



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

## **Facultad de Ciencias de la Vida**

**Realizar una ficha técnica para la elaboración de una propuesta de una guía titulada: Recomendaciones técnicas para el manejo adecuado de la especie *Hyloscirtus masphi* n. sp. dentro de la reserva privada de Mashpi Pichincha-Ecuador.**

### **INFORME DE PROYECTO INTEGRADOR**

Previa a la obtención del Título de:

**Biólogo**

Jonathan Joao Hernández Bravo

Andy Israel Veintimilla Lojan

**GUAYAQUIL – ECUADOR**

**AÑO: 2018**

## **AGRADECIMIENTOS**

Mis más sinceros agradecimientos a Dios por protegerme y darme fuerza durante todo mi camino para permitirme resistir dificultades y a levantarme en mis momentos más difíciles.

A mi padre y madre, que con su amor y guía me han permitido seguir adelante han estado apoyando en todo momento de forma incondicional. También a mis otros familiares por siempre darme apoyo moral.

A nuestra tutora de proyecto MSc. Paola Elizalde, por su valiosa guía y asesoramiento a la realización de esta.

Gracias a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de proyecto.

Jonathan Hernández

Los únicos a los que debo agradecer por todo el esfuerzo, la dedicación, el empuje, las enseñanzas, las malas noches, las iras, los bueno y malos momentos que tuvimos juntos, que al final me enseñaron que a pesar de todo lo que pase en mi vida, cosas buenas, cosas malas o las feas siempre van a estar ahí, apoyando a todos sus hijos, en la realización de sus metas y objetivos que se propongan en su vida y como ellos son las personas más importante en la vida de este servidor, esto va para el señor Dalton Veintimilla y la Señora Patricia lojan, sé que el trabajo de padres no es fácil, aunque somos humanos y tenemos nuestros aciertos y equivocaciones, ustedes siempre amaran a sus hijos.

Andy I. Veintimilla Lojan

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida y haberme permitido al haber llegado hasta este momento tan importante de mi vida. A mi madre, por ser uno de los pilares mas importantes en mi vida ya que ella siempre me ha mostrado cariño y apoyo incondicional en todo momento.

A mi padre, por confiar en mi y siempre guiarme para seguir por el buen camino. A mis profesores que con paciencia y amabilidad han sabido inculcarme no solo conocimientos valiosos para mi futuro profesional sino también como un ser humano de la sociedad, a mis compañeros de estudios con los que he pasado muchas cosas y gracias por haberlos conocido pude crecer como persona.

Y, por último, pero no menos importante agradezco a todos los científicos, naturistas y buscadores de conocimiento que me inspiraron a seguir este camino, les agradezco de todo corazón por darle un significado a mi vida.

Jonathan Hernández

Dedico este trabajo a la persona que más importa en estos momentos, gracias Andy Veintimilla que a lo largo del paso de tus años en ESPOL has venido madurando, dejando de ser el joven inquieto he inmaduro de cuando entraste a ser el hombre reflexivo y optimista que eres ahora, yo sé que pasaste hermosos momentos, pero también los más tristes y apabullantes, pero que al final y al cabo te sirvieron para convertirte en la hombre que eres ahora, y claro con un énfasis en todas las personas que fue conociendo en el camino y que se convirtieron en sus amigos, y claro al club Argumentum que fue una de las mejores decisiones que pudo haber tomado en su vida universitaria.

Andy I. Veintimilla Lojan

## EVALUADOR DEL PROYECTO

**Paola Elizabeth Elizalde Ruiz MSc.**

Tutor Proyecto Integrado

**Diego Arturo Gallardo Polit MSc.**

Profesor Materia Integradora

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

"La responsabilidad y la autoría del contenido de este Trabajo de Titulación, nos corresponde exclusivamente; y damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"

.....  
Jonathan Joao Hernández Bravo

.....  
Andy Israel Veintimilla Lojan

## RESUMEN

Se ha reportado una reducción de las poblaciones de anfibios a nivel mundial, y, una de las principales causas de su disminución, es por la aparición del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, causante de la enfermedad llamada Chytridiomycosis, produciendo queratinización en la piel de los anfibios, lo que conllevaría a su muerte, por ende nos proponemos examinar la presencia del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, en la población de la *Hyloscirtus mashpi n. sp.* mediante herramientas moleculares de identificación y su sintomatología, para proceder al mejoramiento de la propuesta de guía técnica de manejo, el área de muestreo será el estero de "La Laguna" que está dentro de la Reserva Privada Mashpi, Pichincha, Ecuador, con una duración de dos años, en donde se realiza el muestreo tanto en la temporada lluviosa como en la seca, por medio de un transecto perpendicular al estero, seleccionando tres localidades para la recolección de las muestras de agua, el análisis molecular es por PCR punto final, los resultados serán la división en tres categorías de las ranas que son : ranas sin signos clínicos y sin presencia del hongo, ranas sin signos clínicos pero con presencia del hongo, ranas con signos clínicos y con presencia del hongo, conjuntamente se esquematiza la cantidad de esporas presentes en el cuerpo de agua, de igual modo se revisará la propuesta de la guía técnica para su mejora.

## INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	ii
DEDICATORIA .....	iii
EVALUADOR DEL PROYECTO .....	iv
DECLARACIÓN EXPRESA .....	v
RESUMEN .....	vi
ÍNDICE GENERAL.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
ÍNDICE DE FIGURA .....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS .....	x
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO 1 .....	4
<b>1.1 Batrachochytrium dendrobatidis</b> .....	4
<b>1.1.1 Taxonomía y Morfología</b> .....	4
<b>1.1.2 Ciclo de vida</b> .....	5
<b>1.1.3 Historia en el mundo</b> .....	5
<b>1.1.4 Historia del hongo en Ecuador</b> .....	7
<b>1.1.5 Hipótesis sobre su propagación a nivel mundial</b> .....	7
<b>1.2 Enfermedad Chytridiomycosis</b> .....	8
<b>1.2.1 Signos clínicos</b> .....	8
<b>1.2.2 Patología</b> .....	9
<b>1.2.3 Formas de defensa contra la infección por <i>B. dendrobatidis</i> (Bd) en los anfibios</b> .....	10
<b>1.2.4 Tratamiento para la enfermedad</b> .....	11
<b>1.3 Rana <i>Hyloscirtus mashpi n. sp.</i></b> .....	12
<b>1.3.1 Taxonomía, Fisiología y Morfología</b> .....	12
<b>1.3.2 Historia de vida</b> .....	13
<b>1.3.3 Hábitat (todo sobre donde se encuentra localizada la rana)</b> 14	

<b>1.3.4</b>	<b>Importancia de los anfibios como Bioindicadores</b>	14
Capítulo 2		16
Materiales y Metodología		16
<b>2.1</b>	<b>Área de Estudio</b>	16
<b>2.2</b>	<b>Muestreo por transecto y Recolección de Muestras</b>	16
<b>2.3</b>	<b>Captura de las ranas <i>H. mashpi n. sp.</i></b>	16
<b>2.4</b>	<b>Toma de frotis de la rana</b>	17
<b>2.5</b>	<b>Recolección de muestras de agua</b>	17
<b>2.6</b>	<b>Extracción de ADN de los filtros de agua</b>	18
<b>2.7</b>	<b>PCR punto final</b>	19
CAPÍTULO 3		20
<b>3.1</b>	<b>Resultados Esperados</b>	20
<b>3.2</b>	<b>Impactos esperados</b>	22
RECOMENDACIONES		24
BIBLIOGRAFÍA		26
ANEXOS		35

## ÍNDICE DE FIGURA

FIGURA 1.1 Prototipo del manual técnico, portada.....	21
FIGURA 1.2 Prototipo del manual técnico, parte interna.....	22

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1 Matriz para el registro de la rana <i>H. mashpi</i> n. sp. encontradas en los hábitats dentro de la Reserva de Biodiversidad Mashpi.....</b>	<b>35</b>
<b>ANEXO 2 Tabla de explicación de los puntajes de calificación de estado de riesgo.....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXO 3 Descripciones de las posibles opciones de manejo.....</b>	<b>39</b>
<b>ANEXO 4 Resumen del presupuesto.....</b>	<b>40</b>
<b>ANEXO 5 Cronograma de actividades de proyecto de investigación.....</b>	<b>43</b>

## INTRODUCCIÓN

Fisiológicamente la piel es el órgano más importante en la anatomía de los anuros, pues es altamente permeable y vascularizada. Es la principal ruta respiratoria, de eliminación de gases y es la encargada de mantener el balance electrostático en el organismo de los anfibios[1]. La enfermedad Chytridiomycosis causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* altera las funciones de la piel causando un impacto negativo en diferentes especies de anuros. Declives poblacionales de diferentes especies de anuros alrededor del mundo se han visto asociados a esta enfermedad cutánea. [1].

