



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y**  
**AMBIENTALES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN RECURSOS NATURALES**  
**RENOVABLES**

**“LINEAMIENTOS DE MANEJO DEL HONGO *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) EN ANUROS DE LA RESERVA SIEMPRE VERDE-COTACACHI”**

TRABAJO DE TITULACIÓN PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIEROS EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES

**AUTORES:**

John Luis Manosalvas Pantoja  
Daniela Fernanda Méndez Rodríguez

**DIRECTORA:**

Ing. Delia Elizabeth Velarde Cruz MSc.

Ibarra-Ecuador

2022



FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
AMBIENTALES

**CERTIFICACIÓN TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE  
TITULACIÓN**

Ibarra, 06 de junio del 2022

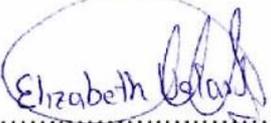
Para los fines consiguientes, una vez revisado el documento en formato digital el trabajo de titulación: "LINEAMIENTOS DE MANEJO DEL HONGO *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) EN ANUROS DE LA RESERVA SIEMPRE VERDE-COTACACHI", de autoría del señor John Luis Manosalvas Pantoja y la señorita Daniela Fernanda Méndez Rodríguez, estudiantes de la Carrera de **INGENIERÍA RECURSOS NATURALES RENOVABLES** el tribunal tutor **CERTIFICAMOS** que los autores han procedido a incorporar en su trabajo de titulación las observaciones y sugerencia realizadas por este tribunal.

Atentamente,

**TRIBUNAL TUTOR**

MSc. Elizabeth Velarde  
**DIRECTOR TRABAJO TITULACIÓN**

**FIRMA**



.....

MSc. Renato Oquendo  
**MIEMBRO TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE TITULACIÓN**



.....

MSc. Sania Ortega  
**MIEMBRO TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE TRITULACIÓN**



.....

**Misión Institucional:**

Contribuir al desarrollo educativo, científico, tecnológico, socioeconómico y cultural de la región norte del país. Formar profesionales críticos, humanistas y éticos comprometidos con el cambio social.



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
FACULTAD INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES  
CARRERA DE INGENIERÍA EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES

UNIVERSIDAD ACREDITADA RESOLUCIÓN NRO. 001-073-CEAACES-2013-13  
Ibarra-Ecuador

**AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA  
UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

**1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA**

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte de manera digital para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO		
CÉDULA:	1003979034	
NOMBRES Y APELLIDOS:	John Luis Manosalvas Pantoja	
DIRECCIÓN:	El Sagrario-Ibarra	
EMAIL:	jlmanosalvasp@utn.edu.ec	
TELEFONO FIJO Y MOVIL:	N/A	0958737808

DATOS DE CONTACTO		
CÉDULA:	1004181531	
NOMBRES Y APELLIDOS:	Daniela Fernanda Méndez Rodríguez	
DIRECCIÓN:	El Sagrario-Ibarra	
EMAIL:	dfmendez@utn.edu.ec	
TELEFONO FIJO Y MOVIL:	N/A	0939748874

**MISIÓN INSTITUCIONAL:** Contribuir al desarrollo educativo, científico, tecnológico, socioeconómico y cultural de la región norte del país. Formar profesionales críticos, humanistas y éticos comprometidos con el cambio social.



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
FACULTAD INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES**

UNIVERSIDAD ACREDITADA RESOLUCIÓN NRO. 001-073-CEAACES-2013-13  
Ibarra-Ecuador

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	“LINEAMIENTOS DE MANEJO DEL HONGO <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (Bd) EN ANUROS DE LA RESERVA SIEMPRE VERDE-COTACACHI”
AUTOR:	Manosalvas Pantoja John Luis Méndez Rodríguez Daniela Fernanda
FECHA:	06 de junio del 2022
SOLO PARA TRABAJO DE TITULACIÓN	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PRESGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniería en Recursos Naturales Renovables
DIRECTOR:	Ing. Elizabeth Velarde MSc.

## 2. CONSTANCIAS

Los autores manifiestan que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que son los titulares de los derechos patrimoniales, por lo que asumen la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrán en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 06 días del mes de junio de 2022

  
.....

Manosalvas Pantoja John Luis

CI: 1003979034

  
.....

Méndez Rodríguez Daniela Fernanda

CI: 1004181531

## **AGRADECIMIENTO**

*Gracias a Dios, ante todo, porque su amor y bondad no tienen fin, por darnos la vida y permitirnos cumplir nuestro objetivo de ser profesionales.*

*A nuestros padres y hermanos, por su apoyo incondicional y por creer en nosotros durante todos estos años.*

*A Lenin Riascos, nuestro amigo y maestro, quien se convirtió en un pilar fundamental para el desarrollo de este trabajo y a quienes conforman el Laboratorio de Investigaciones Ambientales LABINAM.*

*A nuestros asesores de tesis: Biól. Renato Oquendo MSc. y Biól. Sania Ortega MSc., y a nuestra directora de tesis: Ing. Elizabeth Velarde MSc., agradecemos su indispensable apoyo, colaboración y guía para el desarrollo de esta investigación.*

*A cada uno de nuestros docentes, por los conocimientos que nos han transmitido y nos han formado profesionalmente durante la carrera, especialmente a los profesores: Edú Almeida MSc, James Rodríguez Echeverry PhD, y a Oscar Rosales MSc, los recordaremos siempre con cariño.*

*Finalmente, a nuestros compañeros de aula, en especial a quienes se convirtieron en nuestros amigos, gracias por las experiencias vividas y por ser parte importante de nuestro desarrollo personal y profesional.*

*¡Muchas gracias!*

**John y Daniela**

## **DEDICATORIA**

*A mis padres Wilmer y Patricia quienes son mi más grande admiración y me han apoyado incondicionalmente para lograr cumplir mis objetivos y formarme como profesional.*

*A mis hermanos Kimberly y Carlos por las experiencias compartidas y su inmenso amor.*

*A mi novia y compañera Daniela Fernanda, por su gran amor y apoyo en esta trayectoria que logramos juntos, experiencias que siempre llevaré en mi corazón.*

*A mis familiares y amigos que me extendieron su mano cuando lo necesité.*

**John Manosalvas**

## **DEDICATORIA**

*El presente trabajo se lo dedico a las personas que han estado conmigo en todo momento, mis padres Daniel e Isabel quienes con su ejemplo de sacrificio y dedicación me han inculcado valores y principios para formarme como una persona de bien, por enseñarme a lo largo de mi vida a luchar por mis sueños y nunca rendirme, por ser mi fuerza y apoyo.*

*A mis hermanos por ser mis compañeros de vida, especialmente a mi hermano Alexis le dedico este trabajo como muestra de que es posible cumplir nuestros sueños cuando luchamos con el corazón por lograrlos, y a Alejandro por ser mi luz.*

