



**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA  
INDOAMÉRICA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MEDIO AMBIENTE**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIODIVERSIDAD Y RECURSOS  
GENÉTICOS**

**TEMA:**

---

**VULNERABILIDAD DE LA RANA MARSUPIAL DE QUITO (*GASTROTHECA  
RIOBAMBAE*) A AGENTES PATÓGENOS EN UN ESCENARIO DE CAMBIO  
CLIMÁTICO**

---

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera en Biodiversidad y Recursos Genéticos

**Autor(a)**

Morales Espín Camila Belén

**Tutor(a)**

PhD. Páez Vacas Mónica Isabel

QUITO – ECUADOR

2020

**AUTORIZACIÓN POR PARTE DEL AUTOR PARA LA CONSULTA,  
REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL, Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA  
DEL TRABAJO DE TÍTULACIÓN**

Yo, Camila Belén Morales Espín, declaro ser autora del Trabajo de Investigación con el nombre “Vulnerabilidad de la rana marsupial de Quito (*Gastrotheca riobambae*) a agentes patógenos en un escenario de cambio climático”, como requisito para optar al grado de Ingeniera en Biodiversidad y Recursos Genéticos y autorizo al Sistema de Bibliotecas de la Universidad Tecnológica Indoamérica, para que con fines netamente académicos divulgue esta obra a través del Repositorio Digital Institucional (RDI-UTI).

Los usuarios del RDI-UTI podrán consultar el contenido de este trabajo en las redes de información del país y del exterior, con las cuales la Universidad tenga convenios. La Universidad Tecnológica Indoamérica no se hace responsable por el plagio o copia del contenido parcial o total de este trabajo.

Del mismo modo, acepto que los Derechos de Autor, Morales y Patrimoniales, sobre esta obra, serán compartidos entre mi persona y la Universidad Tecnológica Indoamérica, y que no tramitaré la publicación de esta obra en ningún otro medio, sin autorización expresa de la misma. En caso de que exista el potencial de generación de beneficios económicos o patentes, producto de este trabajo, acepto que se deberán firmar convenios específicos adicionales, donde se acuerden los términos de adjudicación de dichos beneficios.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Quito, a los 7 días del mes de septiembre de 2020, firmo conforme:

Autor: Belén Morales

Firma:



Número de Cédula: 1720134087

Correo electrónico: belenmoralesespín@gmail.com

Teléfono: 0987529628

## APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Titulación “VULNERABILIDAD DE LA RANA MARSUPIAL DE QUITO (*Gastrotheca riobambae*) A AGENTES PATÓGENOS EN UN ESCENARIO DE CAMBIO CLIMÁTICO” presentado por Camila Belén Morales Espín, para optar por el Título de Ingeniera en Biodiversidad y Recursos Genéticos,

### CERTIFICO

Que dicho trabajo de investigación ha sido revisado en todas sus partes y considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del Tribunal Examinador que se designe.

Quito, 7 de septiembre de 2020



.....

Mónica Isabel Páez Vacas, PhD.

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Quien suscribe, declaro que los contenidos y los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, como requerimiento previo para la obtención del Título de Ingeniera en Biodiversidad y Recursos Genéticos, son absolutamente originales, auténticos y personales y de exclusiva responsabilidad legal y académica del autor.

Quito, 7 de septiembre de 2020



.....

Camila Belén Morales Espín  
CI: 1720134087

## APROBACIÓN TRIBUNAL

El trabajo de Titulación ha sido revisado, aprobado y autorizada su impresión y empastado, sobre el Tema: VULNERABILIDAD DE LA RANA MARSUPIAL DE QUITO (*Gastrotheca riobambae*) A AGENTES PATÓGENOS EN UN ESCENARIO DE CAMBIO CLIMÁTICO, previo a la obtención del Título de Ingeniera en Biodiversidad y Recursos Genéticos, reúne los requisitos de fondo y forma para que el estudiante pueda presentarse a la sustentación del trabajo de titulación.

Quito, 19 de octubre de 2020



.....  
Dr. Christian David Salazar Valenzuela  
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



.....  
Dr. Juan Manuel Guayasamin Ernest  
VOCAL



.....  
Dra. María José Endara Burbano  
VOCAL

**DEDICATORIA**

*Para Patricio, Loira y Samuel*

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo es la culminación de una aventura que no tenía planeada iniciar. Han sido cinco años de aprender y construir, no solamente a nivel académico, sino también personal. Mi etapa universitaria ha superado todas las expectativas que alguna vez pude tener sobre ella gracias a las personas que he conocido sobre el camino. No podría incluir a todos aquí, pero espero haber demostrado en estos años mi eterno agradecimiento con cada ser que me ha brindado apoyo.

Gracias al Ser que se encuentra en los tonos rojizos de los atardeceres a la orilla del mar, en la majestuosidad de los Ceibos amazónicos, en las pacíficas tortugas marinas, en las aguas cristalinas de Caimito, en los imponentes volcanes y nevados que rodean a Quito y en las peculiares manchas de los osos de anteojos.

Gracias a mis padres, Patricio y Loira, quienes me han acompañado en los altos y bajos de este camino. Estoy infinitamente agradecida con ustedes por criarme sabiendo que puedo ser y hacer lo que sea. Papá, gracias por arrastrarme hasta la universidad aquel día; sin tu determinación, ¡nada de esto hubiera sucedido! Tu confianza en mis capacidades me ha llevado lejos. Mamá, gracias por convertirme en la mujer dedicada, detallista y ordenada que soy hoy. Tu fe y fuerza de voluntad han sido una fuente de inspiración inagotable.

Gracias a Samuel. No tengo duda que sin tus abrazos apretados y tus "te quiero, ñaña" el trayecto hubiera sido más gris. Escuchar que quieres seguir mis pasos, aunque sea mayormente por las salidas de campo, ha sido el combustible para seguir.

A Jordi, mi compañero de viaje. Cuando era necesario (y cuando no), me recordaste que debía creer en mí y en todo lo que puedo lograr. Tu paciencia en las

incontables llamadas para contarte las cosas que faltaban o los problemas que se presentaban en el desarrollo de esta tesis me sirvieron para encontrar una solución o ver la situación con otra perspectiva. Gracias infinitas por tu amor, abrazos y detalles.

A mi mentora, Mónica Páez. Nunca podré agradecerle lo suficiente por haberme acogido bajo su ala desde el primer momento. Su guía, paciencia y dedicación a lo largo de la carrera han sido un pilar fundamental en mi formación como científica. Ha convertido mi inicio en la academia en una experiencia agradable y emocionante. Gracias, gracias, gracias.

A Enmily, por compartir conmigo este trayecto y hacerlo divertido. A mis compañeros Flor, Erick y Kevin, por ser las risas, apoyo, oídos y cariño. Nos tomó nuestro tiempo, pero logramos formar lazos que nos acompañarán toda la vida. ¡Salud por ello!

A todos mis profesores: Nora, Ibon, Mónica, David, Laurita, Anita, María José y Zayda, por compartir su conocimiento sin medida y enseñarme cómo debe ser un profesional con gran calidad académica y humana. Gracias por convertir nuestra facultad en una cálida comunidad de apoyo.

A Juan Manuel Guayasamin, quién me presentó el mundo de la herpetología y me apoyó tanto durante mi primer año de carrera. La confianza que depositó en mí fue esencial para construir la base de todo lo que vino después.

Por último, pero no menos importante, gracias a mi tía Anita Espín. Contar contigo incondicionalmente durante toda mi vida ha sido un regalo invaluable. Gracias por creer en mí y enseñarme a seguir adelante a pesar de todo.

Gracias a todos por aportar su granito de arena. Los llevaré en mi corazón siempre.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

PORTADA .....	i
AUTORIZACIÓN DEL AUTOR .....	ii
APROBACIÓN DEL TUTOR .....	iii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD .....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL .....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
RESUMEN .....	xi
ABSTRACT .....	xii
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Quítrido: ciclo de vida, origen y diversidad</i> .....	2
1.2. <i>Cambio climático y quítrido</i> .....	6
1.3. <i>Objetivo general</i> .....	11
1.4. <i>Objetivos específicos, hipótesis y predicciones</i> .....	11
<b>2. MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
2.1. <i>Descripción de la especie</i> .....	13
2.2. <i>Declaración de ética</i> .....	17
2.3. <i>Aislamiento del hongo quítrido</i> .....	17
2.4. <i>Experimentos</i> .....	18
2.5. <i>Análisis moleculares</i> .....	22
2.6. <i>Análisis estadísticos</i> .....	23
<b>3. RESULTADOS ESPERADOS .....</b>	<b>24</b>
<b>4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>26</b>
<b>5. CRONOGRAMA.....</b>	<b>29</b>
<b>6. PRESUPUESTO .....</b>	<b>34</b>
<b>7. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>35</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>48</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Ilustración del ciclo de vida del hongo quítrido.....	3
<b>Fig. 2.</b> Mapa de distribución potencial de <i>Gastrotheca riobambae</i> .....	15
<b>Fig. 3.</b> <i>Gastrotheca riobambae</i> .....	16
<b>Fig. 4.</b> Protocolo de aislamiento del hongo quítrido ( <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> ) .....	18
<b>Fig. 5.</b> Representación visual del montaje del experimento.....	21

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA INDOAMÉRICA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MEDIO AMBIENTE**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIODIVERSIDAD Y RECURSOS  
GENÉTICOS**

**TEMA: VULNERABILIDAD DE LA RANA MARSUPIAL DE QUITO  
(*GASTROTHECA RIOBAMBAE*) A AGENTES PATÓGENOS EN UN  
ESCENARIO DE CAMBIO CLIMÁTICO**

**AUTOR:** Camila Belén Morales Espín

**TUTOR:** Mónica Isabel Páez Vacas, PhD.

### **RESUMEN EJECUTIVO**

El hongo quítrido (*Batrachochytrium dendrobatidis*), patógeno que causa la enfermedad llamada quitridomicosis, ha sido partícipe de la declinación de, por lo menos, alrededor de 500 especies de anfibios alrededor del mundo. El quítrido actúa en conjunto con otros factores que provocan la pérdida de diversidad como la destrucción de hábitat, contaminación, especies invasoras y el cambio climático. Se conoce que el cambio de temperatura, como consecuencia del cambio climático, fuera del rango óptimo del hospedero tiene un efecto importante en el sistema anfibio-quítrido. Sin embargo, aún es necesario entender a una escala más fina cuál es la dinámica y las posibles consecuencias de la interacción entre la temperatura y la infección del quítrido. Esta propuesta de investigación busca determinar la vulnerabilidad de la rana marsupial de Quito (*Gastrotheca riobambae*), una especie bifásica endémica de Ecuador, ante la sinergia de un aumento de temperatura y la exposición al quítrido. Para ello, se realizarán experimentos donde los individuos estarán expuestos al quítrido a diferentes temperaturas para medir su supervivencia, prevalencia del quítrido y carga de infección. Se espera que, a través de este estudio, se logre 1) aislar la cepa de *B. dendrobatidis* de muestras de piel de *G. riobambae* infectadas, 2) conocer a detalle el desarrollo de la quitridomicosis en *G. riobambae* y 3) determinar los posibles efectos de la combinación de un aumento de temperatura y la infección del quítrido en las ranas marsupiales de Quito. Realizar este tipo de bioensayos ayuda a sentar una línea base para futuros planes de conservación para *G. riobambae* y especies relacionadas.

