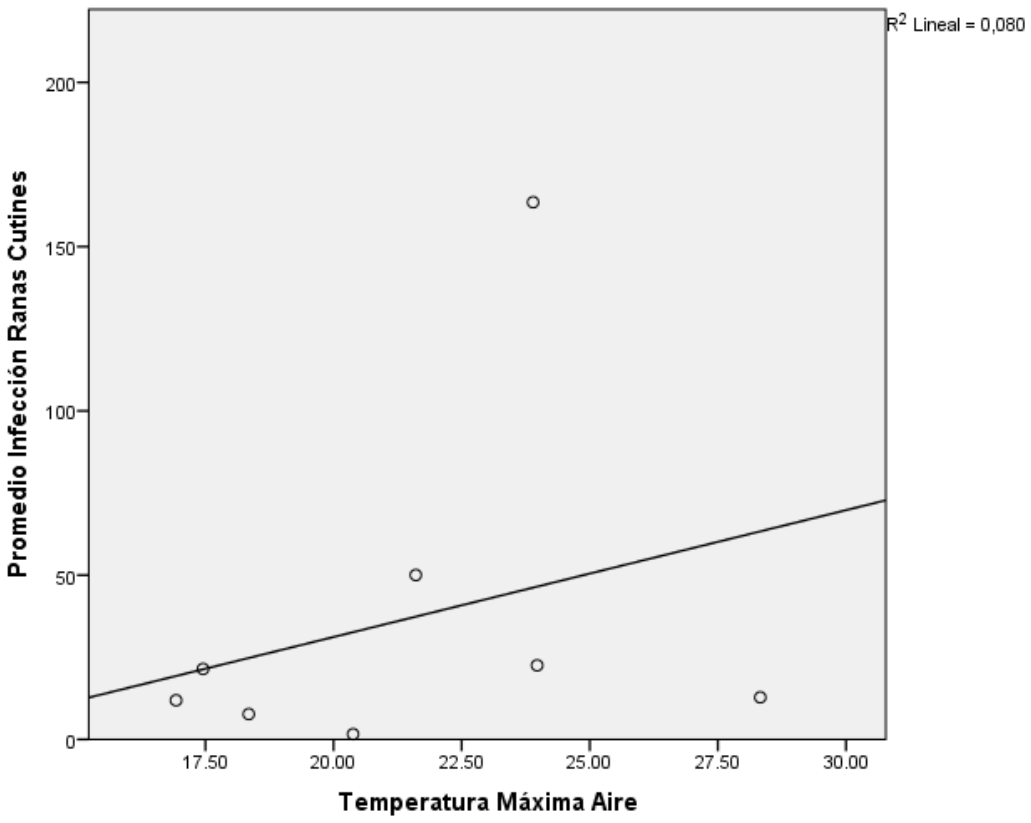
	q-PCR	N	Rango promedio	Suma de rangos
Distancia	Positivo	57	164,02	9349,00
	Negativo	325	196,32	63804,00
	Total	382		

Estadísticos de contraste[a]

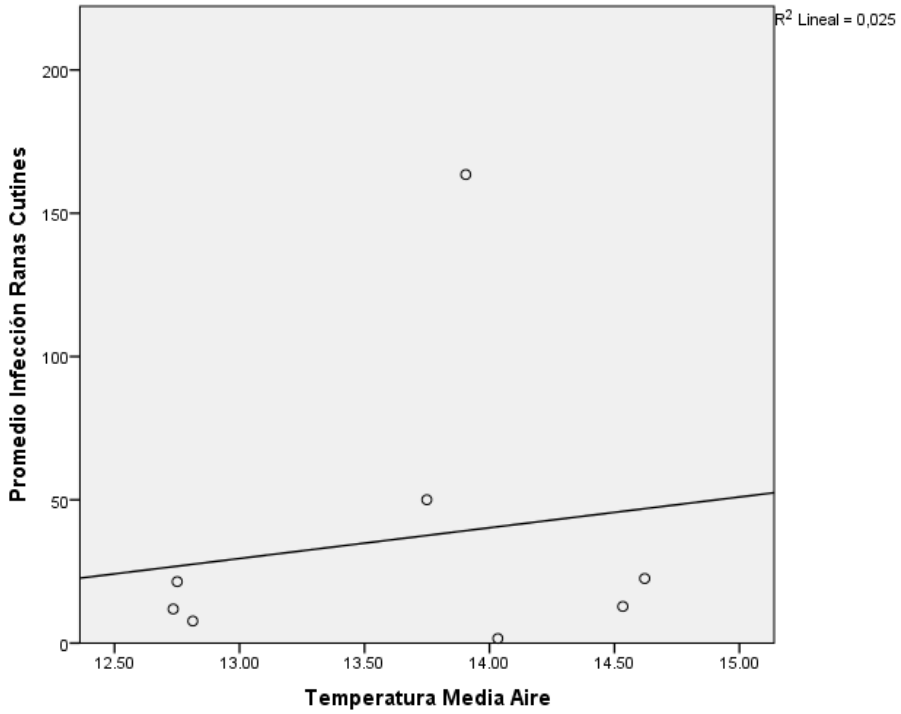
	Distancia
U de Mann-Whitney	7696,000
W de Wilcoxon	9349,000
Z	-2,038
Sig. asintót. (bilateral)	,042