*A mi novio y compañero John, por ser mi soporte en las adversidades, por su responsabilidad, dedicación, compromiso y sobre todo por el apoyo y amor que me brindó para lograr esta meta juntos.*

*Finalmente, dedico este logro a toda mi familia, en especial a mi tía Gloria por ser como una segunda madre para mí, de igual manera a mi abuelo materno Braulio, y a la memoria de mi abuela materna Beatriz, quien partió del mundo terrenal hace muy poco, pero vive por siempre en mi corazón y en la eternidad de Dios, así como la memoria de mis abuelos paternos Rosario y José Miguel.*

**Daniela Méndez**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Contenido</b>	<b>Páginas</b>
<b>RESUMEN</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Revisión de antecedentes .....	1
1.2 Problema de investigación y justificación.....	5
1.3 Objetivos .....	8
1.3.1. Objetivo general .....	8
1.3.2. Objetivos específicos .....	8
1.4 Preguntas directrices .....	8
<b>CAPÍTULO II</b> .....	9
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	9
2.1. Marco teórico referencial .....	9
2.1.1. Taxonomía y características de los anfibios.....	9
2.1.2. Anuros .....	10
2.1.3. Quitridiomycosis.....	15
2.1.4. Técnica de ADN ambiental (eDNA).....	17
2.2. Marco Legal .....	22
2.2.1. Constitución de la República del Ecuador 2008 .....	22
2.2.2. Convenio de la Diversidad Biológica (CDB) .....	22
2.2.3. Reglamento al Código Orgánico del Ambiente .....	23
2.2.4. Plan de Creación de Oportunidades 2021-2025.....	24
<b>CAPITULO III</b> .....	25
<b>METODOLOGÍA</b> .....	25
3.1. Área de estudio.....	25
3.2. Métodos.....	26
3.2.1. Determinar la presencia de Bd en especies de anuros de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi. ....	26

3.2.2. Detectar la presencia de <i>Bd</i> en cuerpos de agua de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi utilizando la técnica de ADN ambiental. ....	33
3.2.3. Diseñar lineamientos de manejo de <i>Bd</i> en anuros en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi.....	35
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	37
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	37
4.1. Detección de <i>Bd</i> en especies de anuros de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi	
37	
4.1.1. Muestreo de anuros en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi .....	37
4.1.2. Determinación de la presencia de <i>Bd</i> mediante hisopados en anuros..	40
4.1.3. Muestreo basado en ADN de <i>Bd</i> extraído de muestras de hisopos con 3 réplicas	41
4.2. Detección de <i>Bd</i> en muestras ambientales de cuerpos de agua en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi .....	43
4.2.1. Aislamiento de ADN ambiental de <i>Bd</i> en muestras de agua tomadas en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi.....	43
4.2.2. Muestreo basado en ADN ambiental de <i>Bd</i> extraído en muestras de agua con 3 réplicas.....	44
4.2.3. Secuenciación de productos PCR amplificados con hisopos y eDNA	46
4.3. Lineamientos de manejo de <i>Bd</i> en anuros en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi.....	48
4.3.1. Manipulación ambiental para reducir <i>Bd</i> .....	50
4.3.2. Manipulación ambiental para aumentar la capacidad de amortiguamiento de las poblaciones .....	53
4.3.3. Introducción de anuros en entornos desfavorables para <i>Bd</i> .....	54
4.3.4. Introducción de anuros para aumentar la capacidad de amortiguamiento de las poblaciones .....	55
4.3.5. Conservación ex situ para reducir <i>Bd</i> y aumentar la capacidad de amortiguamiento de las poblaciones .....	56
4.3.6. Elección de estrategia.....	58
4.3.7. Protocolo de Bioseguridad para el muestreo de anuros .....	58
4.3.8. Protocolo de curación de <i>Bd</i> para anuros.....	60

<b>CAPITULO V</b> .....	62
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	62
5.1. Conclusiones .....	62
5.2. Recomendaciones.....	62
<b>REFERENCIAS</b> .....	63
<b>ANEXOS</b> .....	87

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de los anfibios.....	9
<b>Tabla 2</b> Clasificación taxonómica de Bd.....	16
<b>Tabla 3.</b> Características de los cebadores utilizados durante la PCR de las muestras de hisopos.....	32
<b>Tabla 4.</b> Identificación taxonómica de los anuros muestreados en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi .....	37
<b>Tabla 5.</b> Secuenciación por identidad en la base de datos de GenBank-Blast....	46
<b>Tabla 6.</b> Lineamientos de manejo de Bd en anuros de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi.....	49

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estadios morfológicos de Bd que terminan en la formación de nuevas zoosporas.....	17
<b>Figura 2.</b> Mapa de ubicación de la Reserva Siempre Verde .....	25
<b>Figura 3.</b> Mapa de puntos de muestreo en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi	26
<b>Figura 4.</b> Construcción a) y diseño de trampas de caídas y sus cercas de desvío, b) Tipos de trampas de caída según Ballesteros et al. (2019). c) Derecha: Registro fotográfico de una trampa de caída con el diseño tipo C. ....	27
<b>Figura 5.</b> Hisopados de piel en anuros muestreados mediante metodologías de observación directa y captura con redes de mano .....	28
<b>Figura 6.</b> Toma de muestras ambientales de agua en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi.....	33
<b>Figura 7.</b> Marco de trabajo conceptual para diseñar lineamientos de manejo de Bd en anuros en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi. ....	36
<b>Figura 8.</b> Uso de suelo y Cobertura Vegetal de la Reserva Siempre Verde. Ubicación de los anuros muestreados en la Reserva Siempre Verde.....	39
<b>Figura 9.</b> Amplificaciones de la PCR con muestras de frotis de tejido de anuros usando volúmenes de 10 µl .....	41
<b>Figura 10.</b> Presencia/Ausencia de Bd en anuros de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi.....	42
<b>Figura 11.</b> Sitios de colecta de muestras ambientales de agua en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi.....	43
<b>Figura 12.</b> Amplificaciones de la PCR con muestras ambientales de agua usando volúmenes de 10 µl. ....	44

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y**  
**AMBIENTALES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN RECURSOS NATURALES**  
**RENOVABLES**

LINEAMIENTOS DE MANEJO DEL HONGO *Batrachochytrium dendrobatidis*  
(*Bd*) EN ANUROS DE LA RESERVA SIEMPRE VERDE-COTACACHI