**Descriptor:** anfibios, quítrido, cambio climático, bioensayo, susceptibilidad.

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA INDOAMÉRICA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MEDIO AMBIENTE**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIODIVERSIDAD Y RECURSOS  
GENÉTICOS**

**THEME: VULNERABILITY OF RIOBAMBA MARSUPIAL FROG  
(*GASTROTHECA RIOBAMBAE*) TO PATHOGENIC AGENTS IN A CLIMATE  
CHANGE SCENARIO**

**AUTHOR:** Camila Belén Morales Espín

**TUTOR:** Mónica Isabel Páez Vacas, PhD.

**ABSTRACT**

The chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*), a pathogen that causes the chytridiomycosis disease, has been involved in the decline of, at least, approximately 500 species of amphibians worldwide. The chytrid acts in concert with other factors that cause the loss of diversity such as habitat destruction, pollution, invasive species, and climate change. Temperature change, caused by climate change, outside the optimum of the host is known to have an important effect on the chytrid-amphibian system. However, it is still necessary to understand on a finer scale what are the dynamics and the possible consequences of the interaction between temperature and chytrid infection. This research proposal seeks to determine the vulnerability of the Quito marsupial frog or Riobamba marsupial frog (*Gastrotheca riobambae*), a biphasic species endemic of Ecuador, in the face of the synergy between the exposure to chytrid and increased temperature. To accomplish this, experiments will be carried out where individuals will be exposed to the chytrid at different temperatures in order to measure their survival, chytrid prevalence and infection load. It is expected that through this study it will be possible to 1) isolate *B. dendrobatidis* strain from infected *G. riobambae* skin samples, 2) know in detail the development of chytridiomycosis in *G. riobambae* and 3) determine the possible effects of the combination of an increased temperature and chytrid infection in the Quito marsupial frogs. Carrying out this type of bioassay helps to establish conservation plans for *G. riobambae* and related species.

**Keywords:** amphibians, chytrid, climate change, bioassay, susceptibility.

*Cierra los ojos, aguza los oídos y, desde el sonido más leve hasta el más violento ruido, desde el tono más sencillo hasta la más elevada armonía, desde el grito más violento y apasionado hasta la más dulce palabra de razón, es la Naturaleza la que habla, la que revela su existencia, su fuerza, su vida y sus relaciones, hasta el punto de que un ciego al que se le niega el mundo infinitamente visible puede capturar la infinita vitalidad a través de lo que oye.*

JOHANN WOLFGANG VON GOETHE

## 1. INTRODUCCIÓN

Alrededor del mundo, la biodiversidad está siendo amenazada simultáneamente a nivel biológico, ecológico y ambiental. Las actividades humanas tienen tal efecto sinérgico sobre la abundancia y diversidad de especies, que podríamos hablar de una sexta extinción masiva (Wake y Vredenburg, 2008). El cambio de uso de tierra, la destrucción del hábitat, la propagación de patógenos y el cambio climático se han convertido en el motor de las declinaciones poblacionales de varios taxa (Grooten y Almond, 2018; Pounds et al., 2006). Uno de los casos más alarmantes sobre esta situación es la disminución de varias poblaciones de anfibios -tanto anuros como salamandras- en todo el mundo, reportada desde finales de la década de los ochenta (e.g. Collins, 2010; Stuart et al., 2004).

Las declinaciones enigmáticas de anfibios alarmaron a la comunidad científica, pues la pérdida simultánea de este importante grupo ecológico alrededor del planeta afectaría significativamente a la dinámica de la cadena alimenticia de los lugares donde ocurren (Blaustein y Wake, 1990). Entre la incertidumbre de los años ochenta, se apuntaba a que este fenómeno estaba causado por factores como destrucción del hábitat, introducción de depredadores no naturales (Hayes y Jennings, 1986; Moyle, 1973) contaminación por pesticidas (Kirk, 1988), lluvia ácida (Barinaga, 1990; Harte y Hoffman, 1989) y hasta al consumo de ranas (Blaustein y Wake, 1990). No obstante, las poblaciones de anuros mermaban también en áreas donde aparentemente no había influencia de actividades humanas (Barinaga, 1990; Blaustein y Wake, 1990). Posteriormente, se descubrió que un patógeno fúngico era probablemente uno de los responsables, junto con los mencionados anteriormente, de dichas declinaciones: el hongo quítrido, *Batrachochytrium dendrobatidis* (Berger et al., 1998).

### 1.1. *Quítrido: ciclo de vida, origen y diversidad*

El hongo quítrido es un patógeno que afecta casi exclusivamente a los anuros y causa la quitridomicosis, una enfermedad cutánea que puede ser letal y llevar a la extinción de especies en muchos géneros (Berger et al., 1999; Longcore et al., 1999; Scheele et al., 2019). La asociación entre el patógeno y la enfermedad se realizó en 1998 y, al año siguiente, se describió como especie nueva con muestras de piel de ranas sudamericanas (Berger et al., 1998; Longcore et al., 1999). Los estudios subsecuentes se centraron en comprender el origen y la ecología del hongo, así como su ciclo de vida (Berger et al., 2005) y temperaturas de desarrollo (Johnson et al., 2003). En condiciones de laboratorio, la temperatura óptima de crecimiento de *Batrachochytrium dendrobatidis* está entre los 17 y 25 °C, pero alcanza su pico de crecimiento e infección a los 23 °C. El hongo detiene su crecimiento a los 28 °C y muere a los 30 °C (Piotrowski et al., 2004; Woodhams et al., 2008).

En cuanto al ciclo de vida de *B. dendrobatidis*, este es un hongo acuático con etapas de vida distintivas. Mientras está en el agua, se encuentra en la etapa móvil de su ciclo, ya que posee un flagelo que le permite nadar y colonizar la piel de las ranas, se encuentre estas en su etapa larvaria o adulta. Una vez se ha adentrado en las células epidérmicas del individuo, se forma un talo esférico que madura y se divide asexualmente para producir zoosporas nuevas. Dichas esporas se liberan a la superficie de la piel, lo que les permite salir del huésped al exterior (Fig. 1; Rosenblum et al., 2010). Aunque los efectos que causa en los anuros varían dependiendo del estadio, el hongo ataca principalmente a las células de queratina presentes en la boca de los renacuajos y en la piel de los adultos. Durante la etapa larvaria de las ranas, el hongo quítrido provoca la pérdida de las secciones queratinizadas de las piezas bucales

afectando potencialmente a su desempeño y alimentación (Kilpatrick et al., 2010). La infección de *B. dendrobatidis* en los adultos provoca la proliferación de las células queratináceas y la fusión de las capas de queratina, desembocando en un engrosamiento de las capas impermeables de la piel (Berger et al., 1998). Este efecto podría perturbar la osmorregulación y/o el equilibrio iónico a través de la piel de las ranas, lo que podría ser letal considerando que este órgano es el encargado de la respiración y defensa (Voyles et al., 2007).



**Fig. 1.** Ilustración del ciclo de vida del hongo quítrido, ejemplificado con una rana del género *Atelopus*. Aunque no está representado en la ilustración, las esporas acuáticas del hongo infectan también a los anuros mientras estos son renacuajos. Traducido por la autora. Fotografías del ciclo de vida de *Batrachochytrium dendrobatidis*: Rosenblum et al. (2010). Ilustración: Brian Gratwicke (2014).



El origen de *B. dendrobatidis* ha sido objeto de investigación para determinar cómo se diseminó al resto del planeta. Hasta el momento, se han sugerido a África (Weldon et al., 2004), América del Norte (Talley et al., 2015) y del Sur (Rodríguez et al., 2014), Japón (Goka et al., 2009) y el este de Asia (Bataille et al., 2013) como posibles puntos de origen del hongo. Sin embargo, se ha encontrado que Asia, específicamente la cepa del quítrido del este de Asia, podría ser la fuente original de la que se derivaron todas las otras encontradas alrededor del mundo (Byrne et al., 2019; O’Hanlon et al., 2018). Antes de este reciente descubrimiento, era ampliamente aceptado que África era la cuna de *B. dendrobatidis* y que el comercio de la rana de uñas africana (*Xenopus leavis*), usada como prueba de embarazo en la década de 1930, fue el medio de dispersión del quítrido hacia el resto del mundo (Weldon et al., 2004). Ahora, se ha propuesto que la aparición del hongo como patógeno se remonta a principios del siglo XX, lo que coincide con la expansión del comercio global de anfibios (O’Hanlon et al., 2018). La alta virulencia y patogenicidad de *B. dendrobatidis* registrada actualmente pueden ser producto de la introducción de especies exóticas, ya que estas acarrean patógenos con los que han coevolucionado y para los que han desarrollado defensas a los lugares donde han sido introducidas. Las especies nativas se ven expuestas a estos nuevos patógenos, para los cuales no tienen defensas, por lo que los efectos que estos desencadenen podrían ser letales (Fisher y Garner, 2007; Weldon et al., 2004).

Existen cinco linajes principales reportados para *B. dendrobatidis*, de acuerdo con estudios basados en la filogenia del genoma completo del hongo (Byrne et al., 2019; O’Hanlon et al., 2018). El linaje que está globalmente distribuido y es responsable de la mayoría de las muertes de poblaciones de anuros lleva el nombre de *BdGPL*, donde las siglas corresponden a “global panzootic lineage” (linaje panzoótico global) (Farrer et al., 2011). El linaje *BdCAPE* fue llamado así por ser descrita a partir de muestras colectadas en la Provincia del Cabo,

Sudáfrica. Ahora, *BdCAPE* se ha registrado también en Camerún, Mallorca, Reino Unido (Farrer et al., 2011; O’Hanlon et al., 2018), Holanda y Honduras (Byrne et al., 2019). El tercer linaje es *BdASIA1*, descrito con aislados obtenidos en Corea del Sur e incluye al anterior linaje *BdCH* encontrado en Suiza (Farrer et al., 2011). En cuanto al cuarto linaje, *BdBrazil/ASIA2*, fue nombrado primero como *BdBrazil* porque las muestras se obtuvieron del Bosque Atlántico de Brasil (Schloegel et al., 2012). Sin embargo, se renombró como *BdBrazil/ASIA2* para adjuntar al linaje *BdKorea*, que mostró estar estrechamente relacionado con *BdBrasil* a través de evidencia de secuenciación de todo el genoma (Farrer et al., 2011). Por último, el quinto linaje, *BdASIA3*, recientemente descrito por Byrne et al. (2019), está ampliamente distribuido en Filipinas, Indonesia y algunas partes de China.

A pesar de que se han documentado estos cinco linajes del hongo quítrido, todavía queda mucho por investigar respecto a su diversidad e historia evolutiva. Se advierte que las poblaciones de anfibios aisladas y poco estudiadas alrededor del mundo probablemente alberguen diversidad de *Bd* indocumentada (Byrne et al., 2019). Este podría ser el caso de Ecuador, donde se sabe muy poco de la diversidad del quítrido presente en las poblaciones afectadas. El primer reporte para Ecuador y Sudamérica fue realizado por Ron y Merino-Viteri (2000), donde ya se indica la poca atención que ha recibido el quítrido y su efecto en las poblaciones de anfibios en el país. Si bien en Ecuador se siguen reportando nuevos registros de *B. dendrobatidis* para poblaciones de diversas especies, pocos estudios se han hecho sobre la diversidad y filogenia del hongo. Vizcaíno Alonso et al. (2013) encontraron 11 haplotipos de *Bd* en muestras provenientes de varias provincias del país. Mientras que seis de estos haplotipos fueron únicos para Ecuador, el resto de ellos eran compartidos con países como Estados Unidos, China, Japón, Belice y Sudáfrica (Vizcaíno Alonso et al., 2013). Dada la diversidad de haplotipos hallada en las muestras, al parecer ocurrieron varios eventos de

introducción del hongo a Ecuador. Por otra parte, el estudio de Byrne et al. (2019) situó a las siete muestras *swab* (métodos no invasivos de colección a través de frotis) positivas para quítrido, tomadas de especímenes de museos de Ecuador, dentro del linaje *BdGPL*. Sin duda, la información provista por los estudios mencionados arroja un poco de luz sobre la diversidad del quítrido en Ecuador. No obstante, aún es necesario realizar investigaciones más profundas y con más muestras para determinar si las cepas que se encuentran en el país pertenecen solamente al linaje *BdGPL*, a otro de los cuatro linajes restantes o a uno completamente nuevo.

### *1.2. Cambio climático y quítrido*

El cambio climático ha provocado que sistemas como los Andes tropicales, que conforman uno de los *hotspots* de biodiversidad del mundo, atraviesen cambios drásticos a nivel biótico y abiótico (Myers et al., 2000). En el mejor de los casos, el aumento de temperatura podría inducir desplazamientos de distribución de especies montanas hacia las cumbres de los Andes tropicales, en busca de sus condiciones óptimas (Ron et al., 2011). En el peor escenario, las especies se extinguen, ya sea porque no pueden desplazarse hacia lugares más apropiados, porque estos no existen o porque los efectos del cambio son muy drásticos. Por lo tanto, las especies de altitud están expuestas a nuevos competidores, patógenos, rangos de distribución más restringidos y estrés (Larsen et al., 2012).