La infección de *B. dendrobatidis* se evidencia cuando el hongo se encuentra en estadio de zoospora flagelada; en ese estadio se incrusta en las células epiteliales ricas en queratina y desencadena la infección [1]. En estadios tempranos de los anuros, las células de la piel empiezan a formar queratina durante la metamorfosis desencadenando que el hongo *B. dendrobatidis* se incruste en las células que forman la boca del renacuajo, y en el momento de la metamorfosis estas células se dispersan a la piel, expandiendo la infección en todo el cuerpo, por tal motivo solo sería cuestión de tiempo para su muerte [2] [1].

En el estudio realizado por Sánchez<sup>[3]</sup> en el 2008 se relata que en los Andes venezolanos desaparecieron tres especies de anuros por causa de *B. Dendrobatidis*. Por otra parte, Guayasamín<sup>[4]</sup> resalta que en la Reserva Las Galarias (bosque nublado del occidente de la cordillera de los Andes ecuatorianos), existe una alta prevalencia de *B. dendrobatidis*; pero no se ha

determinado si existe una disminución poblacional de anuros por esta causa. Esto evidencia que algunas especies, aunque se ha encontrado una alta prevalencia del patógeno, no existe mortalidad (i.e. *Lithobates catesbeianus*) en las poblaciones. Por tal motivo, Daszak<sup>[5]</sup> sugieren que algunas especies de anuros, pueden servir como vector del hongo *B. dendrobatidis* para otras especies más vulnerables[3].

Ecuador es un país megadiverso en cuanto a riqueza y distribución de anfibios, y la familia Hylidae es una de las más representativas[6]. Dentro de este género se encuentra la especie *H. mashpi* n. sp. que actualmente solo se ha registrado en los bosques circundantes de la Reserva privada de Mashpi, en Pichincha-Ecuador. En el estudio preliminar realizado por Guayasamín<sup>[7]</sup> se evidenció la presencia del hongo *B. dendrobatidis* en *H. mashpi* n. sp. reportando una prevalencia del 17,6%. En dicho estudio se recolectaron 34 muestras (6 positivos y 28 negativos) y todas fueron muestras de individuos adultos.

En este trabajo se pretende examinar la presencia del hongo *B. dendrobatidis* en el estero “La Laguna” y el grado de prevalencia de la enfermedad Chytridiomycosis causada por el mismo hongo en la población de *H. mashpi* n. sp. como la cantidad del hongo en el cuerpo de agua, mediante herramientas moléculas de identificación y su sintomatología, para el mejoramiento de la propuesta de guía técnica de manejo.

## **Objetivos Generales**

Evaluar la prevalencia del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) causante de la enfermedad Chytridiomycosis en la rana *Hylocirtus mashpi* en la Reserva privada de Mashpi, Pichincha-Ecuador para la elaboración de una propuesta de manejo técnico.

## **Objetivos Específicos**

1. Implementar una metodología para el levantamiento de información de la población *Hyloscirtus masphi* n. sp. que se encuentra en el estero "La Laguna" de la Reserva privada de Mashpi, Pichincha-Ecuador.
2. Examinar la prevalencia de la enfermedad Chytridiomycosis en la(s) población(es) de la rana *Hyloscirtus masphi* n. sp. mediante herramientas moleculares y observación de síntomas en los individuos.
3. Proponer un método de análisis molecular en el estero "La Laguna" que se encuentra ubicada en la Reserva Privada Mashpi Pinchincha Ecuador. para detectar la prevalencia del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd)

# CAPÍTULO 1

## INFORMACIÓN GENERAL

### 1.1 **Batrachochytrium dendrobatidis**

#### 1.1.1 **Taxonomía y Morfología**

El *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), es un hongo unicelular (Organismo Unicelular) que pertenece al Phylum *Chytridiomycota* del Orden *Rhizophydiales* [8]. El *B. dendrobatidis* tiene dos etapas de vida, la primera es la fase móvil, en el cual el hongo presenta zoosporas flageladas, y la segunda es la fase estática en la cual las zoosporas se adhieren y su estructura cambia para formar un cuerpo reproductivo que presenta talos monocéntricos con ejes rizoidales filiformes llamados zoosporangia [9].

Es el único miembro del Phylum *Chytridiomycota* que tiene la capacidad de parasitar y causar una enfermedad en vertebrados que es conocida como Chytridiomycosis [10]. Este hongo se encuentra en ambientes húmedos, sea en cuerpos de agua o suelos húmedos, y se ha encontrado que a menos de 10° C su crecimiento se ralentiza, mientras que al aumentar la temperatura a 27° C las zoosporas que están en el hospedador son eliminadas en 4 horas, y a 28° C el *B. dendrobatidis* detiene su crecimiento. Se ha comprobado que este hongo no es resistente a las desecaciones [11] [12], por tal motivo el crecimiento óptimo del hongo *B. dendrobatidis* es entre 17-25° C en un pH 6-7 [13][11].

Acorde con investigaciones realizadas en laboratorios el hongo *B. dendrobatidis* tiene la facultad de crecer en diferentes clases de sustratos que contengan queratina sea como piel de serpiente (tratada en autoclave), agar de queratina al 1%, agar de piel de ranas, plumas y patas de gansos [9][13][12]. Además hay que agregar los caparzones quitinosos de los crustáceos, en particular la queratina como la quitina no son nutrientes esenciales para que el hongo se enquistase en la piel de su hospedador [9][13][12][14].

### **1.1.2 Ciclo de vida**

El tiempo de maduración ( pasar de zoospora a zoosporangios) es de 5 días [15], en el cual las zoosporas flageladas se adhieren a la superficie epitelial de su huésped para dar paso al enquistamiento celular. Estos forman una pared celular que asimila a su flagelo y comienza a formar zoosporas con rizoides (talo monocentrico), que se transformaran en esporangios inmaduros dentro de las capas epiteliales. Dentro del citoplasma se produce divisiones mitóticas de células germinales que desarrollaran nuevas zoosporas, al formarse los zoosporangios monocéntrico. El hongo *B. dendrobatidis* alcanza su madurez celular y por cada talo hay solo un esporangio individual que presentan tubos de descargas, el cual libera los zoosporangio al ambiente para reiniciar el ciclo [9][16].

### **1.1.3 Historia en el mundo**

Aún se encuentra en debate el origen del *B. dendrobatidis* , pero se consideran dos hipótesis principales que son: La hipótesis del patógenos endémico y la del patógeno incipiente[17][18][19].

La hipótesis del patógeno endémico, define al *B. dendrobatidis* como un hongo cuya existencia ha sido documentada en diferentes localidades a través del tiempo. Se ha llegado a encontrar patrones entre el aumento de la temperatura causada por el cambio climático y el vínculo parasito-huésped, suscitando a contraer una mayor infección en las poblaciones de anfibios [17][18][19].

Por lo que se refiere a la hipótesis del patógeno incipiente, nos indica que la fuente del *B. dendrobatidis* está en un determinado punto geográfico (entre el continente Asiático y Africano). Con el tiempo paso a dispersarse a nuevas regiones ecológicas que permitieron el contagio y prevalencia entre las especies, llegando a mermar las poblaciones de anfibios susceptibles a este patógeno [17][18][19].

Según varios registros encontrados, se lo puede categorizar con una alta dispersión tanto geográfica como ecológica[10][20][19][21]. Uno de los más antiguos registros detalla que fue encontrado en Asia alrededor de 100 años atrás, y Fong<sup>[22]</sup> trazo la cepa de *B. dendrobatidis* hasta el año de 1911 en Corea; en contraste con los registros Goka<sup>[23]</sup> que llevo a identificar la cepa en ejemplares de *Andrias japonicus* conservados desde 1902.