Manosalvas Pantoja John Luis  
Méndez Rodríguez Daniela Fernanda

**RESUMEN**

Ecuador es un país megadiverso que posee una gran variedad de especies de anuros tanto endémicos como nativos. Este grupo de vertebrados es importante para el funcionamiento de ecosistemas y la salud ambiental. Sin embargo, en las últimas décadas se ha registrado un declive a nivel mundial. Entre las principales causas del declive se encuentra la quitridiomycosis, enfermedad producida por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Una de las causas de su dispersión podría ser el manejo inadecuado de los anuros por parte de los humanos con fines legales, ilegales e incluso científicos. El objetivo de este estudio fue detectar la presencia de *Bd* en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi y diseñar lineamientos de manejo para este hongo. Se realizaron frotis con hisopos en la piel de 14 individuos de anuros y se recolectaron muestras de agua en seis puntos de muestreo en la zona más húmeda y lluviosa del área de estudio. Cada una de las muestras fue analizada mediante PCR convencional con el fin de identificar la presencia de ADN de *Bd*. Los resultados que se obtuvieron fueron verificados mediante secuenciación y comparación de identidad en el programa informático Blast. Posteriormente, se diseñaron los lineamientos de manejo con base en un marco de trabajo conceptual que permite realizar acciones de manejo que se pueden implementar de manera inmediata en la Reserva. Se obtuvieron resultados positivos de *Bd* para 13 de los 14 anuros y para todas las muestras de agua. Por lo tanto, *Bd* está presente en anuros y cuerpos de agua de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi. Se establecieron lineamientos para reducir *Bd* en el ambiente y aumentar la capacidad de amortiguación de las poblaciones. Además, se presentan los protocolos de bioseguridad para el muestreo y curación de anuros. Mediante los lineamientos de manejo se busca aportar en la conservación de anuros en la integridad ecológica del ecosistema donde habitan.

**Palabras claves:** *Batrachochytrium dendrobatidis*, conservación, anuros, frotis, eDNA, lineamientos de manejo.

**MANAGEMENT GUIDELINES FOR THE FUNGUS *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) IN ANURANS OF THE SIEMPRE VERDE-COTACACHI RESERVE**

**ABSTRACT**

Ecuador is a megadiverse country that has a wide variety of endemic anuran species as native. This group of vertebrates is important for ecosystem functioning and environmental health. In recent times, however, there has been a decline worldwide. Among the main causes of this decline is the disease of chytridiomycosis produced by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). The global dispersion of the fungus suggests that one of the causes could be the inadequate management of anuran by humans for legal, illegal and even scientific purposes. Among the main causes of this decline is the disease of chytridiomycosis produced by the fungus *Bd*. The global dispersion of the fungus suggests that one of the causes could be the inadequate management of anuran by humans for legal, illegal, and even scientific purposes. The objective of this study was to detect the presence of *Bd* in the Siempre Verde–Cotacachi Reserve and to design management guidelines for this fungus. Swab smears were performed on the skin of 14 anuran and water samples were collected at six sampling points in the wettest and rainy area of the Reserve. Each of the samples was analyzed by conventional PCR to identify the presence of *Bd* DNA. The results were verified by sequencing and identity comparison in the Blast software. Subsequently, management guidelines were designed based on a conceptual framework that allows management actions that can be implemented immediately in the Reserve. *Bd* positive results were obtained for 13 of the 14 anuran and for all water samples. Therefore, *Bd* is present in water bodies and anuran of the Verde-Cotacachi Reserve. Management guidelines were established for reduce *Bd* in the environment and increase the buffer capacity of populations. In each approach, the management strategies were classified into three classes of action depending on whether they are implemented in situ, involve the introduction of amphibians, or are implemented ex situ. In addition, biosafety protocols for sampling and curing anurans are presented. Through the management guidelines, it is sought to contribute to the conservation of anurans in the ecological integrity of the ecosystem where they live.

**Keywords:** *Batrachochytrium dendrobatidis*, conservation, anurans, smear, eDNA, management guidelines

# CAPÍTULO I.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Revisión de antecedentes

Ecuador es considerado uno de los 18 países con mayor biodiversidad del planeta (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2016). El país ocupa el tercer puesto con mayor cantidad de anfibios a nivel mundial, posee 653 especies y es considerado la región del planeta con la concentración más diversa de ranas y sapos. El orden Anura (ranas y sapos) es el más abundante, registra 618 especies. Entre las menos diversas se encuentran los órdenes Gymnophiona (cecilias) con 25 especies y Caudata (salamandras) con 10 especies (Ron et al., 2021).

Los anuros son importantes para el funcionamiento de los ecosistemas ya que cumplen un rol importante en la cadena trófica como controladores de poblaciones de insectos (Gascon et al., 2007). Además, son capaces de demostrar el estado de conservación del ecosistema donde viven, ya sea acuático o terrestre (Ramírez, 2010). Sin embargo, en los últimos tiempos este orden se ha enfrentado a circunstancias que han causado un declive poblacional (Narváez, 2014), debido a diferentes factores como la destrucción del hábitat, contaminación, introducción de especies exóticas, la actividad agrícola, y otros factores ambientales y antrópicos que alteran las dinámicas poblacionales (Quispe, 2018). Como consecuencia es el único orden en riesgo a nivel mundial, ya que su distribución se limita a pequeños rangos geográficos que registran alta susceptibilidad a diferentes impactos ambientales (Wake y Vredenburg, 2008).

A nivel ecológico, el declive poblacional de los anuros puede generar cambios en la composición de especies y modificar diversos procesos ecológicos que hacen parte del funcionamiento natural de los ecosistemas, tales como: relaciones depredador-presa y parásito-hospedero, el ciclo de nutrientes, regulación de plagas y en algunos casos la dispersión de semillas (Echeverría et al., 2014). Por lo tanto, el cambio en la abundancia de individuos de anuros genera importantes efectos sobre la estructura de comunidades de fauna y flora, altera procesos ecosistémicos

claves como la formación de suelo y tiene efectos negativos en la persistencia de numerosas plantas, lo que implica diversos efectos en el ecosistema (Armesto y Sénaris, 2017). Además, muchas poblaciones remanentes tienen una conectividad limitada, se encuentran en hábitats subóptimos y es probable que tengan una mayor vulnerabilidad a los eventos estocásticos y otros procesos amenazantes (Puschendorf et al., 2011). En consecuencia, se necesitan estudios que contribuyan con información clave para el manejo de poblaciones de anuros y evitar el declive de sus poblaciones.

Uno de los principales factores involucrados en la disminución poblacional de anuros son las enfermedades emergentes como la quitridiomycosis. Esta enfermedad se caracteriza por ser infecciosa y virulenta (Ron, 2005), y es ocasionada por el hongo quítrido *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Aunque su origen sigue en estudio (Goka et al., 2009), se cree que uno de los vectores es el ser humano, quien, a través del manejo de anuros con fines comerciales, ilegales e incluso científicos, ha sido el responsable de su dispersión (Aguirre y Lampo, 2006).

De acuerdo con Berger et al. (1998), *Bd* es un patógeno que coloniza las superficies queratinizadas de los anuros, afectando a las estructuras del disco bucal de los estados metamórficos y causando alteraciones en la epidermis tanto de juveniles como de adultos e incluso llevándolos a la muerte. El hongo quítrido es generalista, por lo que ha llegado a perturbar durante su modo reproductivo a diversas especies de anuros, principalmente aquellas que habitan en cuerpos de agua en su ciclo de vida (Morgan et al., 2007). También se destaca la alta tolerancia ambiental de *Bd*, por lo que se deduce a que tiene un hábitat muy amplio (Ron, 2005). Existen registros de infección en todos los continentes, a excepción de la Antártica. De acuerdo con modelos de distribución, la dispersión se efectúa a través de ranas infectadas, agua con zoosporas o un huésped reservorio que todavía no se ha logrado comprender (Bletz et al., 2017).