La pérdida de biodiversidad causada por el hongo quítrido comprende una de las mayores registradas en el mundo. Se estima que este patógeno invasivo ha participado en la declinación de 501 especies de anfibios en todo el mundo (Scheele et al., 2019). Se ha visto que las especies de zonas de gran altitud, con rangos de distribución restringidos y tamaños

corporales grandes son más propensas a contraer quitridomicosis (Bielby et al., 2008; Hof et al., 2011; Scheele et al., 2019). Aunque para algunas especies de anuros *Batrachochytrium dendrobatidis* es la causa principal de su declinación, en muchas otras especies se ha demostrado que actúa en conjunto con la pérdida de hábitat y cambio climático (Sodhi et al., 2008; Wake y Vredenburg, 2008).

Puesto que el cambio climático ha provocado fluctuaciones impredecibles en el clima, los anfibios pueden estar sometidos a varias presiones a la vez (e.g. destrucción del hábitat, especies introducidas, cambios drásticos de temperatura), comprometiendo su sistema inmunológico. Los anfibios adaptados a temperaturas cálidas podrían ser más susceptibles a contraer la quitridomicosis cuando se encuentran bajo condiciones inusualmente frías, mientras que los anfibios adaptados a condiciones frías serán más susceptibles a infectarse con el quítrido bajo temperaturas inusualmente cálidas (Cohen et al., 2017; Cohen et al., 2018). Este fenómeno indica que los anfibios son más vulnerables ante el quítrido cuando existen desajustes térmicos (cambios drásticos en la temperatura ambiente que difiere en la temperatura óptima del hospedero) en las condiciones climáticas de sus hábitats o, dicho de otro modo, están fuera de su temperatura óptima y/o rango de tolerancia térmica (Cohen et al., 2019; Nowakowski et al., 2016). Además, el contexto ambiental y la tolerancia del hospedero a la modificación del hábitat son variables importantes al definir la magnitud del efecto del desajuste térmico (Nowakowski et al., 2016). El conjunto de todas las consecuencias derivadas del desajuste térmico, como producto del cambio climático, pudieron haber contribuido a las disminuciones poblacionales de anfibios en todo el mundo (Cohen et al., 2019).

En Ecuador, las anomalías climáticas registradas en las décadas de los años 80 y 90 coinciden con las declinaciones más drásticas de anuros (Merino-Viteri 2011; Ron et al., 2003). Se ha reportado un aumento del límite superior de la distribución altitudinal de varias especies (Bustamante et al., 2005). Además, se ha encontrado que las zonas más secas o con una precipitación cercana y/o menor a la esperada respecto a la altitud a la que se encuentran son las que más contienen especies dentro de la categoría En Peligro Crítico de la IUCN. Al parecer, dichas zonas también poseen condiciones climáticas que favorecerían a la quitridiomycosis (Menéndez-Guerrero y Graham, 2013). El hongo quitrido ha estado presente en la mayoría de ranas andinas desde 1970 (Guayasamin et al., 2014; Manzano Pasquel, 2014; Ron et al., 2011). Con respecto al futuro, a través del uso de modelamiento de nichos ambientales, se predice que el quitrido estará distribuido principalmente en los Andes (Menéndez-Guerrero y Graham, 2013). Sin embargo, *Batrachochytrium dendrobatidis* ha causado un efecto diferenciado entre los géneros de ranas. Existen géneros que han sido muy afectados por el quitrido, como es el caso de *Atelopus*, *Telmatobius* e *Hyloxalus* (La Marca et al., 2005; Merino-Viteri et al., 2005; Ron et al., 2011). En cambio, hay otros grupos que no se han visto tan afectados, como las ranas marsupiales del género *Gastrotheca* (Anura: Hemiphractidae), donde existen casos de especies que han sufrido declinaciones y otras especies que no lo han hecho (Carvajal-Endara et al., 2019).

En el género *Atelopus*, se estima que el 58% de las especies han presentado declinaciones poblacionales y se cree que muchas de ellas podrían estar extintas (La Marca et al., 2005). Sin embargo, hay algunos casos en los que se ha descubierto remanentes poblacionales, como el del sapo Jambato (*Atelopus ignescens*; Coloma, 2016). Para *Telmatobius*, ninguna de las tres especies (*T. cirrhacelis*, *T. niger* y *T. vellardi*) que se encontraban en el país han sido reportadas desde 1994, ya que han sufrido declinaciones tan

drásticas, que pudieron desembocar en su extinción (Merino-Viteri et al., 2005). Según el estudio de Menéndez-Guerrero y Graham (2013), los registros de especies de los dos géneros mencionados anteriormente coincidieron más con la distribución del quítrido (*Atelopus* en un 77% y *Telmatobius* en un 91%) en Ecuador en comparación con el género *Pristimantis* (50%). En *Hyloxalus*, no se han encontrado poblaciones de varias especies en su rango de distribución histórico (Ron et al., 2011).

En cuanto al género *Gastrotheca*, este corresponde a las ranas marsupiales, con 20 especies en Ecuador, siendo nueve de ellas endémicas (Duellman y Hills, 1987; Ron et al., 2019). El 75% de las especies está en una categoría de amenaza de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés; IUCN, 2019). Once de las especies tienen ciclos de vida monofásicos o de desarrollo directo. Es decir, no tienen etapa larvaria, las hembras expulsan ranas completamente formadas de su marsupio. En contraste, las nueve especies restantes son bifásicas, cumpliendo con el ciclo de vida ampliamente conocido para anuros (Carvajal-Endara et al., 2019). Las ranas marsupiales han estado vinculadas al hongo quítrido por lo menos desde 1974 (Manzano Pasquel, 2014). Aunque en las zonas altoandinas han existido eventos que han provocado la desaparición de otras especies de anuros que viven en simpatria con ranas marsupiales bifásicas de altitud, estas últimas no se han visto mayormente afectadas por ellos. En cuanto a las especies monofásicas, no se han registrado avistamientos para la mayoría de ellas desde finales de los años 80 (Carvajal-Endara et al., 2019).

Contrario al contexto nacional, en Perú la susceptibilidad de las especies de *Gastrotheca* no varía según el mecanismo reproductivo (monofásica y bifásica), sino que puede

cambiar entre especies cercanamente relacionadas. Catenazzi et al. (2017) reportaron que la especie monofásica *Gastrotheca excubitor* fue mucho menos susceptible al hongo quítrido que *Gastrotheca nebulanastes*, estrechamente relacionada, en los experimentos de susceptibilidad ante *Bd*. Dicha diferencia residía en las bacterias cutáneas presentes en la piel de ambas especies, donde la microbiota de *G. excubitor* tuvo mayor capacidad para inhibir el crecimiento del quítrido en comparación con *G. nebulanastes* (Burkart et al., 2017). Conocer por qué se da esta diferencia entre las especies bifásicas y monofásicas presentes en Ecuador podría ser una herramienta clave para entender el sistema anfibio-quítrido a una escala más fina y tomar medidas de conservación adecuadas para las distintas especies.

En Quito, capital de Ecuador, se ha reportado la presencia de *B. dendrobatidis* en adultos y renacuajos de la población de *Gastrotheca riobambae* presente en el Parque Metropolitano Guanguiltagua (Manzano, 2010). El nivel de infección de los renacuajos de esta población tiene una relación directamente proporcional con la temperatura del agua (Manzano, 2010). Además, también se encontró quítrido en las muestras tomadas de las poblaciones de *G. riobambae* del volcán Pasochoa, ubicado en los alrededores de Quito (Ramírez y Rodríguez, 2011). Actualmente, *B. dendrobatidis* no parece ser una de las principales amenazas para *G. riobambae* (Ramírez y Rodríguez, 2011). Sin embargo, es incierta la vulnerabilidad que pueden tener las ranas marsupiales adultas ante una combinación entre un aumento de temperatura y la quitridomicosis. Por lo tanto, existen varias brechas de conocimiento sobre los efectos que causaría en las especies de *Gastrotheca* el aumento de temperatura, como consecuencia del cambio climático, y el hongo quítrido. Estas dos presiones son determinantes en la disminución de las poblaciones de anfibios (Garner et al., 2010; Menéndez-Guerrero y Graham, 2013), por lo que entender su interacción es importante para prever la susceptibilidad de las especies restringidas a rangos de temperatura y distribución estrechos (Scheele et al., 2019).

### 1.3. Objetivo general:

El objetivo de este proyecto es determinar la susceptibilidad de las ranas marsupiales de Quito (*Gastrotheca riobambae*) al hongo quítrido, *Batrachochytrium dendrobatidis*, a diferentes temperaturas. La información que se generará en este estudio ayudaría a establecer una base para tomar medidas de conservación conforme a la severidad de los efectos resultantes de la interacción entre ambos factores.

### 1.4. Objetivos específicos, hipótesis y predicciones:

- I. Establecer la sintomatología de la quitridomicosis y la supervivencia de los individuos de *Gastrotheca riobambae* expuestas a *Batrachochytrium dendrobatidis* bajo diferentes condiciones de temperatura.

H<sub>0</sub>: No habrá diferencia en la susceptibilidad de las *Gastrotheca riobambae* expuestas a *Bd* a diferentes temperaturas.

H<sub>a</sub>: Habrá diferencia en la susceptibilidad de las *Gastrotheca riobambae* expuestas a *Bd* a diferentes temperaturas.

Predicción: Los individuos de *G. riobambae* expuestos a *Bd* y una temperatura mayor (sobre el promedio al que están expuestas las ranas) presentarán más síntomas y/o una tasa de mortalidad más alta, debido al efecto sinérgico entre el aumento de temperatura y la exposición al hongo.

- II. Examinar si hay diferencias en la carga de infección de *Gastrotheca riobambae* de acuerdo con los tratamientos donde serán sometidas a distintas temperaturas.



H<sub>0</sub>: El aumento de temperatura no está asociado con el aumento de la carga de infección de *Batrachochytrium dendrobatidis* en los individuos *Gastrotheca riobambae*.

H<sub>a</sub>: El aumento de temperatura está asociado con el aumento de la carga de infección de *Batrachochytrium dendrobatidis* en los individuos *Gastrotheca riobambae*.

Predicción: Los individuos expuestos a *Bd* y a una temperatura mayor serán quienes presenten mayor carga de infección de *B. dendrobatidis*.

## 2. MÉTODOS

### 2.1. Descripción de la especie

*Gastrotheca riobambae* (Fowler, 1913) es una especie bifásica endémica de Ecuador. Está distribuida entre los 1800 a 3220 metros sobre el nivel del mar, en valles y bosques interandinos del norte y centro del país. Ocurre en una gran variedad de hábitats, incluyendo bosques conservados y plantaciones. Su distribución se solapa con áreas protegidas como las Reservas Ecológicas Los Ilinizas y Cotacachi-Cayapas y el Parque Nacional Cotopaxi (Fig. 2) (Chasiluisa et al., 2020). La coloración de *G. riobambae* varía entre marrón y verde, con o sin presencia de manchas o rayas verdes o cafés y el vientre gris o crema con o sin manchas marrones (Fig. 3a y 3b) (Chasiluisa et al., 2020). Son de tamaño mediano-grande, los machos miden (longitud rostro cloacal, LRC) un promedio de 43 mm y las hembras de 48,6 mm (Duellman y Trueb, 2015). Las hembras transportan a los huevos fecundados en el marsupio hasta que son liberados como renacuajos en aguas empozadas o casi quietas (Fig. 3f) (Del Pino, 1975).