En Sudamérica se registró una línea genética del hongo que lo remonta al menos 100 años atrás en los bosques de Brasil [24][25]. Según Lips<sup>[26]</sup> [27] se han registrado y teorizado que el *B. dendrobatidis* se ha expandido en un movimiento de tipo ola desde América del Norte a

través de América central (entre las décadas de 1970 y 1990), hasta llegar a Latino América. Por ende se han visto en la gran dificultad en precisar el origen exacto [28][29][30][22] ya que también se lo ha reportado tanto en Europa como en África.

#### **1.1.4 Historia del hongo en Ecuador**

En el Ecuador el primer caso de Chytridiomycosis fue en diciembre de 1980 afectando a las especies: *Atelopus bomolochos*, *Gastrotheca Pseustes*, *Hyla psarolima* y *Telmatobius niger*, [31]. A partir de esta fecha se ha identificado más especies de Anuros parasitados por este hongo, como el *Telmatobius niger* en 1990 , la *Gastrotheca pseustes* en diciembre de 1998 [32], y *Gastrotheca riobambae* en el Parque Metropolitano Guangüiltagua de Quito en el 2010 [33]. En la reserva Las Galarias en el 2014 se analizaron a 20 especies de anfibios de los cuales 17 resultaron positivos para la presencia de infección de *B. dendrobatidis* [34] y la *Hyloscirtus mashpi n. sp*, en la Reserva Privada Mashpi 2015, [7]

#### **1.1.5 Hipótesis sobre su propagación a nivel mundial**

Todavía no se ha definido claramente la formas como el *B. dendrobatidis* se ha diseminado alrededor del mundo, pero entre las explicaciones con mayor certeza está el comercio internacional de anfibios [35][36]. La rana toro Norte Americana *Lithobates catesbeianus* representa alrededor de 95% del comercio de anfibios en los Estados Unidos. Además es importada a gran escala a Sur América, China y Europa para consumo humano [36][37]. Mientras que la rana Africana de Uñas *Xenopus laevis* es utilizada para investigaciones científicas [28]. Estas dos especies han sido catalogadas como especies

reservorios que puede transmitir e infectar a especies nativas de anfibios con el *B. dendrobatidis* [28][38].

Además, se ha encontrado evidencias de la presencia de *B. dendrobatidis* en otras especies aparte de los anfibios y se han categorizado como vectores no anfibios [12][14]. Entre ellos están los exoesqueletos de los artrópodos, escamas de queratinas de aves acuáticas, tracto digestivo de cangrejos de ríos [9][12][14][39][40] y en la piel de los reptiles como lagartos y serpientes [41], llegando a favorecer más ampliamente en su diseminación ecológica y geográfica.

## **1.2 Enfermedad Chytridiomycosis**

### **1.2.1 Signos clínicos**

En el caso de los renacuajo, presentan despigmentación de las piezas bucales, la capacidad natatoria se vuelve letárgica, reduciendo la capacidad para alimentarse, y una reducción corporal sustancial [10][2][42].

Con respecto a los adultos, la forma como actúa el *B. dendrobatidis* es variada, en algunas especies es asintomática y en otra sintomática, siendo el peor de los casos la muerte súbita por falla cardíaca provocada por el desequilibrio osmótico de los electrolitos. Además, se puede observar trastornos cutáneos como la hiperqueratinización de la piel. En general los signos clínicos son: desprendimiento excesivo, enrojecimiento o decoloración, ulceraciones y erosiones infectadas del estrato corneo de la piel, inapetencia llevándolo a posiciones atípicas con falta de reacciones de supervivencia como son el escape o la huida.

Las infecciones se presenta mayormente en el parche pélvico y en los pies de estos animales [43][44].

### **1.2.2 Patología**

La infección en los renacuajos de los anfibios se da por la queratinización de las piezas bucales lo que lleva a presentar anomalías en el disco oral, como deformaciones en las filas dentales, pérdida de pigmentación y aplanamiento de las células epiteliales.[10][45]

La presencia de tallos quiméricos inmaduros (esporangios en maduración) se han encontrado en las capas queratinizadas de la piel de los anfibios (intracelularmente). La infección está ligada a la formación de un engrosamiento irregular que puede ser leve o grave (hiperqueratosis), tanto en las capas queratinizadas más superficiales de la epidermis (estrato córneo y estrato granuloso), la erosión del estrato córneo, junto con una hiperplasia (crecimiento tisular) y en el estrato espinoso se localiza por debajo de las capas epiteliales superficiales queratinizadas [43].

Los focos de infección muestran necrosis focal leve, edema intercelular (espongiosis), degeneración citoplasmática con inflamación mínima a leve y vacuolización de las capas celulares profundas [16]. La infección no afecta a los órganos internos en los anfibios adultos [46].

### **1.2.3 Formas de defensa contra la infección por *B. dendrobatidis* (Bd) en los anfibios**

Se ha investigado tres respuestas primordiales contra la infección por *B. dendrobatidis* en los anfibios. Una de las formas de defensa que tiene el anfibio contra la infección es el aumento de muda de todas las células epiteliales, ayudando a desechar las zoosporas enquistada en la piel (de igual forma en los anuros como en los caudados). Los investigadores han observado que esta respuesta es más activa en los caudados, pero manteniéndose como un reservorio de la enfermedad[47].

La segunda forma de respuestas que presenta algunos anfibios, es la activación del sistema inmunológico por el ingreso de las zoosporas al huésped, causando la activación del sistema nervioso el cual genera una estimulación de las glándulas de la epidermis, sintetizando y secretando péptidos antimicrobiales [48]. Diversos autores han indicados los mecanismos bioquímicos que son usados para examinar e inducir la disrupción de la membrana celular de las zoosporas y eliminar la infección mediante peptidos antimicrobiales de las familias caerina, citropina, uparina y dahelina [49]. Además se ha evidenciado que la familia Hylidae tiene la capacidad de producir estos peptidos antimicrobianos [50]. En relación con el sistema inmunológico, la infección activa la segunda fase por medio del aumento de linfocitos T y B, también los anticuerpos IgM, IgX e IgY [51][52]), en la etapa metamórfica de los anfibios hay un reducción de hasta el 40% de linfocitos, debido a la reorganización de los tejidos, dejando a las etapas juveniles más expuestas a la infección.

Por último, la tercera forma se la considera aun una hipótesis en la cual el anfibio modifica su comportamiento de termorregulación, evidenciando que los individuos infectados por *B. dendrobatidis* se trasladan de una zona fresca a una más calurosa [53]. Se presume que las poblaciones de anfibios en hábitats más calurosos muestran más resistencia a la enfermedad al compararse con poblaciones en zonas de climas templados o en zonas montañosas tropicales.

#### **1.2.4 Tratamiento para la enfermedad**

La enfermedad ha sido tratada con éxito en *Dendrobatidos*, bañando a las ranas moribundas por cinco minutos cada día, durante 11 días, con una suspensión de itraconazol a 0.01% en solución salina al 0.6%. Por ser la infección superficial, se ha visto resultados favorables al aplicar una pomada cutánea de itraconazol[54].

Recientes estudios realizados por Brucker<sup>[55]</sup> y Harris<sup>[56]</sup> han descubierto que algunas salamandras combaten la infección gracias a la presencia de bacterias simbióticas como la *Janthinobacterium lividum*, la cual secreta el metabolito violaceina. En otros estudios se demostró que al inocular la bacteria *Janthinobacterium lividum* en el anfibio *Atelopus zeteki*, no evito mortandad por quitridiomycosis por lo que significa que es necesario más estudios sobre los mecanismos del sistema inmune de los anfibios y las bacterias simbióticas encontradas en estas especies. Aunque el uso de probióticos ha demostrado ser conveniente como una forma de manejo y prevención del patógeno en algunos ecosistemas.