a. Variable de agrupación: q-PCR

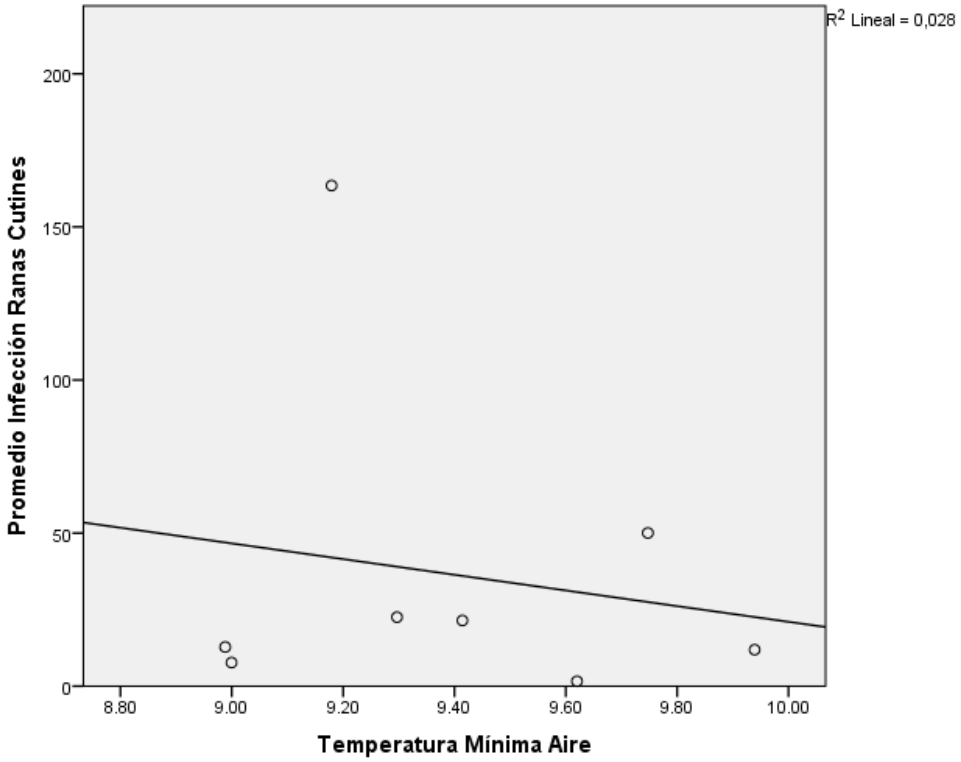
Anexo 34. Regresión entre el promedio de infección en *Pristimantis unistrigatus* vs. temperatura máxima. *N* = 8 meses en los cuales ambas variables presentan datos para correlacionar.



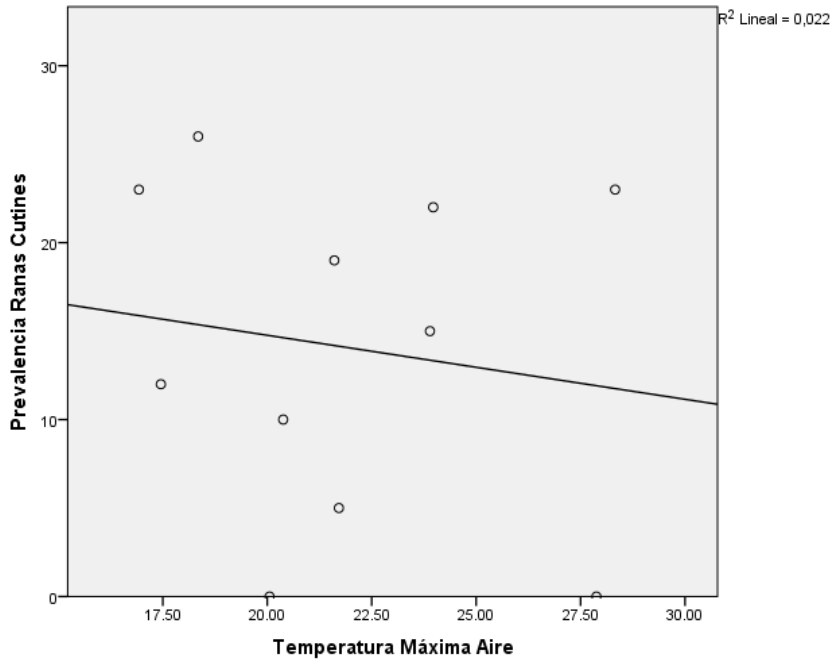
Anexo 35. Regresión entre el promedio de infección en *Pristimantis unistrigatus* vs. temperatura media. *N* = 8 meses en los cuales ambas variables presentan datos para correlacionar.