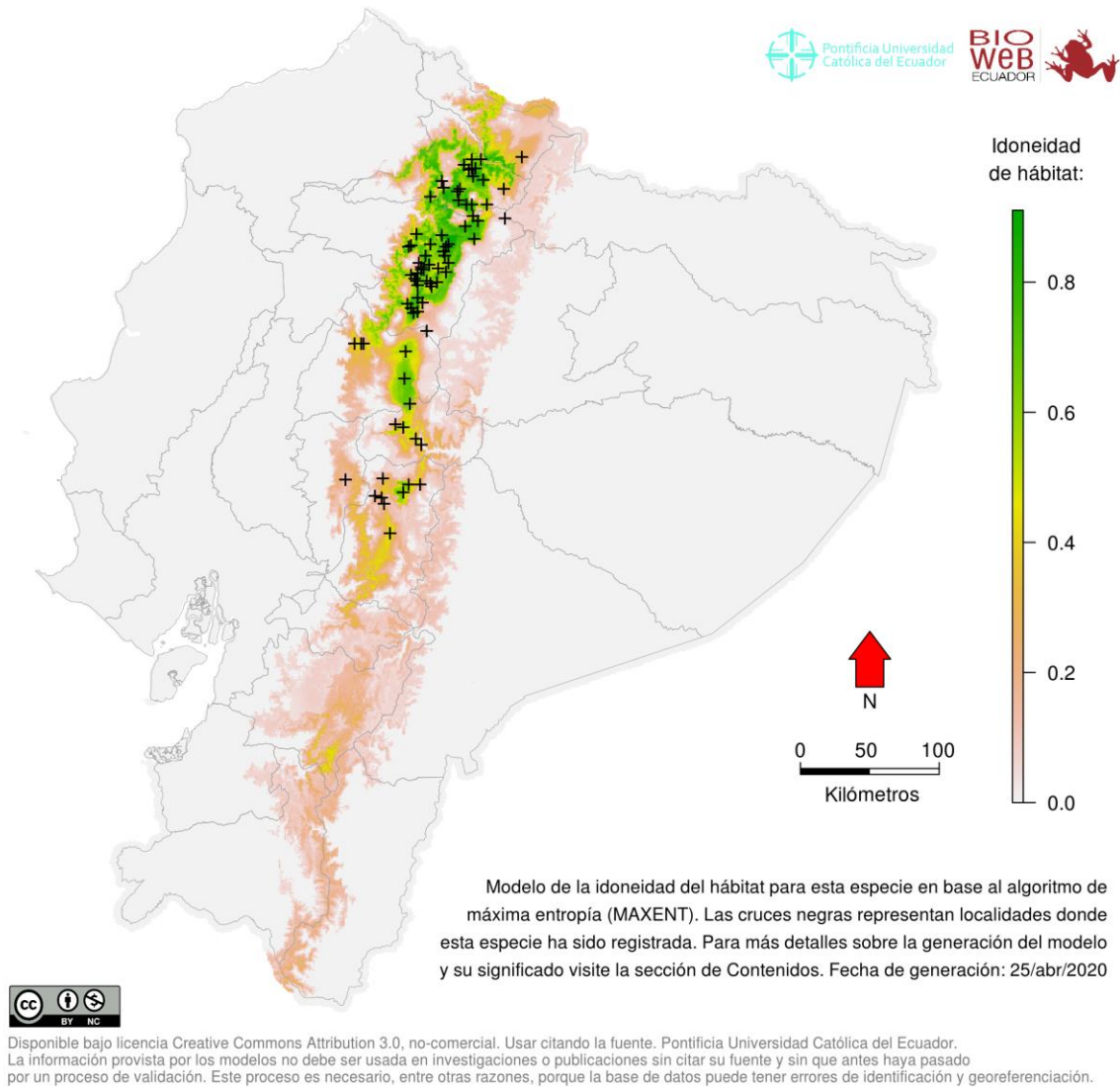
Según la IUCN, el estado de conservación de *G. riobambae* está clasificado como En Peligro respecto a su estado de conservación (IUCN, 2019). Las principales amenazas que enfrenta la especie son: cambio de uso de tierra por la agricultura y acuicultura, especies invasoras, contaminación y cambio climático (Coloma et al., 2004). En cuanto al grado de amenaza frente a *Batrachochytrium dendrobatidis*, no se han realizado estudios para saber cuánto puede llegar a afectar la infección por el hongo a *G. riobambae* en su aptitud y desarrollo vital. Como se ha mencionado anteriormente, en Quito, Ecuador, se ha registrado individuos de la especie infectados en varias poblaciones de la capital (Manzano, 2010; Ramírez y

Rodríguez, 2011). Sin embargo, para las poblaciones del volcán Pasochoa, se estipula que la principal amenaza para *G. riobambae* es la destrucción del hábitat (Ramírez y Rodríguez, 2011).

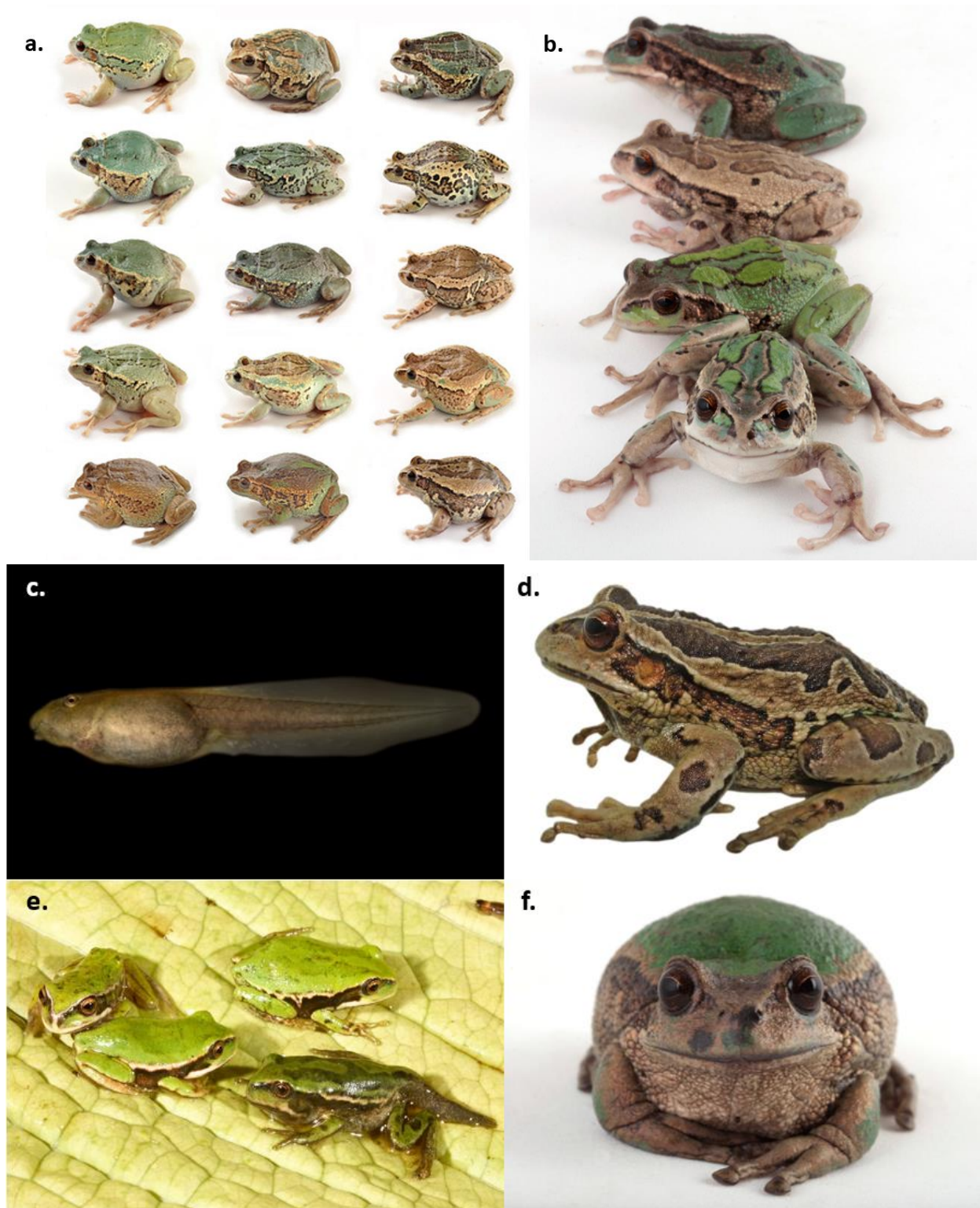
Afortunadamente, las ranas marsupiales de Quito están incluidas en dos iniciativas de conservación en Ecuador. Una de ellas es el Centro Jambatu para la Investigación y Conservación de Anfibios. Allí, las ranas marsupiales de Quito son criadas y reproducidas para proyectos de investigación que buscan comprender mejor los procesos biológicos de la especie. Entre los proyectos de conservación de la entidad, se han realizado estudios para determinar los sitios adecuados donde los individuos de *G. riobambae* puedan ser reintroducidos a hábitats naturales (Centro Jambatu, 2020). Por su parte, el proyecto Balsa de los Sapos de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) también cría y reproduce exitosamente individuos de *G. riobambae* con fines investigativos (Cadena Quevedo y García Romo, 2012).

Por último, *G. riobambae* fue declarada especie emblemática de Quito por la Secretaría General de Consejo de la ciudad en 2012. En la resolución se resalta la relación de la especie con la cultura popular y cómo esto la ha convertido en parte de la fauna característica de Quito. Se menciona también que actualmente la rana marsupial de Quito ya no es tan común debido a la expansión del casco urbano, pues sus poblaciones han disminuido en un 50% durante las últimas tres generaciones (Concejo Metropolitano de Quito, 2012).

## Mapa de distribución potencial de *Gastrotheca riobambae*



**Fig. 2.** Mapa de distribución potencial de *Gastrotheca riobambae*. **Fuente:** Chasiluisa et al. (2020).



**Fig. 3.** *Gastrotheca riobambae*. **a.** y **b.** Variación de coloración en diferentes individuos. Fotos: Wikiri S.A. **c.** Renacuajo de la especie. Foto: Luis A. Coloma. **d.** Macho de la especie. Foto: Mario H. Yáñez-Muñoz. **e.** Metamorfo y juveniles. Foto: Santiago R. Ron. **f.** Hembra grávida (con huevos en su marsupio) de la especie. Foto: Wikiri S.A.

## 2.2. Declaración de ética

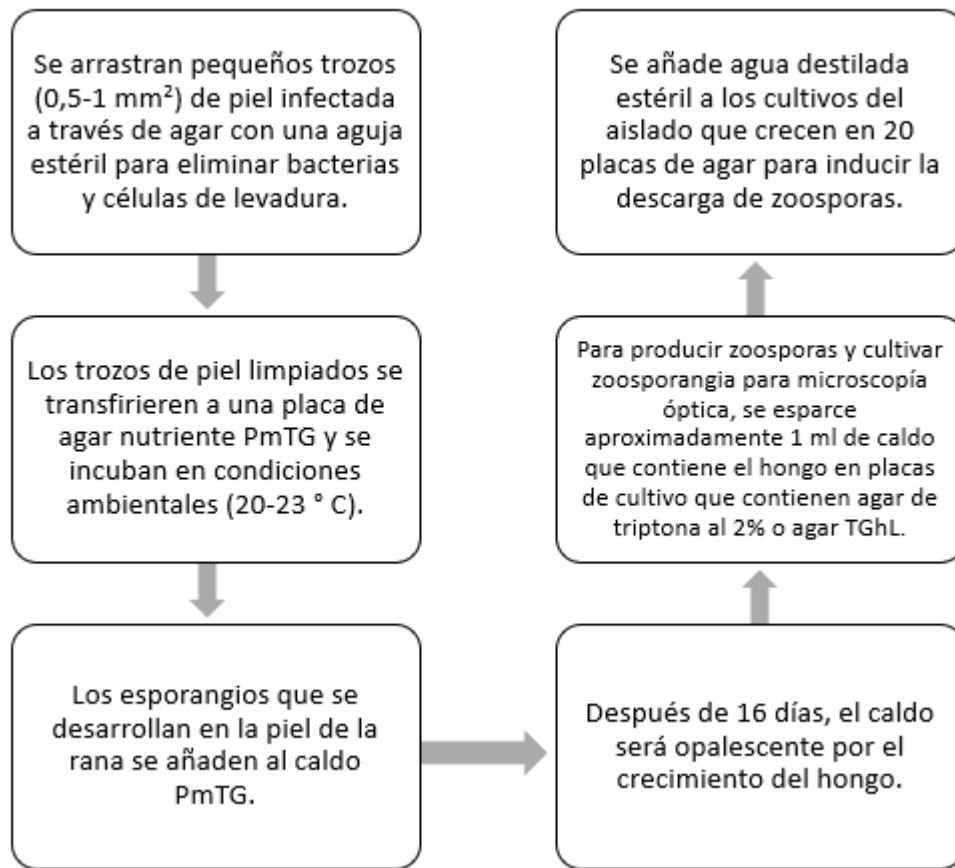
El protocolo de cuidado animal será sometido al Comité de Cuidado Animal de St. John's University en la ciudad de Nueva York, Estados Unidos. Además, se tramitará el permiso pertinente con el Ministerio del Ambiente de Ecuador para realizar los experimentos con individuos vivos.