El primer caso de quitridiomycosis encontrado fue en ejemplares de *Xenopus laevis* colectados en África en 1938 (Weldon et al., 2004). En 1980 herpetólogos de varios

países registraron disminuciones en las poblaciones de anuros en zonas donde no existía evidencia de efectos antrópicos como la contaminación, la sobreexplotación de especies o la introducción de especies invasoras (Parra et al., 2015). El primer estudio científico de quitridiomycosis cutánea fue conocido en el año de 1998, donde se encontró al hongo patógeno como el responsable de la mortalidad masiva de anuros en Australia y América Central (Berger et al., 1998).

La amplia gama de condiciones bajo las cuales se ha encontrado al hongo quítrido y su alta tasa de detección en los neotrópicos sugiere que *Bd* ocupa una parte importante de las principales regiones naturales de América Central y del Sur. Estudios previos consideran que el patógeno pudo ser diseminado en Sudamérica por la introducción de especies foráneas, como las ranas *Xenopus laevis* y *Lithobates catesbeianus*, las cuales ya han sido reportadas como portadoras del hongo en países como Venezuela, Argentina y Chile, entre otros (Bonaccorso et al., 2003; Hanselmann et al., 2004; Sánchez et al., 2008; Solis et al., 2010; Ghirardi et al., 2011).

En países como Costa Rica, Venezuela, Panamá, Puerto Rico, Argentina, Brasil y Ecuador, desde la década de los 80 se han observado declives en la población de anuros y una alta prevalencia de quitridiomycosis (Longo et al., 2010; Lescano et al., 2013; Guayasamín et al., 2014).

A nivel nacional desde 1998 se registró que esta enfermedad que ataca a los anuros, estaba incidiendo con su estado de conservación en el país (Ron y Merino, 2000), y hasta el momento se han reportado especies positivas en 11 provincias: Pichincha, Orellana, Azuay, Morona Santiago, Napo, Imbabura, Chimborazo, Esmeraldas, Cotopaxi y Tungurahua, en veintisiete especies de anuros tales como: *Agalychnis spurrelli*, *Atelopus exiguus*, *Atelopus sp.*, *Bolitoglossa peruviana*, *Engystomops pretersi*, *Gastrotheca litonensis*, *Gastrotheca pseustes*, *Gastrotheca riobambae*, *Gastrotheca sp.*, *Hyloxalus jacobuspetersi*, *Leptodactylus discodactylus*, *Leptodactylus pentadactylus*, *Leptodactylus rhodomystax*, *Nelsonophryne aequatorialis*, *Osornophryne guacamayo*, *Pristimantis achatinus*, *Pristimantis calcarulatus*, *Pristimantis conspicillatus*, *Pristimantis festae*, *Pristimantis*

*kirklandi*, *Pristimantis lanthanites*, *Pristimantis leoni*, *Pristimantis ockendeni*, *Pristimantis* sp., *Pristimantis waoranii*, *Raebo* cf. *Glaberrimus*; la mayoría de estos hallazgos de puesta terrestre y en zonas entre los 1200 a los 3600 m s.n.m. (Manzano, 2010; Vizcaíno et al., 2013).

En los estudios de ecología, conservación y manejo de vida silvestre, el monitoreo resulta ser indispensable porque permite detectar los cambios ocurridos en las poblaciones, ensambles, comunidades o gremios para comprender sus dinámicas temporales-espaciales (Walker et al., 2000). Sin embargo, es necesario utilizar métodos complementarios de técnicas de muestreo, que implican restricciones como tiempo, dinero, número y experiencia de los investigadores, equipos de mediciones y registros, dificultades taxonómicas y demás imprevistos (Hammond, 1994). Existen varias metodologías para muestrear e inventariar la anfibiofauna, entre estas se encuentran la colecta manual, uso de trampas y observación directa (Maneyro, 2019).

La detección de *Bd* mediante técnicas microscópicas y moleculares a partir de muestras de tejido de anuros es una de las estrategias de diagnóstico más empleadas (Berger et al., 1998; Boyle et al., 2004; Ramírez, 2010; Viáfara et al., 2020). La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido muy utilizada para la detección y cuantificación de organismos como los hongos (Diz, 2020). Se requiere la captura de anuros que podrían o no tener este patógeno para realizar análisis histológicos, desencadenando inconvenientes de muestreo e incluso dispersándolo de manera involuntaria (Aguirre, 2011; Vásquez et al., 2012).

El ADN ambiental (eDNA) es un método para extraer ADN de un ambiente de agua o suelo sin la necesidad de tener contacto directo con el organismo que se pretende estudiar (Taberlet et al., 2012; Ruppert et al., 2019). El ADN ambiental es el ADN que liberan los seres vivos en el ambiente a través del cabello, piel, gametos, heces y otras fuentes (Wilcox et al., 2013; Eiler et al., 2018).

Varios estudios han podido demostrar que el método del ADN ambiental se puede utilizar para detectar organismos que atentan contra la integridad de la diversidad

biológica. Entre estos se encuentra el estudio realizado en lagos del Parque Nacional Cañón de los Reyes en California que logró detectar a *Bd* en muestras de eDNA colectadas un mes antes de la muerte causada por este hongo (Kamoroff y Goldberg, 2017). Otro estudio realizado en Cuba examinó la distribución geográfica de *Bd* mediante muestras ambientales en donde se obtuvo un 60% de resultados positivos para el hongo quítrido en los sitios muestreados de la isla (Cádiz et al., 2019). Asimismo, Julian et al. (2019); lograron detectar a *Bd* mediante muestras ambientales de agua con un 95% de confianza. En Noruega, en el 2017, se detectó ADN de *Bd* en muestras de agua del sudeste, por lo que este estudio resultó útil como método de detección temprana (Norwegian Scientific Committee for food and Environment [VKM] et al., 2019).

Bravo y Moreno (2020), sugieren que la transmisión de este hongo y su enfermedad se relacionan con la implicancia humana mediante el tráfico de anfibiafauna, inadecuadas manipulaciones de anuros durante los estudios científicos, entre otros. Ante esto, lineamientos de manejo que contemplen aspectos ecológicos pueden conseguir que la detección del hongo quítrido, administración de sitios y manejo de especies anuras con mayor riesgo, se realicen de una forma apropiada (Basanta, 2019). Para mitigar los efectos de la quitridiomycosis, (Mutschmann, 2015) sugiere que se debe realizar su correcta identificación. Luego se utilizan métodos antimicóticos o quimioterapéuticos (Hudson et al., 2016). En un estudio realizado por Bosch et al. (2015), combinaron el tratamiento antifúngico (itraconazol) con la desinfección química ambiental, erradicando la infección de *Bd* durante dos años. Knapp et al. (2022), lograron reducir la carga de *Bd* mediante el tratamiento antifúngico, aumentando la supervivencia de los anuros.