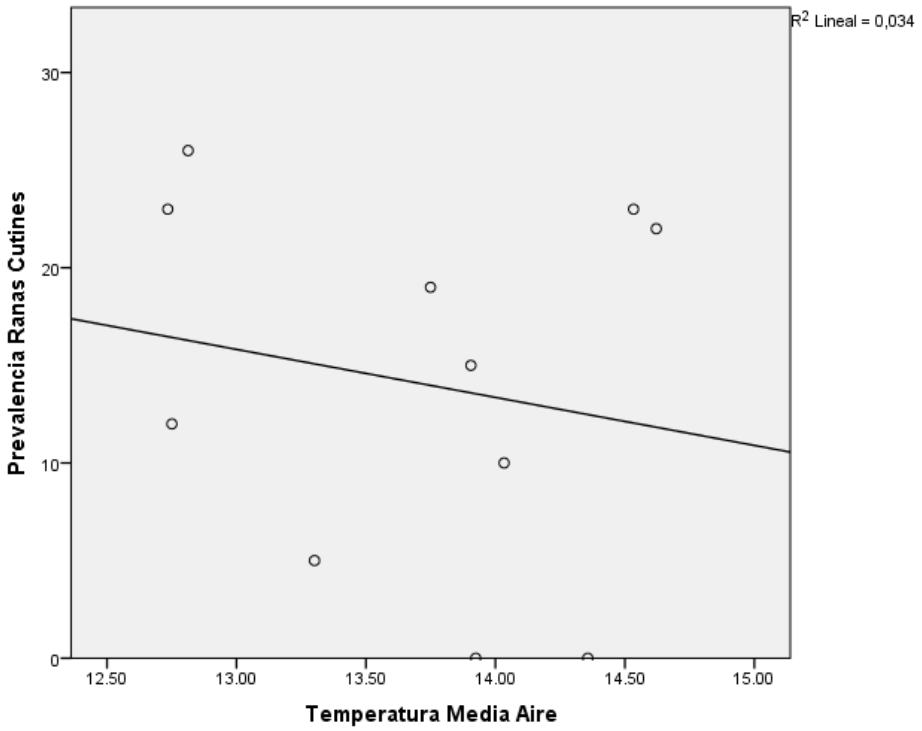
Anexo 36. Regresión entre el promedio de infección en *Pristimantis unistrigatus* vs. temperatura mínima. *N* = 8 meses en los cuales ambas variables presentan datos para correlacionar.



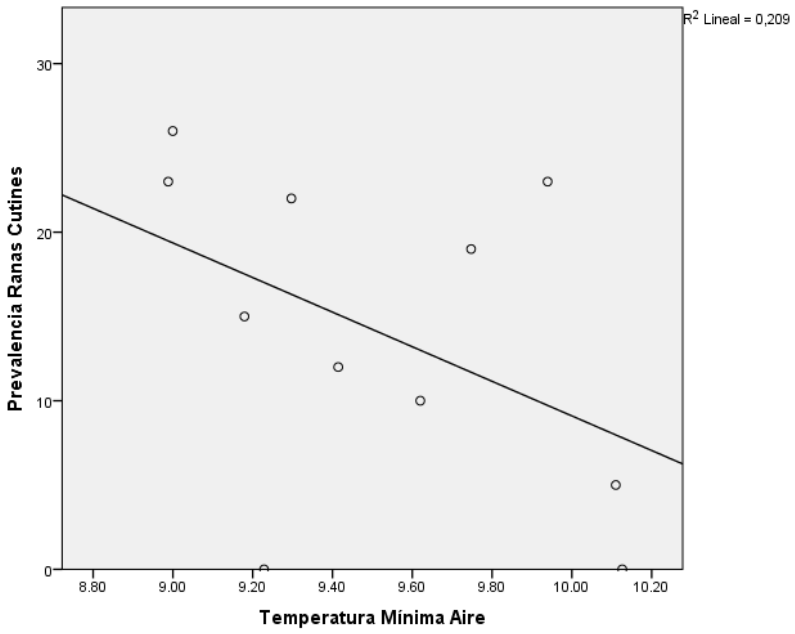
Anexo 37. Regresión entre la prevalencia de la enfermedad en *Pristimantis unistrigatus* vs. temperatura máxima. *N* = 11 meses en los cuales ambas variables presentan datos para correlacionar.