## 2.3. Aislamiento del hongo quítrido

El aislamiento de *Batrachochytrium dendrobatidis* será realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ), usando muestras de piel (trozos de piel de 0,5-1 mm<sup>2</sup>; Longcore et al., 1999) de individuos de *Gastrotheca riobambae* infectados, provistos por el Zoológico de Guayllabamba (QuitoZoo) o el Centro Jambatu. Las muestras de piel serán extraídas de ranas sacrificadas aplicando Roxicaína (Lidocaína, 10%) en spray en su dorso (Ellison et al., 2020). Se considera necesario aislar la cepa del hongo quítrido directamente de una muestra de individuos de la misma especie para evitar inocular una cepa extranjera o a la que la especie tenga una vulnerabilidad diferenciada.

Se utilizará la metodología desarrollada en Longcore et al. (1999) (Fig. 4). Los medios de cultivo que se usarán son: agar nutriente PmTG (1 g leche peptonizada, 1 g triptona, 5 g glucosa, 10 g agar, 1 L agua destilada con 400 mg sulfato de estreptomicina y 200 mg penicilina-G agregadas después de autoclavar) y TGhL (16 g triptona, 4 g gelatina hidrolizada, 2 g lactosa, 12 g agar, 1 L agua destilada).

## PROTOCOLO DE AISLAMIENTO DE *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS*



**Fig. 4.** Procedimiento de aislamiento del hongo quítrido (*Batrachochytrium dendrobatidis*) desarrollado por Longcore et al. (1999). Esquema elaborado por la autora.

### 2.4. Experimentos

Trabajaremos con 108 adultos criados en cautiverio de *Gastrotheca riobambae* provistas por el QuitoZoo, ubicado en el Distrito Metropolitano de Quito, Ecuador. De ser posible, se seleccionarán individuos que tengan un tamaño corporal similar y que el grupo de ranas tenga una proporción equilibrada de sexos. Esta colaboración es posible a través de un convenio en proceso entre la Universidad Indoamérica (UTI) y el Zoológico de Guayllabamba, en donde ambas partes se verán beneficiadas. Para el QuitoZoo, el presente estudio le ayudará a determinar si los individuos de *G. riobambae* están infectados por el hongo quítrido y cuán

vulnerables son ante el patógeno. Además, las ranas utilizadas en el experimento serán devueltas libres del hongo, lo que evita que haya contagios no deseados en los otros individuos de la especie criados en cautiverio. Por su parte, la UTI se favorecerá de este acuerdo al facilitar su participación y colaboración en los proyectos de conservación realizados por el QuitoZoo.

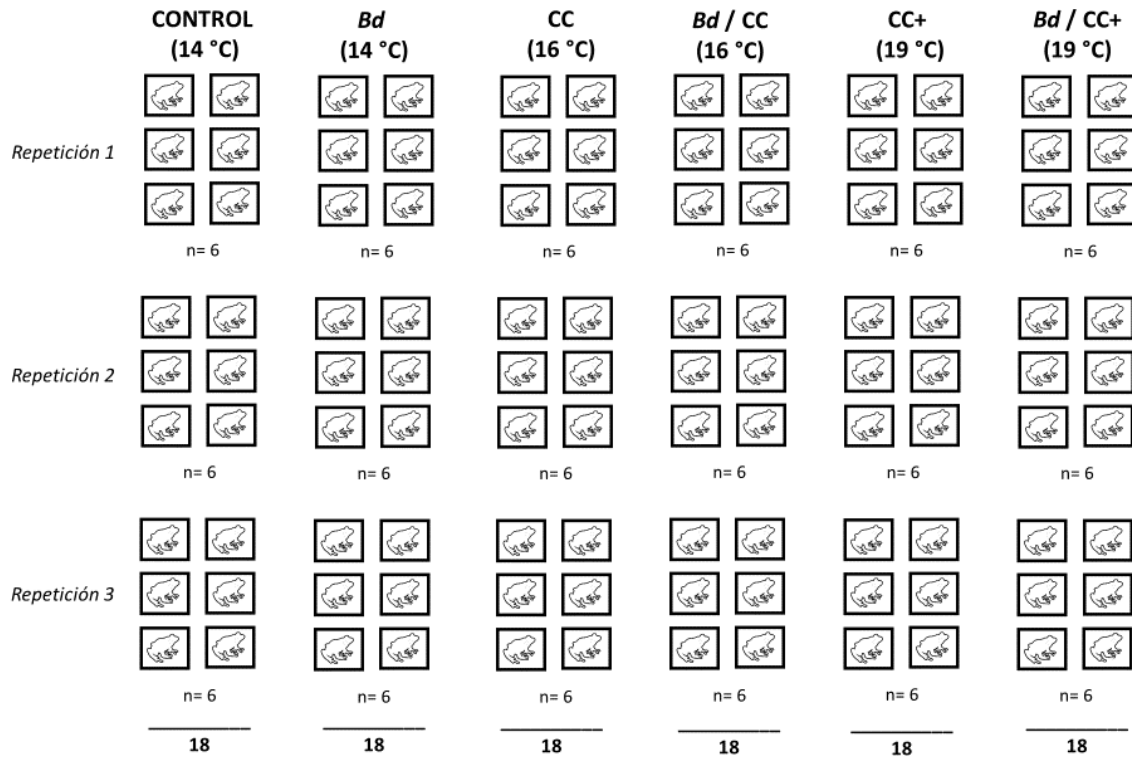
En el QuitoZoo, las ranas serán tratadas con un procedimiento antifúngico que consiste en bañar a las ranas en Itraconazol por cinco minutos, durante 10 días (Jones et al., 2012). Los individuos serán transportados a la UTI, sede Quito (Ecuador), donde el experimento se llevará a cabo. Allí, a todos los individuos se les tomará muestras de piel a través de *swabs* para comprobar que no tengan *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), usando una Reacción en Cadena de Polimerasa cuantitativa (qPCR, por sus siglas en inglés) en la USFQ. También, serán medidas (longitud rostro-cloacal, LRC; mm; Calibrador Scala®), pesadas (g; Balanza digital BOECO BBI-41 ® (BOECO, Alemania)), sexadas y fotografiadas dorsalmente (Canon 7D Mark II) para su identificación. Las ranas serán mantenidas en terrarios de plástico individuales con tapas de aislamiento ventiladas con el piso interior cubierto por papel absorbente humedecido con agua, que será cambiado dos veces por semana. Los animales serán alimentados dos veces por semana con grillos espolvoreados con calcio *ad libitum*, adquiridos en el Centro Jambatu.

Las ranas serán asignadas aleatoriamente a los seis grupos de tratamiento: **1) control** (ranas no infectadas mantenidas a 14 °C), **2) *Bd*** (ranas infectadas a 14 °C), **3) cambio climático** con un aumento de temperatura de 2° (**CC**, ranas no infectadas a 16 °C), **4) *Bd*** en un escenario de cambio climático con un aumento de 2° (***Bd* / CC**, ranas infectadas a 16 °C), **5) cambio climático** con un aumento de temperatura de 5° (**CC+**, ranas no infectadas a 19 °C) y **6) *Bd*** en



un escenario de cambio climático con un aumento de temperatura de 5° (*Bd* / *CC*+, ranas infectadas mantenidas a 19 °C). La temperatura del control y el tratamiento de *Bd* fue escogida porque 14 °C es la temperatura media anual para Quito, en donde una de las poblaciones de *G. riobambae* habita (Climate-Data.org). Para los tratamientos *CC* y *Bd* / *CC*, la temperatura de exposición es 16 °C, correspondiente a 2° más que la temperatura promedio (14 °C), siguiendo las proyecciones del Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (IPCC por sus siglas en inglés) del escenario 8,5 de las Rutas Representativas de Concentración (RCP por sus siglas en inglés; IPCC, 2013). Por último, la temperatura de los tratamientos *CC*+ y *Bd* / *CC*+ es 19 °C, ya que es la temperatura diaria promedio más alta alcanzada en Quito (Weather Spark). Por lo tanto, las poblaciones de *G. riobambae* que ocurren en la ciudad experimentan esta temperatura. Finalmente, todos los tratamientos tendrán tres repeticiones simultáneas. Cada repetición tendrá 6 terrarios con 1 individuo cada uno, con un total de 18 ranas por tratamiento (Fig. 5).

Previo a la infección, obtendremos observaciones base de las ranas durante una semana, relacionadas con la sintomatología de la quitridomicosis. La sintomatología consiste en cinco signos: postura anormal, desprendimiento excesivo de la piel, pérdida de apetito, letargo y pérdida del reflejo de enderezamiento (Ellison et al., 2020). Para las observaciones base, cada individuo en su terrario será observado durante 10 minutos al día, durante 7 días. En el primer día del experimento, los individuos asignados a los tratamientos de *Bd*, *Bd* / *CC* y *Bd* / *CC*+ serán pipeteados directamente en la espalda con 3ml de  $1,25 \times 10^5$  zoosporas/ml del asilado de *Bd* obtenido, en triptona al 1% (Cohen et al., 2018). El conteo de zoosporas se realizará mediante hematócrito y/o espectrofotometría (Cohen et al., 2018; Voyles et al., 2017).



**Fig. 5.** Representación visual del montaje del experimento. Los tratamientos: control (ranas no infectadas), *Bd* (ranas infectadas con *Batrachochytrium dendrobatidis*), escenarios de cambio climático (CC y CC+, ranas no infectadas) y *Bd* en escenarios de cambio climático (*Bd* / CC y *Bd* / CC+, ranas infectadas) con sus respectivas temperaturas se muestran en la parte superior. Los rectángulos representan terrarios de plástico, cada uno conteniendo un individuo de *Gastrotheca riobambae*. Los terrarios serán mantenidos en estanterías.

Los experimentos serán llevados a cabo una vez se obtenga el aislado del hongo quítrido y durarán seis semanas, considerando que este es el tiempo promedio que se utiliza en estudios similares (e.g. Catenazzi et al., 2017; Cohen et al., 2017; Cohen et al., 2018). Durante el experimento, cada terrario será monitoreado diariamente durante 10 minutos para supervivencia, temperatura corporal y sintomatología de la enfermedad. Los datos serán registrados en fichas con la fotoidentificación, código, tratamiento, repetición, fecha, lista de verificación de la sintomatología y observaciones adicionales del individuo (Anexo 1). Cada semana, se colectarán *swabs* cutáneos para identificar la prevalencia de *Bd* y cuantificar la

carga de infección de las ranas. La prevalencia de *Bd* será calculada dividiendo el número de individuos infectados para el número total de individuos en cada tratamiento (Catenazzi et al., 2017).

Los individuos serán pesados y medidos semanalmente para rastrear cualquier cambio que podría ocurrir durante el experimento y el desarrollo de la enfermedad. Si los individuos presentan pérdida del reflejo de enderezamiento o todos los otros cuatro síntomas de quitridomicosis, serán sacrificados aplicando Roxicaína en espray en su dorso (Ellison et al., 2020). Al finalizar el experimento, todos los individuos sobrevivientes y sin signos de la infección serán devueltos al QuitoZoo, donde serán sometidos al procedimiento antifúngico y reincorporados a sus proyectos anteriores.