## **1.2 Problema de investigación y justificación**

Ecuador, siendo el tercer país con mayor riqueza y abundancia de anuros a nivel mundial (Ron et al., 2021), se está enfrentando a una pérdida considerable de especies de anuros (Velázquez et al., 2008). Estudios realizados acerca del hongo *Bd* en el país demuestran que este patógeno podría representar una amenaza para la integridad de las especies de anfibiafauna (Vizcaíno et al., 2013).

En cuanto al estado de conservación de anfibiofauna del país se han registrado 618 especies de anuros distribuidas en 19 familias y 76 generos, de las cuales 295 especies son endémicas, 205 especies se encuentran bajo alguna categoría de amenaza, 15 especies en peligro crítico (posiblemente extintas), 51 en peligro crítico, 85 en peligro, 50 en la categoría vulnerable, 65 especies se encuentran bajo la categoría casi amenazada, 141 en preocupación menor y 219 en la categoría de datos insuficientes (Jambatu, 2021).

Gascon et al. (2007), considera que la quitridiomycosis afecta a los anuros que habitan en ecosistemas saludables, por lo que la pérdida de especies podría comprometer la integridad de dichos ecosistemas. Asimismo, se conoce que en el país existen escasos esfuerzos para detectar a *Bd* (Merino, 2001; Bonaccorso et al., 2003; Lips et al., 2003; Burrowes et al., 2004) y que el factor antrópico está estrechamente vinculado con presencia de enfermedades emergentes infecciosas como la quitridiomycosis (Lips K., 1999). Hasta el momento se han reportado especies positivas para quitridiomycosis en 19 localidades y 11 provincias, entre las cuales consta Imbabura (Vizcaíno et al., 2013).

El muestreo de poblaciones de especies biológicas es primordial para establecer monitoreos con los cuales se puede conocer el estado de conservación de las especies. En este proceso se realizan manipulaciones que podrían afectar el estado de inmunodepresión de las especies y aumentar la susceptibilidad de la población en estudio a patógenos introducidos o autóctonos (Martín et al., 2007). Como en el caso de los anuros, mientras más largo es el tiempo en cautiverio es más probable que sean expuestos a una gama de virus, hongos o parásitos diferentes a las que normalmente está expuesto en vida libre (Aguirre y Lampo, 2006).

Aunque las estrategias de manejo experimentales están en marcha, hay pocos estudios sobre el manejo in situ de especies de anuros amenazadas por quitridiomycosis (Joseph et al., 2013). Hasta la fecha, el manejo de enfermedades en anuros generalmente se ha enfocado en mitigar la propagación de enfermedades y asegurar colonias cautivas en lugar de restaurar poblaciones después de una

epidemia. Los estudios existentes están dirigidos, en gran medida, a los encargados de la formulación de políticas y a los investigadores, en lugar de estar dirigidos a quienes manejan la vida silvestre in situ (Woodhams et al., 2011). Por lo tanto, se necesitan lineamientos de manejo que apunten directamente a la reducción de la quitridiomycosis en las poblaciones de anuros y que describan estrategias para mejorar la capacidad de amortiguamiento de las poblaciones contra la mortalidad inducida por esta enfermedad.

Una de las técnicas más utilizadas para la detección de *Bd* es la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, que requiere en primera instancia el contacto directo con los individuos de anuros a través de muestreos (Seanna et al., 2004). Por otro lado, se ha demostrado que la técnica de ADN ambiental, además de ser no invasiva, resulta tener un alto potencial para la detección de especies invasoras como el hongo quítrido (Riascos et al., 2018).

En Ecuador no se han realizado suficientes estudios sobre la detección de *Bd* en anuros, y tomando en cuenta que la técnica de ADN ambiental no es invasiva y sobre todo que es efectiva, este estudio busca detectar la presencia del hongo quítrido *Bd* en especies de anuros y cuerpos de agua de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi utilizando eDNA. Asimismo, se busca establecer lineamientos de manejo del hongo *Bd* con el fin de que sirvan como una base de partida para la ejecución de estudios que a futuro puedan implementar acciones preventivas para impedir la incrustación del hongo o reducir su impacto de establecimiento. Dichos lineamientos son un factor clave para la conservación de los anuros de la Reserva y deben considerar el componente social, ecológico y científico para conseguir conjuntamente instrumentos, medidas y herramientas que permitan la aplicación de decisiones en pro de la preservación.

En síntesis, un gran esfuerzo de investigación se necesita hacer con el fin de proponer acciones de manejo in situ. Por lo tanto, es crucial que se realicen intervenciones en campo a partir del conocimiento que se genere para probar soluciones novedosas contra *Bd* in situ. Esta investigación se basa en el Plan de Creación de Oportunidades 2021-2025 porque responde al eje 4 de Transición

ecológica y al objetivo 11 referente a “Conservar, restaurar, proteger y hacer uso sostenible de los recursos naturales”. Por tal motivo se debe considerar la investigación científica, desarrollo e innovación con el contingente de las universidades que respondan a las necesidades referentes a la conservación de la biodiversidad (Secretaría Nacional de Planificación, 2021-2025).

El trabajo está enmarcado en el proyecto de investigación “ADN Ambiental” perteneciente al programa “VLIR-NETWORK” del Laboratorio de Investigaciones Ambientales UTN (LABINAM) con financiamiento internacional.

### **1.3 Objetivos**

#### ***1.3.1. Objetivo general***

Establecer lineamientos de manejo del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* en especies de anuros y cuerpos de agua de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi.

#### ***1.3.2. Objetivos específicos***

- Determinar la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en especies de anuros de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi
- Detectar la existencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en cuerpos de agua de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi utilizando la técnica de ADN ambiental.
- Diseñar lineamientos de manejo de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anuros de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi.

### **1.4 Preguntas directrices**

¿Existe la presencia del hongo *Bd* en anuros y cuerpos de agua de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi?

¿Qué lineamientos de manejo de *Bd* se pueden establecer en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi?

## CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Marco teórico referencial

#### 2.1.1. Taxonomía y características de los anfibios

La palabra “anfibio” proviene del griego y significa animales que pueden vivir indistintamente en tierra o sumergidos en el agua (Hutchinson, 2009). Los anfibios a lo largo de su vida pueden vivir en los dos medios: en el agua, cuando son larvas, y en tierra cuando son adultos (Ballesteros et al., 2019). Sin embargo, algunos pasan toda su vida en el agua y otros nunca abandonan la tierra, son ectotérmicos, pero algunos pueden llegar a tolerar temperaturas corporales muy bajas, y su piel se mantiene húmeda (Manzanilla y Péfaur, 2000). Este grupo de vertebrados pertenecen a la clase Amphibia y está formado por más de 8000 especies divididas en tres órdenes: Anura (ranas y sapos), Caudata (salamandras) y Gymnophiona (cecilias) (Ron et al., 2021).