### 1.3 Rana *Hyloscirtus mashpi n. sp.*

#### 1.3.1 Taxonomía, Fisiología y Morfología

Entre las diversas familias de ranas arborícolas *Hylidae*, El género *Hyloscirtus* compone un importante grupo del Orden de los anuros. Morfológicamente se los puede identificar por poseer membranas dermales en los dedos de los pies y manos. La especie *Hyloscirtus mashpi n. sp.* ha sido establecido mediante análisis moleculares de filogenia[7], de acuerdo a estos análisis filogenéticos realizados en base al DNA mitocondrial (12S, tRNA<sup>val</sup> y 16S), se encontró que esta especie es la más cercana a sus congéneres *H. alytolylax*, *H. palmeri* y *H. simmonsii* [6].

Según Guayasamín esta nueva especie *Hyloscirtus mashpi n. sp.* fue anteriormente confundida con *H. alytolylax*, y por medio de estudios morfológicos, acústicos y análisis moleculares de filogenia se pudo comprobar que la *H. mashpi n. sp.* es una especie distinta a la *H. alytolylax*. Además se está recopilando evidencia para poder clasificar a dos posibles especies nuevas que habitan en la misma zona que la *H. Mashpi n. sp.* [7].

La especie *H. mashpi n. sp.*, presenta un dimorfismo sexual por tamaño, las hembras son de mayor tamaño (37.0-38.5 mm), y los machos (28.7-33.8 mm). Es una especie pequeña, con cuerpos relativamente esbeltos, hocico redondeado en las vistas dorsal y lateral. Mientras que el dorso de los machos suele ser de color verde amarillento pálido con una franja medio-dorsal marrón; las hembras suelen ser de un color marrón en el dorso con una banda medio-dorsal de color marrón oscuro,

las axilas y las regiones inguinales son de color verde amarillento en ambos géneros y la glándula mental en los machos está presente, en su mayoría sin pigmentar, el labio superior sin franja blanca, la iris es de color marrón a marrón cobrizo con una delgada reticulación negra; ausencia de almohadilla nupcial; tímpano redondeado pigmentado con la piel circundante presente en ambos género; pero el anillo timpánico solamente esta visible en las hembras; esta rana presenta procesos dentígenos de vómeros, prominentes, ligeramente curvado, con un espacio discernible, con 10-14 dientes cada uno; Sus llamadas de advertencia son de 2-3 notas con una llamada de duración de 330.9-380.2 ms, y una frecuencia dominante de 2842-2929 Hz [7].

### **1.3.2 Historia de vida**

La rana torrenticola *H. masphi n. sp.* es una especie de hábitos nocturnos que se encuentra restringida a la vegetación ribereña en bosques siempreverde piemontano. En su ecosistema podemos encontrar a la rana en parches de hojas y ramas a 30-400 cm al nivel del suelo y lo podemos ver activo en una variedad de condiciones climáticas[7].

En la Reserva privada de Biodiversidad Mashpi en el estudio de Guayasamin en el 2015 se descubrió que en estero "La Laguna" se encontró localizada la mayor abundancia de la población de este anfibio, con una captura de 68 individuos, se afirma que se puede encontrar hasta cuatro individuos por metro cuadrado.[7]

### **1.3.3 Hábitat (todo sobre donde se encuentra localizada la rana)**

La rana *H. masphi n. sp.* solo ha sido encontrada en locaciones al oeste de la cordillera de los Andes Ecuatorianos, en la provincia de Pichincha, con una elevación entre 778 a 1279 metros del nivel del mar[7].

Las localidades que ha registrado la presencia de la especie son: Milpe (0.0324° N, 78. 8660° O; 1120 m), Rio Sune chico (0.0680° N, 77. 3973° O; 908 m) y en la Reserva Privada Mashpi [7].

La distribución de la *Hyloscirtus masphi* se encuentra dentro de tres áreas protegidas que son: La Reserva Privada Mashpi , Área de conservación y uso sustentable Mashpi-Guaycuyacu-Saguangal (ACUS) y la reserva Milpe[7].

### **1.3.4 Importancia de los anfibios como Bioindicadores**

Los anfibios cumplen con un importante rol en las comunidades ecológicas, en especial en los ecosistemas de los humedales templados y los trópicos húmedos ya que se encuentran entre los organismos más abundantes.

En algunos de estos ecosistemas la biomasa de los anfibios es mayor a la suma de la biomasa de aves y mamíferos junto[57]. Una de sus características principales es que al ser ectodermos la mayor parte de la energía que consumen es transformada en biomasa, ya que al ser devorados por otros animales su energía pasa a los niveles superiores

de la cadena trófica, de esta forma contribuyen al flujo de energía en el ecosistema.

Otro rasgo de los anfibios es su susceptibilidad a las alteraciones de los cambios climáticos como los patrones de lluvia y temperatura, pero a la vez esta susceptibilidad los ha hecho vulnerable a los cambios de temperaturas causados por el calentamiento global, sumado a esto a la destrucción de su medio ambiente, ha causado la reducción en la biodiversidad de los anfibios a nivel global [58].

Las investigaciones realizadas por diferentes biólogos han relacionado el cambio climático con la aparición de enfermedades emergentes como es el caso de la enfermedad Chitridiomycosis causada por el hongo *B. dendrobatidis* esto porque lo han podido vincular con la desaparición de poblaciones de anfibios, en varias regiones donde ha sido detectado evidencia de la presencia del *B. dendrobatidis* [59][60].

## Capítulo 2

### Materiales y Metodología

#### 2.1 Área de Estudio

El área de muestreo fue seleccionada en base al trabajo de Guayasamin[7], que presenta parches de *H. mashpi* n. sp. de cuatro adultos por metros cuadrados, en el área denominada estero "La Laguna" (0.1665° N, 78.8713° W; 1015 m) en la Reserva Privada Mashpi, Pichincha, Ecuador. Esta zona tiene segmento loticos pocos profundos con gran cantidad de piedras, y gran vegetación ribereña de bosque primario piemonte siempre verde, y con segmentos lenticos de gran acumulación de agua, con forraje y fondo rocoso[7].

#### 2.2 Muestreo por transecto y Recolección de Muestras

Se recomienda realizar una transecta paralela al estero "La Laguna" de 300 m de longitud y de 4 metros de ancho[61]. los muestreos se deben realizar en la temporada de lluvia (febrero y marzo), y en la temporada "seca" (agosto y septiembre) por dos años [62].

#### 2.3 Captura de las ranas *H. mashpi* n. sp.

Los adultos capturados, serán registrados por medio de una ficha que se encuentra descrita en el anexo 1 en donde se tomara en cuenta sus signos clínicos, la captura se recomienda que sea en la noche (aproximadamente a las 20:00 horas), utilizando a dos personas en cada transecto. Las ranas serán marcadas mediante el procedimiento estándar (toe-clipping), desinfectándola con Betadine (solución al 1%) y

sellada con vetbond [63] [7], ( el procedimiento de identificación y marcaje se la realizara de forma *in-situ*). Se recomienda llevar una mesa, botas de goma, cubos, redes, bolsas de plástico (para desechar las muestras contaminadas) y guantes quirúrgicos ya que estas pueden lavarse y desinfectarse o descartarse con facilidad. Los equipos de campo se desinfectan con hipoclorito de sodio al 4% [61].

Los instrumentos deben desinfectarse luego de haber entrado en contacto con las ranas *H. mashpi* n. sp., para lo cual se puede sumergir estos instrumentos por 30 minutos en alcohol etílico 70%. La desinfección del equipo se realizará en el mismo lugar de trabajo para evitar la dispersión del patógeno, y evitando los cuerpos de agua.

#### **2.4 Toma de frotis de la rana**

Para minimizar el riesgo de contaminación se efectuará el protocolo de Hyatt<sup>[64]</sup>, Con un hisopo estéril, se procede a frotar en total 10 veces en las zonas inguinal y las palmeaduras y dedos de las manos y patas de los adultos. Se guardará cada hisopo individualmente en un tubo de ensayo estéril y se almacenará en contenedores aislantes manteniendo una temperatura de 4 °C.