### *2.5. Análisis moleculares*

Semanalmente, realizaremos *swabs* de la piel de cada rana con un hisopo estéril con punta de rayón para determinar la prevalencia de *Bd* y la carga de infección. Cada rana será frotada suavemente 30 veces de la siguiente manera: 5 frotos en cada lado de la línea media abdominal, 5 en la parte interna de los muslos de cada pata trasera y 5 en la membrana interdigital del pie de cada pata trasera (Catenazzi et al., 2017). Las muestras de *swabs* se analizarán utilizando la técnica de reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR) para detectar la prevalencia y la carga de infección (Boyle et al., 2004).

La reacción en cadena de polimerasa cuantitativa es una técnica para amplificar el ADN y cuantificarlo al mismo tiempo. Por esta razón, también es llamada reacción en cadena de polimerasa en tiempo real. El proceso se realiza como una PCR simple, pero se agrega al *Master Mix* una sustancia con fluoróforo que calcula la tasa de generación de un producto de interés (en este caso, la carga de infección del quítrido por individuo). Para ello, se necesita un termociclador capaz de detectar la longitud de onda emitida por el fluoróforo al ser excitado, a través de sensores de fluorescencia. La cuantificación se realiza al final de cada ciclo de amplificación (Heid et al., 1996).

Este procedimiento se realizará en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito. Puesto que los análisis de qPCR calculan la carga de infección de *Bd* como equivalentes genómicos, este valor será transformado a zoosporas equivalentes para cada individuo (Vrendenburg et al., 2010). La transformación es necesaria para que el estudio sea comparable con otras investigaciones (Catenazzi et al., 2017).

## 2.6. Análisis estadísticos

Usaremos el *Survival Package* de R 3.3.2 (Therneau, 2012) para comparar la supervivencia entre los tratamientos. Además, utilizaremos modelos de Efectos Lineales Mixtos con los tratamientos como variables de efectos fijos y el tamaño, sexo y tiempo durante el experimento como efectos aleatorios. Estos modelos serán procesados en R 3.3.2 (R Core Team, 2019).

### 3. RESULTADOS ESPERADOS

Con esta propuesta de investigación se espera obtener tres productos principales. En primer lugar, se aislará la cepa de *Batrachochytrium dendrobatidis* a partir de muestras de piel de *Gastrotheca riobambae*. Este primer paso es fundamental para poder continuar con la etapa experimental del estudio, puesto que se considera necesario aislar la cepa de la misma especie para no agregar variables de confusión que podrían influir en los resultados. Durante este procedimiento, es muy probable que se desarrolle un protocolo de aislamiento adaptado para *G. riobambae*, pero que también pueda aplicarse a otras especies de anuros. Dicho protocolo base, elaborado dentro del contexto nacional, podría ser útil para futuros estudios parecidos al propuesto aquí o de otro tipo, como se mencionará posteriormente.

En cuanto a la etapa experimental, se espera que los individuos de *G. riobambae* pertenecientes a los tratamientos *Bd* (ranas infectadas a 14 °C), *Bd / CC* (ranas infectadas a 16 °C) y *Bd / CC+* (ranas infectadas a 19 °C) se infecten con el hongo quítrido y desarrollen la sintomatología de la enfermedad. Además, se espera que las ranas del tratamiento *Bd / CC+* presenten más síntomas y una menor supervivencia. Con ello, podremos establecer los síntomas de la quitridomicosis y la supervivencia de las ranas expuestas al quítrido en diferentes condiciones de temperatura.

Por último, dentro de los experimentos también examinaremos si hay diferencias en la carga de infección de *Gastrotheca riobambae* según los tratamientos con distintas temperaturas. Es muy probable que las ranas del tratamiento *Bd / CC+* tengan una carga de

infección más alta en comparación con las ranas del tratamiento *Bd*. Por lo tanto, se podría asumir que los individuos de *G. riobambae* sometidos a temperaturas mayores serían más susceptibles al quítrido por el efecto sinérgico del aumento de temperatura y la exposición al hongo. De ser así, el cambio climático influiría negativamente en la supervivencia de *G. riobambae*.

#### 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El hongo quítrido ha sido responsable, parcial o completamente, de la declinación de anfibios alrededor del mundo. Su impacto en este grupo de vertebrados lo ha puesto en la mira de las investigaciones científicas, por lo que cada vez se va expandiendo más y más la frontera de conocimiento en torno al tema. Sin embargo, generar nueva información deriva en el planteamiento de nuevas preguntas y enfoques para estudiar el quítrido y su relación con los anfibios. La importancia de comprender mejor el sistema anfibio-*Bd* es inminente, puesto que el hongo quítrido actúa en conjunto con otros conductores de la pérdida de biodiversidad, como el cambio climático.

Esta propuesta de investigación busca determinar la vulnerabilidad de la rana marsupial de Quito (*Gastrotheca riobambae*) ante el hongo quítrido en un escenario de aumento de temperatura para entender cuáles son las consecuencias de la acción conjunta de ambas presiones/estresores (*Bd* y cambio climático). La información resultante podría ser usada para tomar acciones de conservación, sean estas preventivas o correctivas, con el fin de evitar declinaciones drásticas que puedan llevar a la extinción de las especies de anuros con dinámicas similares o estrechamente relacionadas a *G. riobambae*. Por ejemplo, podría generarse un plan de monitoreo *in situ* para las poblaciones de la rana marsupial de Quito dentro del Distrito Metropolitano de Quito. Con este plan, se realizarían pruebas de *Bd* a los individuos y se registraría la temperatura del hábitat constantemente, con el fin de evitar contagios masivos y muertes por la combinación de ambos factores (hongo quítrido y temperatura). Además, esta investigación podría complementar los estudios basados en proyecciones climáticas y modelamiento de nicho de *Bd* que busquen identificar y priorizar las poblaciones más

vulnerables al hongo quítrido y a las consecuencias del cambio climático, para enfocar los esfuerzos de conservación en ellas. Por último, los hallazgos de este trabajo podrían ser útiles para los centros de cría en cautiverio de *G. riobambae* o especies relacionadas. Puesto que se espera demostrar que la temperatura es una variable importante en el desarrollo de las ranas marsupiales de Quito, esto podría ser tomado en cuenta para la recreación de condiciones *ex situ* y/o tomar decisiones en los planes de reintroducción de la especie a hábitats naturales.

Se espera que los datos generados en la ejecución del proyecto presentado sirvan para investigaciones futuras de varios tipos. La cepa de *Batrachochytrium dendrobatidis* aislada podría utilizarse tanto para determinar la diversidad del hongo y conocer su historia evolutiva en Ecuador, como para bioensayos como el propuesto aquí. En cuanto al experimento, se conocerá a detalle cómo se desarrolla la quitridomicosis en las ranas marsupiales de Quito, dependiendo de la temperatura en la que se encuentra el individuo (14 °C, 16 °C o 19 °C). La información generada en dicha fase podría ser la línea base para coleccionar evidencia *ex situ* de la posible vulnerabilidad diferenciada entre especies monofásicas y bifásicas de ranas marsupiales. Por lo tanto, el siguiente paso sería replicar este experimento con una especie de rana marsupial monofásica y comparar los resultados obtenidos con *G. riobambae*. Yendo aún más lejos, con los datos de ambos experimentos se podría realizar un estudio similar al de Burkart et al. (2017) para comprobar la acción inhibitoria de las bacterias cutáneas presentes en *G. riobambae* y la especie monofásica que se elija.

El proyecto es factible por varios motivos. En primer lugar, ya se han realizado varios estudios similares al propuesto en este trabajo de titulación (e.g. Gervasi et al., 2013; Cohen et al., 2017; Catenazzi et al., 2017; Cohen et al., 2018; Ellison et al., 2020), obteniendo resultados



que ayudan a dilucidar los efectos y dinámicas que se dan en distintas especies, entre la temperatura y la infección del quítrido. Un ejemplo de ello es el planteamiento de la hipótesis de desajuste térmico y la evidencia colectada para apoyarla a partir de este tipo de bioensayos (Cohen et al., 2017; Cohen et al., 2018; Cohen et al 2019). En segundo lugar, se ha observado que las variables que se considerarán para el experimento, temperatura y carga de infección, son esenciales en estos estudios (Sauer et al., 2020). Por último, el proyecto será financiado por dos entidades (para más detalles, ver el apartado 6. Presupuesto): Universidad Indoamérica, sede Quito (Ecuador) y Universidad San Francisco de Quito (Ecuador).

Finalmente, se considera que esta propuesta de investigación es relevante para conocer mejor la interacción entre *B. dendrobatidis*, los anuros (específicamente las ranas marsupiales) y la temperatura. Es importante también para el contexto nacional, ya que abrirá paso para nuevas investigaciones en el estudio del sistema anfibio-*Bd* en el país. Por último, se podrá conocer mejor la vulnerabilidad de *Gastrotheca riobambae*, especie emblemática de la capital ante un patógeno de importancia mundial.

## 5. CRONOGRAMA

		MES 1			
ETAPA	DESCRIPCIÓN ACTIVIDAD	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Aislamiento <i>Bd</i>	Cultivo				
	Crecimiento del hongo				
	Extracción				
	Cuantificación de zoosporas				
Experimentos	Montaje				
	Piloto				
	Desarrollo				
	1. Procedimiento antifúngico				
	2. Observación de ranas				
Análisis moleculares	3. Infección				
	4. Desarrollo				
	Estandarización qPCR				
	Extracción de ADN				
Análisis estadísticos	Análisis qPCR				
	Cuantificación de zoosporas				
	Organización de los datos				
	Familiarización con el código				
	Correr análisis				

		MES 2			
ETAPA	DESCRIPCIÓN ACTIVIDAD	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Aislamiento <i>Bd</i>	Cultivo				
	Crecimiento del hongo				
	Extracción				
	Cuantificación de zoosporas				
Experimentos	Montaje				
	Piloto				
	Desarrollo				
	1. Procedimiento antifúngico				
	2. Observación de ranas				
	3. Infección				
Análisis moleculares	4. Desarrollo				
	Estandarización qPCR				
	Extracción de ADN				
	Análisis qPCR				
Análisis estadísticos	Cuantificación de zoosporas				
	Organización de los datos				
	Familiarización con el código				
	Correr análisis				

		MES 3							
ETAPA	DESCRIPCIÓN ACTIVIDAD	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4				
Aislamiento <i>Bd</i>	Cultivo								
	Crecimiento del hongo								
	Extracción	■	■						
	Cuantificación de zoosporas		■	■					
Experimentos	Montaje								
	Piloto								
	Desarrollo								
	1. Procedimiento antifúngico	■	■	■					
	2. Observación de ranas		■	■	■				
	3. Infección			■					
4. Desarrollo			■	■	■	■	■	■	■
Análisis moleculares	Estandarización qPCR		■	■	■	■	■	■	■
	Extracción de ADN				■	■	■	■	■
	Análisis qPCR				■	■	■	■	■
	Cuantificación de zoosporas								
Análisis estadísticos	Organización de los datos								
	Familiarización con el código								
	Correr análisis								

		MES 4			
ETAPA	DESCRIPCIÓN ACTIVIDAD	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Aislamiento <i>Bd</i>	Cultivo				
	Crecimiento del hongo				
	Extracción				
	Cuantificación de zoosporas				
Experimentos	Montaje				
	Piloto				
	Desarrollo				
	1. Procedimiento antifúngico				
	2. Observación de ranas				
	3. Infección				
	4. Desarrollo				
Análisis moleculares	Estandarización qPCR				
	Extracción de ADN				
	Análisis qPCR				
	Cuantificación de zoosporas				
Análisis estadísticos	Organización de los datos				
	Familiarización con el código				
	Correr análisis				

		MES 5			
ETAPA	DESCRIPCIÓN ACTIVIDAD	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Aislamiento <i>Bd</i>	Cultivo				
	Crecimiento del hongo				
	Extracción				
	Cuantificación de zoosporas				
Experimentos	Montaje				
	Piloto				
	Desarrollo				
	1. Procedimiento antifúngico				
	2. Observación de ranas				
	3. Infección				
Análisis moleculares	4. Desarrollo				
	Estandarización qPCR				
	Extracción de ADN				
	Análisis qPCR				
Análisis estadísticos	Cuantificación de zoosporas				
	Organización de los datos				
	Familiarización con el código				
	Correr análisis				