Según Ballesteros et al. (2019), los anfibios se clasifican taxonómicamente como se muestra en la siguiente tabla (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de los anfibios

<b>Clasificación taxonómica</b>	
<b>Reino</b>	Animal
<b>Phyllum</b>	Chordata
<b>Subphyllum</b>	Vetebrata
<b>Superclase</b>	Tetrapoda
<b>Clase</b>	Amphibia
<b>Orden</b>	Anura
<b>Orden</b>	Caudata
<b>Orden</b>	Gymnophiona

**Fuente:** (Ballesteros et al., 2019)

## **2.1.2. Anuros**

### **2.1.2.1. Etapa larval y metamorfosis**

La importancia evolutiva de la larva está basada en que los anuros llevan a lo largo de su ciclo reproductivo dos tipos de vida diferentes; las larvas son acuáticas y los adultos terrestres, así, larvas y adultos difieren entre sí en sus modos de respiración, locomoción y alimentación. Esto se refleja en su comportamiento y respuestas a los estímulos ambientales, las larvas utilizan dos fuentes de recursos independientes, por ello no compiten con los adultos por alimento o refugio. Por su parte, los anuros sufren una serie de cambios abruptos post-embrionarios denominados metamorfosis, que implica transformaciones estructurales, fisiológicas bioquímicas y comportamentales (Duellman y Trueb, 1986).

Los cambios de la metamorfosis pueden ser clasificados en dos: la primera compuesta de regresión de estructuras y funciones que solo son significativas para la larva, transformaciones de estructuras larvales en formas útiles para el uso del individuo adulto y la segunda que incluye el desarrollo de nuevas estructuras y funciones que son esenciales para el adulto. Los cambios más notorios durante la metamorfosis son los morfológicos, estos se acentúan en los anuros, donde la larva acuática sufre una transformación drástica para convertirse en un adulto terrestre (Muzio, 1995).

Las patas posteriores crecen y maduran, las patas anteriores se desarrollan en las cámaras branquiales, de las que emergen en el último periodo de la metamorfosis. Las branquias internas y los vasos sanguíneos asociados se degeneran mientras se desarrollan los pulmones, la cola es reabsorbida y la piel se hace más gruesa con el desarrollo de glándulas dérmicas. Las estructuras orales de las larvas se degeneran y se forma la boca del adulto, en la que crecen la lengua y las estructuras laríngeas asociadas. También el intestino se acorta y se diferencia el tracto digestivo, a su vez, los ojos se agrandan y sufren cambios estructurales y también se desarrollan los párpados (Muzio, 1995).

### **2.1.2.2. Importancia del agua para los anuros**

Para la mayoría de las especies de anuros el agua es muy importante, pues en esta depositan sus huevos y les permite mantener su piel húmeda, por ello la mayoría vive en ambientes húmedos o acuáticos. El cuerpo de las especies que pasan mucho tiempo en el agua está bien adaptado a la vida acuática, como las ranas que viven en los estanques disponen de dedos palmeados para nadar (Hutchinson, 2009).

Los anuros no ingieren agua por la boca en condiciones naturales, obtienen el agua a través de la piel (Bentley, 1966). El agua es almacenada en la vejiga urinaria, cuyo contenido puede llegar al 30 o 40% del peso del cuerpo en algunos anuros terrestres (Ruibal, 1962). La piel de la mayoría de los anuros es delgada y requiere estar húmeda para mantenerse sana. Además, permite que el agua sea absorbida o resbale sobre ella y permite que el oxígeno penetre en el cuerpo (Hutchinson, 2009).

### **2.1.2.3. Alimentación**

Los anuros tienen un rol muy importante en la cadena trófica biológica, pues son depredadores de insectos e invertebrados. Las larvas de rana son típicamente herbívoras, mientras que los adultos son carnívoros, lo que los expone a una gran diversidad de alimentos, depredadores y parásitos. Por lo general, el género *Batrachyla* se alimenta principalmente de arácnidos, dípteros, himenópteros y crustáceos (Picheira-Donoso, 2002; Díaz-Páez y Ortiz, 2003). Por su parte el género *Bufo* posee diferencias en la dieta entre poblaciones, pues se alimentan de coleópteros, colémbolos, dípteros y efemerópteros, arácnidos, material vegetal y mudas de piel. La clase Cusiverbera tiene un alto consumo de hemípteros y coleópteros, así también las larvas de esta clase se alimentan de algas, donde la mayor parte corresponde a diatomeas, clorófitas, cianófitas y euglenófitas. La clase Pleurodema, se alimenta de diferentes hemípteros, neurópteros, plecópteros, entre otros (Díaz, 2003).

#### **2.1.2.4. Reproducción**

Los anuros poseen escasa capacidad de dispersión por lo que se encuentran muy ligados a sus hábitats de reproducción, esto los convierte en organismos muy sensibles a cambios locales (Lozano y Cadiñanos, 2007).

Para efectuar su apareamiento y reproducción necesitan estar en el agua pues los huevos no poseen cáscara para estar protegidos. Estos están envueltos por una masa gelatinosa que los cubre. Los machos llegan a las charcas donde se van a reproducir y a través de sus cantos y secreción de hormonas logran atraer a las hembras. El apareamiento tiene el nombre de amplexo o abrazo nupcial. El macho se sitúa encima de la hembra y descarga su esperma conforme la hembra arroja los huevos aún sin fecundar cubiertos por una sustancia pegajosa (Beltrán et al., 2016).

La mayoría de las especies tienen una etapa reproductiva que dura alrededor de dos años, estos desovan y sus ciclos de vida constan de dos etapas. Sus huevos solo poseen una pequeña cantidad de yema, pero son incubados hasta desarrollar larvas que viven en el agua (renacuajos) y son muy distintos a los adultos. Posteriormente, las larvas se transforman en adultos con la capacidad de respirar y vivir sobre todo en tierra (Hutchinson, 2009).

#### **2.1.2.5. Importancia ecológica de los anuros**

Los anuros en general toleran muy poco la contaminación del agua, el deterioro del hábitat y la fragmentación de los bosques, por ello son considerados bioindicadores de calidad ambiental de los ecosistemas naturales; incluso los cambios en su composición y abundancia pueden revelar la presencia de sustancias letales para la vida del hombre y el resto de los organismos (Rueda et al., 2004). Su presencia es esencial para la conservación de la biodiversidad, también para poder establecer el microclima de un hábitat (Catalá, 2011). Los anuros contribuyen en la provisión de varios servicios ecosistémicos, tales como: el flujo de energía-materia y el ciclo de nutrientes, que favorecen al bienestar social (Díaz et al., 2019).