#### **2.5 Recolección de muestras de agua**

En el estero "La Laguna" se seleccionará tres locaciones de muestreos. La primera zona será la que tenga mayor concurrencia de turistas para

bañarse, a partir de este punto se tomarán muestras en una locación estero arriba (100 m) y en otra locación estero a bajo (100 m) para cuantificar la presencia o ausencia del *B. dendrobatidis* [65]. En cada sitio se recolectará 2 litros de agua y se la pasara a través de un filtro Sterivex GP 0.2  $\mu\text{m}$  (miliporos). El muestreo se realizará por triplicado en cada sitio y los filtros serán almacenados y congelados[66]. Este procedimiento se lo realizará en la temporada de lluvia (febrero y marzo), y en la temporada “seca” (agosto y septiembre) por dos años[62].

## **2.6 Extracción de ADN de los filtros de agua**

Se extraerá el ADN de los filtros con el kit Puregene para tejido (Gentra Sistemas), modificando el protocolo de extracción del fabricante, añadiendo 0,9 ml de lisis buffer con proteasa K (0,1 mg ml<sup>-1</sup>) a los filtros. Se los sella en la cápsula y se las incuba a 55 ° C durante 60 min con rotación continua para bañar los filtros en solución de lisis. Se drena la mezcla de lisis de los filtros, y se retoma el protocolo del fabricante, escalando las soluciones por un factor de 3 y el ADN extraído se lo almacena a -20 ° C[66].

Para minimizar la perdida de ADN, se realizara un paso extra. Se limpia el filtro de giro Mobio según el protocolo del fabricante, usando Genereleaser (Bioventures) modificado. Se añade 2  $\mu\text{l}$  de extracto de ADN a los 6  $\mu\text{l}$  de Genereleaser y se lo mantiene a una temperatura de 80 ° C durante 20 min, luego se lo centrifuga a 10000  $\times$  g por 5 s[66].

## 2.7 PCR punto final

Se usará un método de precipitación de sal (M. Fujita, no publicado) basado en el kit de purificación de ADN puregene (Gentra Systems). Además se usaran los cebadores Bd1a (5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3') y Bd2a (5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3') para comprobar la presencia de *B. Dendrobatidis*. Este protocolo ha sido previamente descrito por Annis[5], La reacción de PCR se estableció hasta una concentración final de MgCl<sub>2</sub> 3 mM, DNTP 0.2 mM, 0.05 U / μL Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 0.5-μM de cada cebador en un volumen total de 25 μL. Según el protocolo de PCR de Annis[5], cuando el productos sea insuficiente o dudoso, se procederá a llevar a cabo una PCR adicional, usando una dilución 1:50 del producto depurado de la primera PCR. según lo descrito por Guayasamin[7], el control negativo será agua destilada en lugar de ADN, y la presencia se determinara con la visualización de la banda amplificada en electroforesis en gel de agarosa.

## **CAPÍTULO 3**

### **RESULTADOS**

#### **3.1 Resultados Esperados**

Según el estudio de Guayasamin[7] se esperaría tener un encuentro de cuatro adultos por metro cuadrado. Se estima muestrear alrededor de treinta individuos como mínimo y con un máximo de 100 individuos, para que sea una cantidad estadísticamente significativa.

La extracción e identificación del material genético del hongo *B. dendrobatidis* junto con la evaluación de los signos, ayudaría a definir las tres categorías o estado de las ranas que son: ranas sin signos clínicos y sin presencia del hongo, ranas sin signos clínicos pero con presencia del hongo, ranas con signos clínicos y con presencia del hongo, Simultáneamente se detectarían las esporas del hongo *B. dendrobatidis*, tanto en la temporada de invierno como en la temporada de verano, de las muestras de agua recolectadas, generando un registro de las variaciones cuantitativas de las esporas de hongo *B. dendrobatidis*, de las dos temporadas.

Los datos serán esquematizados según su temporada (invierno y verano), lo cual marcará patrones históricos temporales de sus posibles variaciones y permitirá considerar en que temporadas se debe tener más atención a los posibles recorridos que se realiza con los turistas en las zonas con mayor presencia del hongo.

Además, se presenta un prototipo del manual de guía de manejo, en donde se aborda de una forma simple y fácil de entender la problemática del hongo *B. dendrobatidis* en la reserva y como los turistas pueden reducir el impacto para la rana *H. masphi n. sp.*



**Imagen 1.1: Prototipo del manual técnico, portada.**



**La Laguna**

Es una área con segmento loticos pocos profundos con gran cantidad de piedras, y gran vegetación ribereña de bosque primario piemonte siempre verde.

## Somos dispersores potenciales del hongo

Para prevenir su propagación lo que debe realizar son estas siguientes acciones.

### Remover

Antes de abandonar fuentes de agua se recomienda revisar la ropa y remover los restos de vegetación, barro, sedimentos que se hayan quedado pegados a las vestimentas.

### Lavar

Se agradece a los turistas si limpian sus botas antes de abandonar las fuentes de agua donde hayan estado.

### Secar

Secar al sol la ropa que se haya usado en el agua y esperar tres horas antes de volverla a usar.

### Planes a futuro

Los planes a largo que se pueden tomar si se encuentra en riesgo el lugar, se lo puso en impactos esperados, todo lo que sea a largo plazo.

## Batrachochytrium dendrobatidis

Una de las principales amenazas a la biodiversidad de anfibios es la enfermedad conocida como Quitridiomycosis que afecta la piel de la rana esta es causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), este hongo se transporta en ambientes húmedos por lo cual no tiene resistencia a desecaciones.

## Chytridiomycosis

Por la sintomatología de la rana

- Enrojecimiento de la piel de las ranas
- Desprendimiento de la piel
- La rana presenta posturas anormales en sus patas

## ¿Por que es un Riesgos?

El hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* se encuentra dispersa por todo el mundo, se desarrolla en lugares con gran presencia de agua lo que representa en una amenazas a las poblaciones de anfibios a nivel mundial.

En los Andes venezolanos desaparecieron tres especies de anuros por causa de *B. dendrobatidis*.



**Imagen 1.2: Prototipo del manual técnico, parte interna.**

### 3.2 Impactos esperados

El manual que estamos proponiendo son medidas técnicas que se pueden adoptar en la Reserva Privada Mashpi, llegando a tener un impacto tanto en lo económico, ambiental y social, que a largo plazo son significativas tanto para la especie misma como para la reserva.

En el aspecto económico el hábitat de la rana *H. masphi* n. sp. la Reserva Privada Mashpi, y el principal ingresos económicos provienen de los turistas (huéspedes) que llegan a visitar y conocer esta bio-región,

poseedora de una biodiversidad de especies endémicas como es la *H. masphi* n. sp. transformándose en una especie insignia de la reserva, lo que representa en un gran atractivo para los turistas, y si se considera implementar nuestras medidas de manejo técnico, se puede ayudar, evitando el riesgo de la pérdida de una especie insignia lo que conllevaría en la disminución de un atractivo biológico y único, conllevando en la reducción de los turistas y en los posibles ingresos que se tendría la Reserva Privada Mashpi.

En relación con lo ambiental, o más bien en lo ecológico siempre será de gran importancia la protección de una especie, y en especial si es endémica, y ante una posible desaparición, como se puede dar en nuestro caso, lo que podría causar sería, una alteración del equilibrio ecológico en su ecosistema, desde un punto de vista ecológico, la rana puede fungir tanto como depredador de algunas especies de insectos, o como alimento de algún depredador, y de los cuales también pueden ser endémicos de la región, siendo la cadena trófica la más afectada en todo esto, por ende su gran importancia para la Reserva Privada Mashpi en la prevención de la diseminación del hongo *B. dendrobatidis*, y de esta forma se podrán realizar estudios que permita entender el estado de riesgo real de la rana, y simultáneamente analizar las diferentes opciones de manejo que se deberían adoptar ante las condiciones y necesidades de la Reserva Privada Mashpi a largo plazo.

Con respecto a lo social, el manual dará a conocer los aspectos más importantes acerca de la enfermedad y lo que se puede hacer para evitar su diseminación, lo que conllevara a mantener los objetivos generales de la reserva, que es la de compartir todos los conocimientos

tanto a las comunidades locales, como a todos los habitantes del Ecuador y claro a los turistas de la fauna y flora, y su importancia para la conservación de esta bio-región.

En conclusión, los aspectos que van a beneficiar el manual es de gran relevancia, tanto en la autonomía económica de la reserva, en la protección de una especie endémica, y, la socialización de la información a todas las personas dentro y fuera del país, conllevando a una sostenibilidad a largo plazo.