Anexo 38. Regresión entre la prevalencia de la enfermedad en *Pristimantis unistrigatus* vs. temperatura media. *N* = 11 meses en los cuales ambas variables presentan datos para correlacionar.



Anexo 39. Regresión entre la prevalencia de la enfermedad en *Pristimantis unistrigatus* vs. temperatura mínima. *N* = 11 meses en los cuales ambas variables presentan datos para correlacionar.



Anexo 40. Resultado de la prueba de regresión lineal para la correlación entre el promedio de infección en *Pristimantis unistrigatus* vs. precipitación. *N* = 8 meses en los cuales ambas variables presentan datos para correlacionar.

Correlaciones

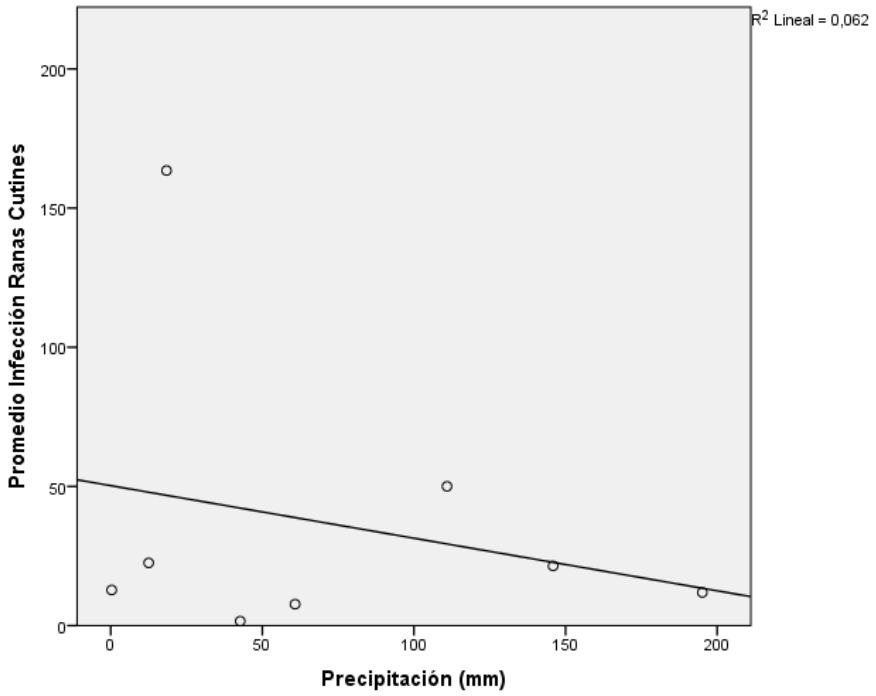
		Promedio Infección Ranas Cutines	Precipitación (mm)
Correlación de Pearson	Promedio Infección Ranas Cutines	1,000	-,249
	Precipitación	-,249	1,000
Sig. (unilateral)	Promedio Infección Ranas Cutines	.	,276
	Precipitación	,276	.
N	Promedio Infección Ranas Cutines	8	8
	Precipitación	8	8

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	Estadísticas de cambios: Sig. Cambio en F
1	,249[a]	,062	,552

a. Predictores: (Constante), Precipitación

Anexo 41. Regresión entre el promedio de infección en *Pristimantis unistrigatus* vs. precipitación. *N* = 8 meses en los cuales ambas variables presentan datos para correlacionar.



Anexo 42. Resultado de la prueba de regresión lineal para la correlación entre la prevalencia en *Pristimantis unistrigatus* vs. precipitación. *N* = 11 meses en los cuales ambas variables presentan datos para correlacionar.

Correlaciones

		Prevalencia Ranas Cutines	Precipitación (mm)
Correlación de Pearson	Prevalencia Ranas Cutines	1,000	,069
	Precipitación	,069	1,000
Sig. (unilateral)	Prevalencia Ranas Cutines	.	,420
	Precipitación	,420	.
N	Prevalencia Ranas Cutines	11	11
	Precipitación	11	11

Resumen del modelo

			Estadísticas de cambios
Modelo	R	R cuadrado	Sig. Cambio en F
1	,069[a]	,005	,841

a. Predictores: (Constante), Precipitación

Anexo 43. Regresión entre la prevalencia de la enfermedad en *Pristimantis unistrigatus* vs. precipitación. *N* = 11 meses en los cuales ambas variables presentan datos para correlacionar.