De acuerdo con Ballesteros et al. (2019), los anuros son de gran importancia ecológica, porque aportan en los distintos niveles de las cadenas tróficas, lo que contribuye en el mantenimiento de las relaciones funcionales de los ecosistemas. También son depredadores de invertebrados siendo controladores de poblaciones de insectos que podrían convertirse en plaga o ser transmisores de enfermedades (Young et al., 2004). Sin los anuros, los insectos aumentarían su abundancia de manera descontrolada, alimentándose de hojas jóvenes y pondrían en riesgo el crecimiento de nueva vegetación (Herrera et al., 2020). Asimismo, este orden se destaca por su importancia económica, ya que se lo utiliza en la medicina para la extracción de antibióticos, alucinógenos, calmantes de dolor, entre otros (Lips et al., 2001).

#### **2.1.2.6. Estado de conservación de los anuros**

Para conocer el estado de los anuros se efectuó la primera evaluación mundial elaborada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) publicada en 2004, donde se encontró que un 43% de las especies tenían un declive de la población; 7,4% se hallaban en la categoría más alta de riesgo siendo este el nivel más peligroso de un taxón vertebrado relevante; es alarmante debido a que el 22.5% de las especies conocidas en ese entonces (5743) carecían de estudios y no podían ser evaluadas. En los últimos años este problema ha incrementado y la proporción de especies escasamente conocidas se ha elevado (Wake y Koo, 2018). Aproximadamente un tercio de los anuros del Ecuador se encuentran en peligro de extinción, el 56.7% de especies o se encuentran amenazadas o hay datos insuficientes para poder determinar su estado de conservación (Ron et al., 2021).

Las causas de la disminución de poblaciones de anuros son numerosas, y se relacionan con la destrucción del hábitat, tala de bosques, cambio de cobertura vegetal, urbanización y drenaje de humedales. También el uso de pesticidas y fertilizantes y el incremento de temperaturas ambientales y sequías provenientes del cambio climático, y la quitridiomycosis producida por el hongo quitrido *Bd* (Wake y Koo, 2018).

El ciclo vital de los anuros los convierte en seres especialmente sensibles, pues se compone de fases acuáticas como terrestres, por lo que son propensos a sufrir alteraciones que se produzcan en ambos medios. Su piel desnuda y permanente los convierte en seres vulnerables ante la presencia de agentes contaminantes o patógenos (Lebboroni et al., 2006). Sin embargo, los anuros pueden ser el único grupo que actualmente se encuentra en riesgo a nivel global. Una evaluación detallada con base en actualizaciones posteriores muestra que un tercio o más de 6300 especies están en peligro de extinción (Wake y Vredenburg, 2008).

Los primeros indicios sobre el declive de estos animales se revelaron en el First World Congress of Herpetology en el año 1989, donde la comunidad científica advirtió que esta pérdida de anfibiofauna estaba ocurriendo de forma simultánea en diferentes partes del mundo. Luego se realizaron evaluaciones de las poblaciones, observándose que aproximadamente un tercio de las especies estaban amenazadas y que un 43% estaban experimentando alguna forma de disminución poblacional (Stuart et al., 2004).

#### **2.1.2.7. Declive de anuros**

El tamaño poblacional de anuros puede variar de manera natural. Sin embargo, los eventos naturales no explican la rapidez ni la extensión tan amplia de los declives (Stuart et al., 2004). Se han atribuido numerosos factores que favorecen al declive global de este grupo, tales como: la destrucción, alteración y fragmentación del hábitat (Cushman, 2006), la contaminación por químicos (Relyea y Diecks, 2008), la introducción de especies invasoras (Vredenburg, 2004), y la sobreexplotación de especies (Jensen y Camp, 2003). No obstante, existen factores más perniciosos que pueden llegar a hábitats que no han sido alterados como el cambio climático (Pounds et al., 2006), el incremento de radiación ultravioleta-B (Blaustein et al., 2003) y enfermedades emergentes como la quitridiomycosis producida por *Bd* y los Ranavirus de la clase Iridoviridae (Duffus y Cunningham, 2010). También se presentan bacterias, trematodos y oomycetes patógenos como *Saprolegnia ferax* que han sido relacionados con la mortalidad de poblaciones de anuros y la infección

por dermocistidios causante de lesiones cutáneas en forma de quistes o nódulos multifocales (Dopereiro, 2019).

### **2.1.3. Quitridiomicosis**

#### **2.1.3.1. Definición**

La quitridiomicosis es una enfermedad infecciosa en los anuros y provocada por el hongo *Bd*. Puede producir laceraciones en la piel, aturdimiento, pérdida de apetito e incluso la muerte (Berger et al., 2009). Las laceraciones en la piel producidas por el quítrido muestran cambios en el color de la piel (oscurecimiento o decoloración), las puntas de sus dedos se enrojecen y la piel se deteriora en exceso (Berger et al., 2009; Voyles et al., 2011).

La piel de los anuros al verse afectada impide el transporte de sodio en el estrato granuloso de la epidermis, deteriorándola, lo que a su vez altera el transporte de agua, oxígeno y electrolitos primordiales para la osmorregulación (Campbell et al., 2012). Los cambios electrolíticos y la pérdida de sodio, potasio y iones de cloruro conllevan a perjudicar la función cardíaca y por ende provocar un paro cardíaco en los anuros (Voyles et al., 2011; Salla et al., 2018).

La quitridiomicosis ha sido registrada hace poco como la causa del mayor declive de biodiversidad encontrado, autores indican que esta enfermedad ha influenciado en la pérdida de al menos 501 especies de anuros, probablemente provocó la extinción de 90 de estas (Scheele et al., 2019).

#### **2.1.3.2. Hongo quítrido: *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*)**

Se trata de un hongo que causa la enfermedad de quitridiomicosis en anuros, las decadencias locales, regionales y globales de estos animales, indican que *Bd* es uno de los patógenos más catastróficos (Brannelly et al., 2015; Olson et al., 2013; Scheele et al., 2019; Skerratt et al., 2016).

Tedersoo et al. (2018), mencionan que el hongo quítrido pertenece a la División Chytridiomycota, clase Chytridiomycetes y orden Rhizophydiales (Tabla 2).