## RECOMENDACIONES

Por lo que se refiere a las recomendaciones se considera expender la investigación a las demás áreas y especies que se encuentran en la reserva:

1. Ampliar el estudio de la especie *H. masphi* n. sp. por parte de los investigadores dentro de la reserva privada, para identificar en que estadio de su ciclo de vida, es más susceptible la rana, conllevando a definir si los cuerpos de agua donde están los criaderos, o, en las hojas de los árboles que están en los senderos presentan mayor riesgo de la enfermedad.
2. Expandir la búsqueda de la presencia del hongo *B. dendrobatidis* a otras de las especies de anfibios que se encuentra en el estero La Laguna para analizar el potencial riesgo de la expansión del hongo a nuevas

especies, lo que implicaría una llamada de alerta para la reserva en el plan de manejo a implementar.

3. Se debería replicar nuestra metodología de levantamiento de información en otras áreas con cuerpos de agua dentro de la reserva, para definir los cuerpos de agua que presente presencia del hongo y poder identificar las especies de anfibios circundante que están en riesgo.
4. Creación de una nueva metodología que permita el levantamiento de información dentro de los senderos de la reserva, porque nos permitiría expandir los estudios para poblaciones de anfibios adultos que no se encuentran cerca de los cuerpos de agua.
5. Se debería hacer un contraste de los lugares en donde los turistas tiene acceso tanto los senderos como cuerpos de agua, con las áreas en donde se tiene restringido el acceso, para que se pueda relacionar si la presencia de personas en áreas de libre acceso son los que pueden estar influenciado a la diseminación del hongo.
6. Evaluar los aspectos seleccionados de la propuesta del manual técnico presentado en la reserva, renovándolo cada vez que se encuentre nuevas evidencias de como el hongo *B. dendrobatidis* está afectando dentro de la reserva, proponiendo controles y métodos de bioseguridad que debe implementar.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] E. J. Baitchman and A. P. Pessier, "Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Amphibian Chytridiomycosis," *Vet. Clin. North Am. - Exot. Anim. Pract.*, vol. 16, no. 3, pp. 669–685, 2013.
- [2] L. J. Rachowicz and V. T. Vredenburg, "Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages," *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 61, no. 1–2, pp. 75–83, 2004.
- [3] D. Sánchez, A. Chacón-Ortiz, F. León, B. A. Han, and M. Lampo, "Widespread occurrence of an emerging pathogen in amphibian communities of the Venezuelan Andes," *Biol. Conserv.*, vol. 141, no. 11, pp. 2898–2905, 2008.
- [4] J. M. Guayasamin, Á. M. Mendoza, A. V. Longo, K. R. Zamudio, and E. Bonaccorso, "High prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in an Andean frog community (Reserva Las Gralarias, Ecuador)," *Amphib. Reptil. Conserv. Amphib. Reptil. Conserv.*, vol. 8, no. 81, pp. 33–44, 2014.
- [5] S. L. Annis, F. P. Dastoor, H. Ziel, P. Daszak, and J. E. Longcore, "A DNA-BASED ASSAY IDENTIFIES *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS* IN AMPHIBIANS," *J. Wildl. Dis.*, vol. 40, no. 3, pp. 420–428, 2004.
- [6] J. FAIVOVICH, C. F. B. HADDAD, P. C. A. GARCIA, D. R. FROST, J. A. CAMPBELL, and W. C. WHEELER, "SYSTEMATIC REVIEW OF THE FROG FAMILY HYLIDAE, WITH SPECIAL REFERENCE TO HYLINAE: PHYLOGENETIC ANALYSIS AND TAXONOMIC REVISION," *Bull. Am. Museum Nat. Hist.*, vol. 294, no. 1, p. 1, 2005.
- [7] J. M. Guayasamin *et al.*, "Molecular phylogeny of stream treefrogs

(Hylidae: *Hyloscirtus bogotensis* Group), with a new species from the Andes of Ecuador,” *Neotrop. Biodivers.*, vol. 1, no. 1, pp. 2–21, 2015.

- [8] P. M. Letcher, M. J. Powell, P. F. Churchill, and J. G. Chambers, “Ultrastructural and molecular phylogenetic delineation of a new order, the Rhizophydiales (Chytridiomycota),” *Mycol. Res.*, vol. 110, no. 8, pp. 898–915, 2006.
- [9] J. E. Longcore, A. P. Pessier, and D. K. Nichols, “*Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a Chytrid Pathogenic to Amphibians,” *Mycologia*, vol. 91, no. 2, p. 219, 1999.
- [10] L. Berger *et al.*, “Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 95, no. 15, pp. 9031–9036, 1998.
- [11] M. L. Johnson, L. Berger, L. Philips, and R. Speare, “Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*,” *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 57, no. 3, pp. 255–260, 2003.
- [12] A. Garmyn *et al.*, “Waterfowl: Potential environmental reservoirs of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*,” *PLoS One*, vol. 7, no. 4, 2012.
- [13] J. S. Piotrowski, S. L. Annis, and J. E. Longcore, “Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a Chytrid Pathogen of Amphibians,” *Mycologia*, vol. 96, no. 1, p. 9, 2004.
- [14] T. A. McMahon *et al.*, “Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* has nonamphibian hosts and releases chemicals that cause pathology in the absence of infection,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 1, pp. 210–

215, 2013.

- [15] A. Spitzen-Van Der Sluijs *et al.*, "Rapid enigmatic decline drives the fire salamander (*salamandra salamandra*) to the edge of extinction in the netherlands," *Amphib. Reptil.*, vol. 34, no. 2, pp. 233–239, 2013.
- [16] L. Berger, A. D. Hyatt, R. Speare, and J. E. Longcore, "Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*," *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 68, no. 1. pp. 51–63, 2005.
- [17] L. J. Rachowicz *et al.*, "The novel and endemic pathogen hypotheses: Competing explanations for the origin of emerging infectious diseases of wildlife," *Conservation Biology*, vol. 19, no. 5. pp. 1441–1448, 2005.
- [18] P. Daszak, A. A. Cunningham, and A. D. Hyatt, "Emerging infectious diseases of wildlife - Threats to biodiversity and human health," *Science*, vol. 287, no. 5452. pp. 443–449, 2000.
- [19] P. Daszak, A. a Cunningham, and A. D. H. Consortium, "Infectious disease and amphibian population declines," *Divers. Distrib.*, vol. 9, no. 2, pp. 141–150, 2003.
- [20] P. Daszak, L. Berger, A. a Cunningham, a D. Hyatt, D. E. Green, and R. Speare, "Emerging infectious diseases and amphibian population declines.," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 5, no. 6, pp. 735–48, 1999.
- [21] M. R. Whiles *et al.*, "The effects of amphibian population declines on the structure and function of neotropical stream ecosystems," *Frontiers in Ecology and the Environment*, vol. 4, no. 1. pp. 27–34, 2006.
- [22] J. J. Fong, T. L. Cheng, A. Bataille, A. P. Pessier, B. Waldman, and V. T. Vredenburg, "Early 1900s detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Korean amphibians," *PLoS One*, vol. 10, no. 3, 2015.

- [23] K. Goka *et al.*, “Amphibian chytridiomycosis in Japan: Distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan,” *Mol. Ecol.*, vol. 18, no. 23, pp. 4757–4774, 2009.
- [24] E. B. Rosenblum *et al.*, “Complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed with genome resequencing data,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 23, pp. 9385–9390, 2013.
- [25] D. Rodriguez, C. G. Becker, N. C. Pupin, C. F. B. Haddad, and K. R. Zamudio, “Long-term endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic Forest of Brazil,” *Mol. Ecol.*, vol. 23, no. 4, pp. 774–787, 2014.
- [26] K. R. Lips, “Mass mortality and population declines of anurans at an upland site in Western Panama,” *Conserv. Biol.*, vol. 13, no. 1, pp. 117–125, 1999.
- [27] K. R. Lips, J. R. Mendelson, A. Muñoz-Alonso, L. Canseco-Márquez, and D. G. Mulcahy, “Amphibian population declines in montane southern Mexico: Resurveys of historical localities,” *Biol. Conserv.*, vol. 119, no. 4, pp. 555–564, 2004.
- [28] C. Weldon, L. H. Du Preez, A. D. Hyatt, R. Muller, and R. Speare, “Origin of the amphibian chytrid fungus,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 10, no. 12, pp. 2100–2105, 2004.
- [29] T. Y. James *et al.*, “Rapid global expansion of the fungal disease chytridiomycosis into declining and healthy amphibian populations,” *PLoS Pathog.*, vol. 5, no. 5, 2009.
- [30] C. Bai, X. Liu, M. C. Fisher, T. W. J. Garner, and Y. Li, “Global and endemic Asian lineages of the emerging pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* widely infect amphibians in China,”

*Divers. Distrib.*, vol. 18, no. 3, pp. 307–318, 2012.