## 6. PRESUPUESTO

ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	ITEM	# UNIDADES	COSTO UNITARIO (USD)	DESCRIPCIÓN	COSTO TOTAL (USD)	FUENTE DE FINANCIAMIENTO	
AISLAMIENTO BD	MEDIOS DE CULTIVO	PmTG	Casitose	1	\$ 99,68	Frasco de 500 gr	\$ 99,68	USFQ
			Agua peptonada	1	\$ 82,88	Frasco de 500 gr	\$ 82,88	
			Glucosa	1	\$ 162,40	Frasco de 500 gr	\$ 162,40	
			Sulfato de estreptomicina	1	\$ 174,13	25 gr	\$ 174,13	
			Penicilina-G	2	\$ 4,56	Ampollas	\$ 9,12	
		Triptona	1	\$ 120,00	Frasco de 500 gr	\$ 120,00		
		TGhL	Agar	1	\$ 92,00	Frasco de 500 gr	\$ 92,00	
			Agua destilada	5	\$ 0,00	Litros. La USFQ tiene una destiladora, por lo que no hay un valor referencial.	\$ 0,00	
			Lactosa	1	\$ 31,36	Frasco de 500 gr	\$ 31,36	
			Gelatina hidrolizada	1	\$ 145,60	Frasco de 454 gr	\$ 145,60	
	MATERIALES DE CULTIVO	Cajas Petri	100	\$ 0,21	Cajas	\$ 21,28	USFQ	
		Erlenmeyers	10	\$ 4,37	Frascos	\$ 43,68		
		Vasos de precipitación	5	\$ 2,24		\$ 11,20		
<b>TOTAL DE LA ACTIVIDAD</b>						<b>\$ 993,33</b>		
MUESTRAS SWAB	MATERIALES	Hisopos estériles de rayon	500	\$ 38,40	200 unidades por paquete	\$ 115,20	UTI	
		Tubos Eppendorf 2ml	500	\$ 16,80	500 unidades por paquete	\$ 16,80		
	<b>TOTAL DE LA ACTIVIDAD</b>							<b>\$ 132,00</b>

ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	ITEM	# UNIDADES	COSTO UNITARIO (USD)	DESCRIPCIÓN	COSTO TOTAL (USD)	FUENTE DE FINANCIAMIENTO
ANÁLISIS qPCR	Materiales	Tubos Eppendorf 2ml	30	\$ 16,80	500 unidades por paquete	\$ 1,01	USFQ
		Tubos PCR 0,2ml	10	\$ 44,80	100 unidades por paquete	\$ 0,45	
		Puntas con filtro 0.5-10ul	200	\$ 84,00	960 unidades por paquete	\$ 17,50	
		Puntas con filtro 20-200ul	100	\$ 87,36	961 unidades por paquete	\$ 9,10	
		Puntas con filtro 100-1000ul	200	\$ 87,36	962 unidades por paquete	\$ 18,20	
		Tubos QPCR 0,2ul low-profile	20	\$ 432,32	96 tubos por caja	\$ 90,07	
		Tapas tubos QPCR 0,2ul low-profile	20	\$ 159,04	96 tapas por caja	\$ 33,13	
	Reactivos	Primers ITS	3	\$ 25,00	Sondas	\$ 75,00	
		Kit extracción ADN	10	\$ 452,00	KIT 200 preps	\$ 22,60	
		Agua PCR	1	\$ 28,00	50 ml	\$ 28,00	
		Evagreen	6	\$ 356,00	Supermix 200 rx	\$ 10,68	
<b>TOTAL DE LA ACTIVIDAD</b>						<b>\$ 305,74</b>	

EXPERIMENTOS	MATERIALES	Terrarios de plástico	108	\$ 8,00		\$ 864,00	UTI
		Estanterías	2	\$ 148,96		\$ 297,92	
		Termostatos	4	\$ 40,00		\$ 160,00	
		Aire acondicionado	1	\$ 300,00		\$ 300,00	
		Papel absorbente	1	\$ 15,50	Rollo de 600 metros	\$ 15,50	
<b>TOTAL DE LA ACTIVIDAD</b>						<b>\$ 1.637,42</b>	



## 7. LITERATURA CITADA:

- Barinaga, M. (1990). Where have all the froggies gone? *Science*, 247(4946), 1033-1035.  
<https://doi.org/10.1126/science.247.4946.1033>
- Bataille, A., Fong, J. J., Cha, M., Wogan, G. O., Baek, H. J., Lee, H., Min, M., y Waldman, B. (2013). Genetic evidence for a high diversity and wide distribution of endemic strains of the pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in wild Asian amphibians. *Molecular Ecology*, 22(16), 4196-4209.  
<https://doi.org/10.1111/mec.12385>
- 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.  
<https://doi.org/10.3354/dao068051>
- 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(15), 9031-9036.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.9031>
- Berger, L., Speare, R., y Hyatt, A. (1999). Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. *Declines and Disappearances of Australian Frogs. Environment Australia, Canberra, 1999*, 23-33.
- Bielby, J., Cooper, N., Cunningham, A., Garner, T. W. J., y Purvis, A. (2008). Predicting susceptibility to future declines in the world's frogs. *Conservation Letters*, 1(2), 82-90.  
<https://doi.org/10.1111/j.1755-263X.2008.00015.x>

- Blaustein, A. R., y Wake, D. B. (1990). Declining amphibian populations: a global phenomenon? *Trends in Ecology and Evolution*, 5(7), 203- 204.
- 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(2), 141-148. <https://doi.org/10.3354/dao060141>
- Burkart, D., Flechas, S. V., Vredenburg, V. T., y Catenazzi, A. (2017). Cutaneous bacteria, but not peptides, are associated with chytridiomycosis resistance in Peruvian marsupial frogs. *Animal Conservation*, 20(6), 483-491. <https://doi.org/10.1111/acv.12352>
- 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: The Journal of Biology and Conservation*, 37(2), 180-189. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2005.00025.x>
- Byrne, A. Q., Vredenburg, V. T., Martel, A., Pasmans, F., Bell, R. C., Blackburn, D. C., Bletz, M. C., Bosch, J., Briggs, C. J., Brown, R. M., Catenazzi, A., Familiar Lopez, M., Figueroa-Valenzuela, R., Ghose, S. L., Jaeger, J. R., Jani, A. J., Jirku, M., Knapp, R. A., Muñoz, A.,... Rosenblum, E. B. (2019). Cryptic diversity of a widespread global pathogen reveals expanded threats to amphibian conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(41), 20382– 20387. <https://doi.org/10.1073/pnas.1908289116>
- Cadena Quevedo, D. M., y García Romo, D. M. (2012). Fertilización asistida en rana marsupial andina *Gastrotheca riobambae* en el Centro de Investigación y Conservación de anfibios, Proyecto" Balsa de los sapos" de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/351>
- Carvajal-Endara, S., Coloma, L. A., Morales-Mite, M. A., Guayasamin, J. M., Szekely, P., y Duellman, W. E. (2019). Phylogenetic systematics, ecology, and conservation of

- marsupial frogs (Anura: Hemiphractidae) from the Andes of southern Ecuador, with descriptions of four new biphasic species. *Zootaxa*, 4562(1), 1-102. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4562.1.1>
- Catenazzi, A., Swei, A., Finkle, J., Foreyt, E., Wyman, L., y Vredenburg, V. T. (2017). Epizootic to enzootic transition of a fungal disease in tropical Andean frogs: Are surviving species still susceptible? *PloS One*, 12(10), e0186478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186478>
- Centro Jambatu. (2020). Proyectos: proyectos ejecutados. Acceso 17 enero 2020, desde: <http://www.anfibiosecuador.ec/index.php?cj,6>
- Chasiluisa, V., Frenkel, C., Vallejo, A., Félix-Novoa, C. y Ron, S. R. (2020). *Gastrotheca riobambae*. En: Ron, S. R., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. (Eds). Anfibios del Ecuador. Version 2019.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Acceso 15 enero 2020, desde: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Gastrotheca%20riobambae>
- Climate-Data.org. Clima Quito. Acceso 16 diciembre 2019. Disponible en <https://es.climate-data.org/america-del-sur/ecuador/provincia-de-pichincha/quito-1012/>
- Cohen, J. M., Venesky, M. D., Sauer, E. L., Civitello, D. J., McMahon, T. A., Roznik, E. A., y Rohr, J. R. (2017). The thermal mismatch hypothesis explains host susceptibility to an emerging infectious disease. *Ecology Letters*, 20(2), 184–193. <https://doi.org/10.1111/ele.12720>
- Cohen, J. M., Civitello, D. J., Venesky, M. D., McMahon, T. A., y Rohr, J. R. (2018). An interaction between climate change and infectious disease drove widespread amphibian declines. *Global Change Biology*, 25(3), 927-937. <https://doi.org/10.1111/gcb.14489>
- Cohen, J. M., McMahon, T. A., Ramsay, C., Roznik, E. A., Sauer, E. L., Bessler, S., Civitello, D. J., Delius, B. K., Halstead, N., Knutie, S. A., Nguyen, K. H., Ortega, N., Sears, B.,

- Venesky, M. D., Young, S., y Rohr, J. R. (2019). Impacts of thermal mismatches on chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* prevalence are moderated by life stage, body size, elevation and latitude. *Ecology Letters*, 22(5), 817-825.  
<https://doi.org/10.1111/ele.13239>
- Collins, J. P. (2010). Amphibian decline and extinction: what we know and what we need to learn. *Diseases of Aquatic Organisms*, 92(2-3), 93-99.  
<https://doi.org/10.3354/dao02307>
- Coloma, L. A. 2016. El Jambato negro del páramo. *Atelopus ignescens*, resucitó. IMciencia.
- Coloma, L. A., Ron, S., y Jungfer, K. H. (2004). *Gastrotheca riobambae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004: e.T55357A11298345. Obtenido 15 enero 2020, desde:  
<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T55357A11298345.en>.
- Concejo Metropolitano de Quito. (2012). Fauna emblemática de Quito. Resolución N° C349. Distrito Metropolitano de Quito. Quito, Ecuador. Disponible en:  
[http://www.quitoambiente.gob.ec/ambiente/images/Secretaria\\_Ambiente/Normativa/NORMATIVA%20AMBIENTAL/RESOLUCIONES/Resoluci%C3%B3n%20C349%20Fauna%20Emblem%C3%A1tica%20del%20DMQ.pdf](http://www.quitoambiente.gob.ec/ambiente/images/Secretaria_Ambiente/Normativa/NORMATIVA%20AMBIENTAL/RESOLUCIONES/Resoluci%C3%B3n%20C349%20Fauna%20Emblem%C3%A1tica%20del%20DMQ.pdf)
- Del Pino, E. (1975). Adaptaciones reproductivas para la vida terrestre del sapo marsupial *Gastrotheca riobambae* (Fowler) Anura, Hylidae. *Revista de la Universidad Católica, Quito* 3: 119–140.
- Duellman, W. E., y Hillis, D. M. (1987). Marsupial frogs (Anura: Hylidae: *Gastrotheca*) of the Ecuadorian Andes: resolution of taxonomic problems and phylogenetic relationships. *Herpetologica*, 43(2), 141-173.
- Duellman, W. E., y Trueb, L. (2015). Marsupial frogs: *Gastrotheca* and allied genera. *JHU Press*.