- [31] S. R. Ron and A. Merino-Viteri, “Amphibian declines in Ecuador: overview and first report of chytridiomycosis from South America,” *Frog Log*, vol. 42, no. September, pp. 2–3, 2000.
- [32] A. Merino-Viteri, “Análisis de posibles causas de las disminuciones de poblaciones de anfibios en los Andes del Ecuador,” Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2001.
- [33] S. M. R. J and M. L. R. B, “Estado poblacional y relaciones ecológicas de *Gastrotheca riobambae* ( Anura : Hemiphractidae ) en dos localidades del Volcán,” *Boletín Técnico 10*, vol. 7, no. March, pp. 69–97, 2011.
- [34] J. M. Guayasamin, K. R. Zamudio, A. M. Mendoza, and E. Bonaccorso, “High prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in an Andean frog community (Reserva Las Gralarias, Ecuador),” *Amphib. Reptile Conserv.*, vol. 8, no. August, pp. 33–34, 2014.
- [35] L. M. Schloegel *et al.*, “Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade,” *Mol. Ecol.*, vol. 21, no. 21, pp. 5162–5177, 2012.
- [36] M. C. Fisher and T. W. J. Garner, “The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species,” *Fungal Biology Reviews*, vol. 21, no. 1. pp. 2–9, 2007.
- [37] A. Herrel and A. Van Der Meijden, “An analysis of the live reptile and amphibian trade in the USA compared to the global trade in endangered species,” *Herpetol. J.*, vol. 24, no. February 2016, pp. 103–110, 2014.
- [38] J. J. L. Rowley and R. A. Alford, “Behaviour of Australian rainforest stream frogs may affect the transmission of chytridiomycosis,” *Dis.*

*Aquat. Organ.*, vol. 77, no. 1, pp. 1–9, 2007.

- [39] M. L. Johnson and R. Speare, “Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: Quarantine and disease control implications,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 9, no. 8, pp. 922–925, 2003.
- [40] M. L. Johnson and R. Speare, “Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment,” *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 65, no. 3, pp. 181–186, 2005.
- [41] V. L. Kilburn, R. Ibáñez, and D. M. Green, “Reptiles as potential vectors and hosts of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Panama,” *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 97, no. 2, pp. 127–134, 2011.
- [42] S. M. Hanlon, K. J. Lynch, J. Kerby, and M. J. Parris, “*Batrachochytrium dendrobatidis* exposure effects on foraging efficiencies and body size in anuran tadpoles,” *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 112, no. 3, pp. 237–242, 2015.
- [43] L. Berger, R. Speare, and L. F. Skerratt, “Distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and pathology in the skin of green tree frogs *Litoria caerulea* with severe chytridiomycosis,” *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 68, no. 1, pp. 65–70, 2005.
- [44] R. Puschendorf and F. Bolaños, “Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Eleutherodactylus fitzingeri*: effects of skin sample location and histologic stain,” *J. Wildl. Dis.*, vol. 42, no. 2, pp. 301–306, 2006.
- [45] G. Marantelli, L. Berger, R. Speare, and L. Keegan, “Distribution of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin during tadpole development,” *Pacific Conserv. Biol.*, vol. 10, no. 2–3, pp. 173–179, 2004.
- [46] R. E. Miller and M. Fowler, *Amphibian chytridiomycosis*. In: Fowler ME,

*Miller ER (eds) Zoo and Wild Animal Medicine. 2008.*

- [47] E. W. Davidson, M. Parris, J. P. Collins, J. E. Longcore, A. P. Pessier, and J. Brunner, "Pathogenicity and Transmission of Chytridiomycosis in Tiger Salamanders (*Ambystoma tigrinum*)," *Copeia*, vol. 2003, no. 3, pp. 601–607, 2003.
- [48] L. A. Rollins-Smith and J. M. Conlon, "Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations," *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 29, no. 7, pp. 589–598, 2005.
- [49] J. Wiesner and A. Vilcinskas, "Antimicrobial peptides: The ancient arm of the human immune system," *Virulence*, vol. 1, no. 5, pp. 440–464, 2010.
- [50] J. M. Conlon, "The contribution of skin antimicrobial peptides to the system of innate immunity in anurans," *Cell and Tissue Research*, vol. 343, no. 1, pp. 201–212, 2011.
- [51] L. A. Rollins-Smith, J. P. Ramsey, J. D. Pask, L. K. Reinert, and D. C. Woodhams, "Amphibian immune defenses against chytridiomycosis: Impacts of changing environments," in *Integrative and Comparative Biology*, 2011, vol. 51, no. 4, pp. 552–562.
- [52] J. Voyles, E. B. Rosenblum, and L. Berger, "Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: A review of pathogenesis and immunity," *Microbes and Infection*, vol. 13, no. 1, pp. 25–32, 2011.
- [53] C. L. Richards-Zawacki, "Thermoregulatory behaviour affects prevalence of chytrid fungal infection in a wild population of Panamanian golden frogs," *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 277, no. 1681, pp. 519–528, 2010.
- [54] K. Wright and B. Whitaker, *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*,

vol. 53. 2001.

- [55] R. M. Brucker, C. M. Baylor, R. L. Walters, A. Lauer, R. N. Harris, and K. P. C. Minbiole, "The identification of 2,4-diacetylphloroglucinol as an antifungal metabolite produced by cutaneous bacteria of the salamander *Plethodon cinereus*," *J. Chem. Ecol.*, vol. 34, no. 1, pp. 39–43, 2008.
- [56] R. N. Harris, A. Lauer, M. A. Simon, J. L. Banning, and R. A. Alford, "Addition of antifungal skin bacteria to salamanders ameliorates the effects of chytridiomycosis," *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 83, no. 1, pp. 11–16, 2009.
- [57] F. H. Pough, "The Advantages of Ectothermy for Tetrapods," *Am. Nat.*, vol. 115, no. 1, pp. 92–112, 1980.
- [58] D. Bickford, S. D. Howard, D. J. J. Ng, and J. A. Sheridan, "Impacts of climate change on the amphibians and reptiles of Southeast Asia," *Biodivers. Conserv.*, vol. 19, no. 4, pp. 1043–1062, 2010.
- [59] K. M. Kriger and J. M. Hero, "Large-scale seasonal variation in the prevalence and severity of chytridiomycosis," *J. Zool.*, vol. 271, no. 3, pp. 352–359, 2007.
- [60] J. Bosch, L. M. Carrascal, L. Duran, S. Walker, and M. C. Fisher, "Climate change and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of Central Spain; is there a link?," *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 274, no. 1607, pp. 253–260, 2007.
- [61] A. Angulo, *Técnicas de Inventario y Monitoreo para los Anfibios de la Región Tropical Andina*, Serie Manu. Bogotá: Conservación Internacional Colombia, 2006.
- [62] "Plan de Monitoreo, Control y Vigilancia Ambiental en las ACUS Mashpi-Guaycuyacu-Sahuangal y Sistema Hídrico y Arqueológico Pachijal,

Distrito Metropolitano de Quito,” Municipio del Distrito Metropolitano de Quito, 2015.

- [63] R. Wellington and R. Hearing, *Hygiene protocol for the control of disease in frogs (PDF - 1.1MB)*, no. 6. Hurstville NSW, 2001.
- [64] A. D. Hyatt *et al.*, “Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*,” *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 73, no. 3. pp. 175–192, 2007.
- [65] C. Díaz, X. Molina, and V. Montecino, “Manual para el Monitoreo e Identificación de la Microalga Bentónica *Didymosphenia geminata*,” 2012.
- [66] J. D. Kirshtein, C. W. Anderson, J. S. Wood, J. E. Longcore, and M. A. Voytek, “Quantitative PCR detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* DNA from sediments and water,” *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 77, no. 1, pp. 11–15, 2007.