- Ellison, A., Zamudio, K., Lips, K., y Muletz-Wolz, C. (2020). Temperature-mediated shifts in salamander transcriptomic responses to the amphibian-killing fungus. *Molecular Ecology*, 29(2), 325-343. <https://doi.org/10.1111/mec.15327>
- Farrer, R. A., Weinert, L. A., Bielby, J., Garner, T. W. J., Balloux, F., Clare, F., Bosch, J., Cunningham, A. A., Weldon, C., du Preez, L. H., Anderson, L., Kosakovsky Pond, S. L., Shahar-Golan, R., Henk, D. A., 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111915108>
- Fisher, M. C., y Garner, T. W. J. (2007). The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biology Reviews*, 21(1), 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.02.002>
- Fowler, H. W. (1913). Amphibians and reptiles from Ecuador, Venezuela, and Yucatan. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 55, 153-176.
- Garner, T. W., Rowcliffe, J. M., y Fisher, M. C. (2011). Climate change, chytridiomycosis or condition: an experimental test of amphibian survival. *Global Change Biology*, 17(2), 667-675. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02272.x>
- Gervasi, S. S., Urbina, J., Hua, J., Chestnut, T., Relyea, R. A., y Blaustein, A. R. (2013). Experimental evidence for American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) susceptibility to chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *EcoHealth*, 10(2), 166-171. <http://dx.doi.org/10.1007/s10393-013-0845-3>
- Goka, K., Yokoyama, J. U. N., Une, Y., Kuroki, T., Suzuki, K., Nakahara, M., Kobayashi, A., Inaba, S., Mizutani, T., y Hyatt, A. D. (2009). Amphibian chytridiomycosis in Japan:

- distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology*, 18(23), 4757-4774. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04384.x>
- Grooten, M. y Almond, R. E. A. (2018). Living planet report–2018: Aiming higher. WWF.
- Gratwicke, B. (2014). Amphibian chytrid lifecycle. *Batrachochytrium dendrobatidis*. Panamá. Disponible en: <https://www.flickr.com/photos/briangratwicke/14115178249>
- Guayasamin, 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 & Reptile Conservation*, 8(1), 33-44.
- Harte, J., y Hoffman, E. (1989). Possible effects of acidic deposition on a rocky mountain population of the tiger salamander *Ambystoma tigrinum*. *Conservation Biology*, 3(2), 149-158. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.1989.tb00067.x>
- Hayes, M. P., y Jennings, M. R. (1986). Decline of ranid frog species in western North America: are bullfrogs (*Rana catesbeiana*) responsible? *Journal of Herpetology*, 20, 490-509. <https://doi.org/10.2307/1564246>
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., y Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986-994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Hof, C., Araújo, M. B., Jetz, W., y Rahbek, C. (2011). Additive threats from pathogens, climate and land-use change for global amphibian diversity. *Nature*, 480(7378), 516–519. <https://doi.org/10.1038/nature10650>
- IPCC. (2013). Summary for Policymakers. In: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

IUCN. (2019). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-2.

<https://www.iucnredlist.org>

Johnson, M. L., Berger, L., Philips, L., y Speare, R. (2003). Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 57(3), 255-260.

<https://doi.org/10.3354/dao057255>

Jones, M. E., Paddock, D., Bender, L., Allen, J. L., Schrenzel, M. D., y Pessier, A. P. (2012). Treatment of chytridiomycosis with reduced-dose itraconazole. *Diseases of Aquatic Organisms*, 99(3), 243-249.

<https://doi.org/10.3354/dao02475>

Kilpatrick, A. M., Briggs, C. J., y Daszak, P. (2010). The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(2), 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.07.011>

Kirk, J. J. (1988). Western spotted frog (*Rana pretiosa*) mortality following forest spraying of DDT. *Herpetol. Rev.*, 19, 51-53.

La Marca, E., Lips, K. R., Lötters, S., Puschendorf, R., Ibáñez, R., Rueda-Almonacid, J. V., Schulte, R., Marty, C., Castro, F., Manzanilla-Puppo, J., García-Pérez, J. E., Bolaños, F., Chaves, G., Pounds, J. A., Toral, E., y Young, B. E. (2005). Catastrophic population declines and extinctions in Neotropical harlequin frogs (Bufonidae: Atelopus). *Biotropica: The Journal of Biology and Conservation*, 37(2), 190-201.

<https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2005.00026.x>

Larsen, T. H., Brehm, G., Navarrete, H., Franco, P., Gómez, H., Mena, J. L., Morales, V., Argollo, J., Blacutt, L., y Canhos, V. (2012). Desplazamientos de los rangos de distribución y extinciones impulsados por el cambio climático en los Andes tropicales: síntesis y orientaciones. En S. K. Herzog, R. Martínez, P. M. Jorgensen, y H. Tiessen

- (Eds.), Cambio climático y biodiversidad en los Andes (pp. 57–82). Instituto Interamericano para la Investigación del Cambio Global (IAI).
- Longcore, J. E., Pessier, A. P., y Nichols, D. K. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91(2), 219-227. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061011>
- Manzano Pasquel, A. L. (2014) Revisiting the enigmatic: emergence of *Bd* coincide with amphibian decline in Los Andes of Ecuador. Report, San Francisco State University, San Francisco, California, 16 pp.
- Manzano, A. L. (2010). Prevalencia de quitridiomycosis en la población larvaria de *Gastrotheca riobambae* del Parque Metropolitano de Quito. Tesis de Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. Quito, Ecuador.
- Menéndez-Guerrero, P. A., y Graham, C. H. (2013). Evaluating multiple causes of amphibian declines of Ecuador using geographical quantitative analyses. *Ecography*, 36(7), 756-769. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2012.07877.x>
- Merino-Viteri, A. R. (2001). Análisis de las posibles causas de las disminuciones de las poblaciones de anfibios en los Andes de Ecuador. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- 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. <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/4782>
- Moyle, P. B. (1973). Effects of introduced bullfrogs, *Rana catesbeiana*, on the native frogs of the San Joaquin Valley, California. *Copeia*, 18-22. <https://doi.org/10.2307/1442351>
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., y Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853. <https://doi.org/10.1038/35002501>



- Nowakowski, A. J., Whitfield, S. M., Eskew, E. A., Thompson, M. E., Rose, J. P., Caraballo, B. L., Kerby, J. L., Donnelly, M. A., y Todd, B. D. (2016). Infection risk decreases with increasing mismatch in host and pathogen environmental tolerances. *Ecology Letters*, 19(9), 1051-1061. <https://doi.org/10.1111/ele.12641>
- O'Hanlon, S. J., Rieux, A., Farrer, R. A., Rosa, G. M., Waldman, B., Bataille, A., Martin, M. D., Wales, N., Alvarado-Rybak, M., Bates, K. A., Berger, L., Böll, S., Brookes, L., Clare, F., Courtois, E. A.,... Fisher, M. C. (2018). Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science*, 360(6389), 621-627. <https://doi.org/10.1126/science.aar1965>
- 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. <https://doi.org/10.1080/15572536.2005.11832990>
- 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., y Ron, S. R. (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439(7073), 161. <https://doi.org/10.1038/nature04246>
- R Core Team. (2019). R: A Language and Environment for Statistical Computing. In: <http://www.R-project.org/>. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ramírez, S. M., y Rodríguez, M. L. (2011). Estado poblacional y relaciones ecológicas de *Gastrotheca riobambae* (Anura: Hemiphractidae) en dos localidades del Volcán Pasochoa, Pichincha–Ecuador. *Boletín Técnico, Serie Zoológica*, 10(7).
- 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), 774-787. <https://doi.org/10.1111/mec.12615>

- 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., Guayasamín J. M., y Menéndez-Guerrero P. A. (2011). Biodiversity and Conservation Status of Ecuadorian Amphibians. En H. Heatwole, C. Barrio-Amoros, y H. W. Wilkinson (Eds.), *Amphibian Biology* (pp. 129–170). Surrey Beatty & Sons Pty. Ltd.
- Ron, S. R., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. 2019. Anfibios del Ecuador. Version 2019.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Disponible en: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb>, fecha de acceso 15 de marzo, 2020.
- Ron, S. R., y Merino-Viteri, A. (2000). Amphibian declines in Ecuador: overview and first report of chytridiomycosis from South America. *Froglog*, 42, 2-3.
- Rosenblum, E. B., Voyles, J., Poorten, T. J., y Stajich, J. E. (2010). The deadly chytrid fungus: a story of an emerging pathogen. *PLoS Pathogens*, 6(1). <https://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.ppat.1000550>
- Sauer, E. L., Cohen, J. M., Lajeunesse, M. J., McMahon, T. A., Civitello, D. J., Knutie, S. A., Nguyen, K., Roznik, E. A., Sears, B. F., Bessler, S., Delius, B. K., Halstead, N., Ortega, N., Venesky, M. D., Young, S., y Rohr, J. R. (2020). A meta-analysis reveals temperature, dose, life stage, and taxonomy influence host susceptibility to a fungal parasite. *Ecology*, 101(4), e02979. <https://doi.org/10.1002/ecy.2979>
- Scheele, B. C., Pasmans, F., Skerratt, L. F., Berger, L., Martel, A., Beukema, W., De la Riva, I., Fisher, M. C., Flechas, S. V., Foster, C. N., Frías-Álvarez, P., Garner, T. W. J., Gratwicke, B., Guayasamin, J. M., Hirschfeld, M., ... Canessa, S. (2019). Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science*, 363(6434), 1459-1463. <https://doi.org/10.1126/science.aav0379>

- 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. A., Daszak, P., y James, T. Y. (2012). Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology*, 21(21), 5162-5177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05710.x>
- Sodhi, N. S., Bickford, D., Diesmos, A. C., Lee, T. M., Koh, L. P., Brook, B. W., Sekercioglu, C. H., y Bradshaw, C. J. (2008). Measuring the meltdown: drivers of global amphibian extinction and decline. *PloS One*, 3(2), e1636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001636>
- 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), 1783. <https://doi.org/10.1126/science.1103538>
- Talley, B. L., Muletz, C. R., Vredenburg, V. T., Fleischer, R. C., y Lips, K. R. (2015). A century of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Illinois amphibians (1888–1989). *Biological Conservation*, 182, 254-261. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.12.007>
- Therneau, T. M. (2012). A Package for Survival Analysis in S. R package version 2.37-2. Disponible en: <http://CRAN.R-project.org/package=survival>
- Vizcaíno Alonso, M. D. C., Barnes, C. L., y Ordóñez, M. E. (2013). Estructuración genética de muestras del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* en Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas: REMCB*, 34(1), 47-61.
- Vredenburg, V. T., Knapp, R. A., Tunstall, T. S., y Briggs, C. J. (2010). Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(21), 9689–9694. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914111107>

- Voyles, J., Berger, L., Young, S., Speare, R., Webb, R., Warner, J., Rudd, D., Campbell, R., y Skerratt, L. F. (2007). Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. *Diseases of Aquatic Organisms*, 77(2), 113-118. <https://doi.org/10.3354/dao01838>
- Voyles, J., Johnson, L. R., Rohr, J., Kelly, R., Barron, C., Miller, D., Minster, J., y Rosenblum, E. B. (2017). Diversity in growth patterns among strains of the lethal fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* across extended thermal optima. *Oecologia*, 184(2), 363-373. <https://doi.org/10.1007/s00442-017-3866-8>
- Wake, D. B., y Vredenburg, V. T. (2008). Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(Supplement 1), 11466-11473. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801921105>
- Weather Spark. El clima promedio de Quito. Acceso 16 diciembre 2019. Disponible en <https://es.weatherspark.com/y/20030/Clima-promedio-en-Quito-Ecuador-durante-todo-el-a%C3%B1o#Sections-Temperature>
- Weldon, C., Du Preez, L. H., Hyatt, A. D., Muller, R., y Speare, R. (2004). Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12), 2100. <https://doi.org/10.3201/eid1012.030804>
- 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. <https://doi.org/10.1890/06-1842.1>

## ANEXOS

**Anexo 1.** Ficha de registro diario de los experimentos.

### REGISTRO DIARIO

Fecha: \_\_\_\_\_

Código del individuo: \_\_\_\_\_

Semana N°: 1  2  3  4  5  6

Tratamiento: Control  Bd  CC  Bd / CC  CC+  Bd / CC+

Repetición N°: 1  2  3

Fotografía del  
individuo para  
identificación

SINTOMATOLOGÍA	PRESENTA	NO PRESENTA
Postura anormal		
Desprendimiento excesivo de piel		
Pérdida del apetito		
Letargo		
Pérdida del reflejo de enderezamiento		

**Swab**

Sí

No

Código: \_\_\_\_\_

Observaciones adicionales: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_