**ANEXO 2 Tabla de explicación de los puntajes de calificación de estado de riesgo.**

Calificación de riesgo	Posibles impactos en el estado de los anfibios
Muy alto	<p>Es probable que el impacto de la quitridiomycosis sea extremo, cuando incluye:</p> <p>Un impacto significativo a gran escala en una especie no amenazada de modo que la especie es probable que se convierta en amenazada.</p> <p>y/o</p> <p>Un impacto significativo a gran escala en una especie amenazada de tal manera que su estado de conservación empeoraría, incluyendo el potencial de extinción.</p>
Alto	<p>Es probable que el impacto de la quitridiomycosis sea altamente significativo, cuando incluye:</p> <p>Impactos en la población local (la especie puede extinguirse localmente o sufrir una declinación significativa) en una especie no amenazada, con más de una población por especie afectada,</p> <p>y/o</p> <p>Impactos de la población local en una especie amenazada, con una sola población por especie afectada (la especie puede extinguirse localmente o sufrir declinaciones significativas).</p>
Medio	<p>El impacto de la quitridiomycosis es probable que sea significativo, cuando incluye:</p> <p>Impacto de la población local en una especie no amenazada, con una sola población por especies afectadas (la especie se presume ausente o puede sufrir declinaciones significativas).</p>
Bajo	<p>El impacto de la quitridiomycosis es poco probable que sea significativo para poblaciones o individuos</p>

### ANEXO 3 Descripciones de las posibles opciones de manejo.

	Menos intervención			Intervención de emergencia		
Posibles respuestas de poblaciones de anfibios a hongo Quitridio	En marcha baja intensidad Monitoreo	En marcha alta intensidad Monitoreo	Dirigido bioseguridad	Cuarentena	Tratamiento <i>in situ</i>	Establecer seguro de poblaciones
Sin disminución detectable después el hongo Quitridio emerge	x					
Población de alto riesgo adyacente a una población infectada		x	x			
Rápido declive con recuperación de la población		x				
Rápido declive con lento declive continuo donde la población permanece deprimido		x			x	
Rápido declive hacia extinción		x	x	x	x	x

#### ANEXO 4 Resumen del presupuesto.

RESUMEN DEL PRESUPUESTO				
DESCRIPCION DE RUBROS	Precio	Cantidad	sub-Total	Total
<b>1. RECURSOS HUMANOS</b>				
Pilotos	1100	3	3300	
Operarios	1000	3	3000	
científicos /técnicos	800	2	1600	
<b>TOTAL RECURSOS HUMANOS</b>				7900
<b>2. GASTOS OPERATIVOS DEL PROYECTO</b>				
Movilización terrestre	25	2	50	
<b>TOTAL GASTOS OPERATIVOS</b>				50
<b>3. MATERIALES Y EQUIPOS DE INVESTIGACIÓN</b>				
Materiales e insumos	Unidad	Valor unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Bolsas impermeables (de plástico blanco)	Paquete	2,75	4	11
Botas de caucho	Par	11,98	4	47,92
Cámara fotográfica digital	Unidad	184	1	184
Alcohol etílico al 70%	Litro	1,5	30	45
Guantes quirúrgicos desechables de nitrilo	100 unidades	9,75	1	9,75

Fundas rojas con logo de riesgo Biológico	100 unidades	15	1	15
Cuerda de Nylon trenzado	Unidad	4,3	2	8,6
Fundas transparentes (Cierre ziploc,17,5 x 20,3 cm)	Paquete de 25 unidad	2,57	7	17,99
Vetbond (adhesivo tisular)	Botella de 3 ml	22,06	4	88,24
Filtros Sterivex-GP 0.22 µm,	15 unidades	144	1	144
Betadine al 1%	Galon	17	1	17
Tubos de ensayo	Unidad	0,8	100	80
Hisopos	paquete 100	6,45	3	19,35
Hiperclorito de sodio al 4%	Litro	3,75	2	7,5
Traje impermeable	Unidad	31,84	3	95,52
Linternas de cabeza Energizer HL5A	Unidad	24,57	3	73,71
Linternas de mano Maglite M2A01H	Unidad	25,5	3	76,5
Mochilas (401 Equipos cotopaxi)	Unidad	50,09	4	200,36
Pinzas pequeñas	Unidad	3,5	4	14
Bandeja plástica blanca	Unidad	5	2	10
Papel aluminio 300 x 40	Rollo	3,5	3	10,5
Mesa de campo	Unidad	40	1	40
Botella estéril para recolección de agua	Unidad	1	12	12
Contenedores térmicos	Unidad	52	2	104
Hielo seco	Unidad	5	2	10
GPS	Unidad	175	1	175
<b>TOTAL MATERIALES Y EQUIPOS</b>				1516,94
<b>4. MATERIALES Y EQUIPO DE LABORATORIO</b>				
Puregene Tissue Kit	Unidad (3 gr) para 100 muestras	312	1	312

<b>TOTAL MATERIALES Y EQUIPOS</b>				312
<b>5. SUMINISTROS DE OFICINA</b>				
Plumas	paquete	1,5	4	6
Papel Bond	paquete	4,99	2	9,98
Sacapuntas	Unidad	0,5	4	2
Libretas	Unidad	0,87	3	2,61
Lápices HD con borrador	paquete	1,34	4	5,36
<b>TOTAL SUMINISTROS DE OFICINA</b>				25,95
<b>TOTAL, DEL PROYECTO</b>				9804,89

## ANEXO 5 Cronograma de actividades de proyecto de investigación.

Cronogramas de actividades de proyecto de investigación																				
Actividad	Octubre				Noviembre				Diciembre				Enero				Febrero			
	1 Sem	2 Sem	3 Sem	4 Sem	1 Sem	2 Sem	3 Sem	4 Sem	1 Sem	2 Sem	3 Sem	4 Sem	1 Sem	2 Sem	3 Sem	4 Sem	1 Sem	2 Sem	3 Sem	4 Sem
Elaboracion del proyecto de investigacion	█	█																		
Busqueda y analisis de Bibliografia		█	█	█	█	█														
Elaboracion e escritura de Introduccion				█	█	█														
Primera revision del Proyecto							█													
Correccion del Borrador del Proyecto							█													
Revision Bibliografica para escritura de Capitulo 1 "Informacion General"									█	█	█	█								
Escritura del Capitulo 1 "Informacion General"									█	█	█	█								
Segunda revision del Proyecto con la ayuda del Tutor									█	█										
Revision Bibliografica para escritura de Capitulo 2 "Materiales y Metodologia"													█							
Escritura del Capitulo 2 "Materiales y Metodologia"													█	█	█					
Revision del Capitulo 2 "Materiales y Metodologia"													█	█	█					
Correcciones de Capitulo 2 "Materiales y Metodologia"													█	█	█					
Escritura de Capitulo 3 "Resultados esperados, Conclusiones y Recomendaciones"																	█	█	█	
Entrega de Pre-informe de Proyecto																			█	
Presentacion de Proyecto ante jurado																			█	
Presentacion de Proyecto feria Idear																			█	
Viaje a Reserva Privada Mashpi para trabajo de campo (temporada lluviosa)																				
Analisis de muestras en laboratorio																				
Analisis estadistico de los resultados																				
Viaje a Reserva Privada Mashpi para trabajo de campo (temporada seca)																				
Analisis de muestras en laboratorio																				
Analisis estadistico de los resultados																				
Viaje a Reserva Privada Mashpi para trabajo de campo (temporada lluviosa)																				
Analisis de muestras en laboratorio																				
Analisis estadistico de los resultados																				
Viaje a Reserva Privada Mashpi para trabajo de campo (temporada seca)																				
Analisis de muestras en laboratorio																				
Analisis estadistico de los resultados																				
Analisis y conclusiones de Resultados finales																				
Escritura de reporte final																				
Manual de control del Hongo Batrachochytrium dendrobatidis dentro de la reserva privada Mashpi Pinchincha Ecuador.																				