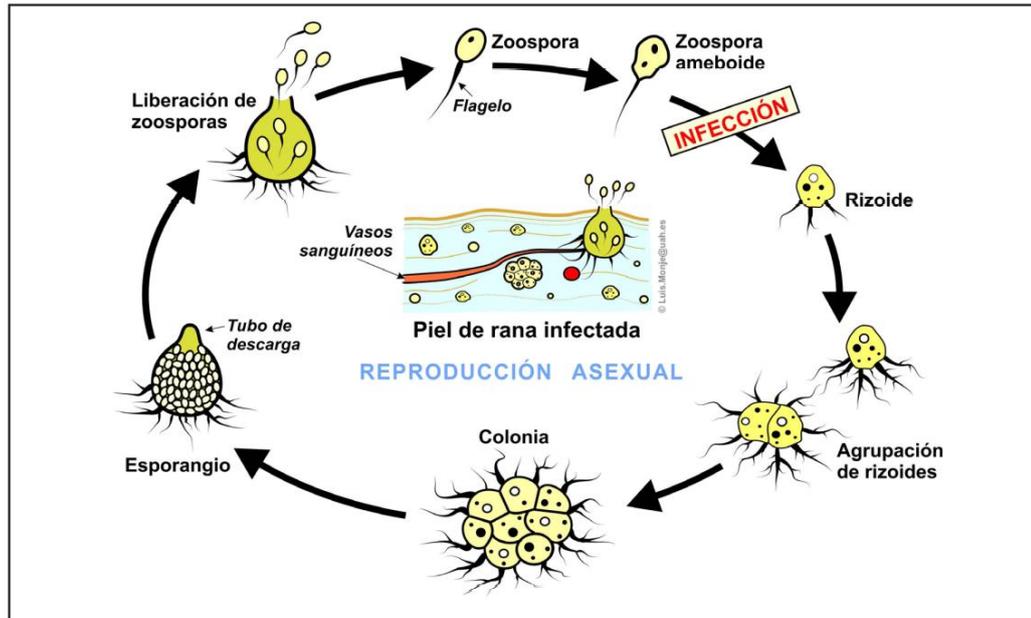
**Tabla 2** Clasificación taxonómica de *Bd*

<b>Clasificación taxonómica</b>	
<b>Reino</b>	Fungi
<b>Division</b>	Chytridiomycota
<b>Clase</b>	Chytridiomycetes
<b>Orden</b>	Rhizophydiales
<b>Genero</b>	<i>Batrachochytrium</i>
<b>Especie</b>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>

**Fuente:** (Tedersoo et al., 2018)

El hongo se presenta de forma esférica y sésil zoosporangio, y zoosporas flageladas móviles, las zoosporas móviles se incrustan en el sustrato desarrollando rizoides que posteriormente originarán a los zoosporangios. Las zoosporas se forman dentro del zoosporangio y son liberadas al ambiente por medio de tubos de descarga (Longcore et al., 1999; Berger et al., 2005; Arnhem y Kiessling, 2006).

Por medio de quimiotaxis las zoosporas hallan un huésped apropiado tomando en cuenta factores quimiotácticos como la queratina o sus componentes, las zoosporas crean quistes de paredes gruesas que se incrustan en las células epidérmicas con diminutas proyecciones fibrilares y rizoides (Van Rooij et al., 2015) (Figura 1).



**Figura 1.** Estadios morfológicos de *Bd* que terminan en la formación de nuevas zoosporas

**Fuente:** (Bravo y Moreno, 2020)

El hongo quitrido para formar una infección depende del epitelio escamoso estratificado queratinizado, los anuros adultos pueden infectarse en diferentes partes de su cuerpo, mientras que los renacuajos padecen la infección únicamente en donde tienen una capa queratinizada, las piezas bucales o discos orales (Pessier et al., 1999; Smith, 2013).

#### 2.1.4. Técnica de ADN ambiental (eDNA)

##### 2.1.4.1. Definición

El ADN, es el material hereditario que se encuentra presente en todos los seres vivos. La estructura química del ADN es igual para todos los organismos, sin embargo, existen diferencias en el orden de los bloques de construcción del ADN; estos se denominan pares de bases y brindan información para diferenciar a unos de otros. Existen más copias de ADN mitocondrial que ADN nuclear y la mayoría de las investigaciones se basa en detectar el ADN mitocondrial (Pilliod et al., 2013).

El ADN ambiental (eDNA) es ADN que es liberado por un organismo al ambiente, las fuentes de eDNA contienen heces, fluidos, mucosas, piel y cabello, cuerpos en descomposición y se localiza en forma celular o extracelular, se puede extraer directamente del suelo, agua y aire, sin la necesidad de estar presente el organismo.

En ambientes acuáticos el eDNA se disuelve mediante procesos hidrológicos y perdura por aproximadamente 7-21 días dependiendo de las circunstancias del lugar (Dejean et al., 2011; Pilliod et al., 2013; Wilcox et al., 2013; Eiler et al., 2018). La exposición hacia factores como la radiación UV, acidez, Ph, alcalinidad, clorofila, entre otros, pueden conllevar a la pérdida del eDNA (Pilliod et al., 2013).

#### **2.1.4.2. Uso de eDNA en el monitoreo de especies**

Los protocolos que utilizan eDNA ayudan a recopilar datos de manera más rápida, rentable y generalizada acerca de la distribución de especies, por ello se considera que la detección de especies empleando eDNA lograría optimizar los estudios de biodiversidad y facilitar información en cuanto al estado, distribución y hábitat de especies poco conocidas (Pilliod et al., 2013). El uso de eDNA tiene ventajas sobre la detección de especies nativas, por lo que se han realizado varias publicaciones al respecto (Herder et al., 2014).

En los últimos años, los métodos de ADN ambiental (eDNA) han demostrado su capacidad para detectar especies acuáticas ya sean nativas o exóticas, como un estudio realizado por Secondi et al. (2016), donde se detectó a *Xenopus leavis* en estanques, con una densidad tan baja como 1 ind / 100 m<sup>2</sup>. Además, encontraron una relación positiva entre la densidad en los estanques y la tasa de amplificación del ADN y dedujeron que se puede aplicar con éxito eDNA en el estudio de poblaciones invasoras de *X. leavis*, incluso a baja densidad con el fin de confirmar casos sospechosos de introducción, delimitar la expansión de un rango colonizado o monitorear la eficiencia de un programa de control.

El estudio realizado por Spitzen-van der Sluijs et al. (2020), logró detectar de manera rápida, temprana y confiable al patógeno invasor *Bd* en cuerpos de agua de los Países Bajos. Se detectaron tritones infectados con este microorganismo en el

2015, y se han monitoreado desde entonces hasta el 2018, mediante lo cual se pudo validar esta técnica *in situ*, lo que permitió cumplir con el objetivo de probar el potencial del muestreo de eDNA para la delimitación del rango *Bsal* y demostrar que esta técnica se puede aplicar para detectar *Bsal* en agua estancada. También permitió probar el método de detección temprana de dicho hongo en la mortalidad masiva de salamandras de fuego (*Salamandra salamandra*) en Europa.

Kamoroff y Goldberg (2017), recolectaron eDNA usando muestras de agua filtrada de 13 lagos en el Parque Nacional Cañón de los Reyes. Siete de esos sitios tenían poblaciones de ranas montañeras de patas amarillas, caracterizadas por su susceptibilidad a la quitridiomycosis, y 3 de esas poblaciones experimentaron una muerte relacionada con *Bd* un mes después del muestreo mediante eDNA. De esta manera se detectó al *Bd* un mes antes de la muerte causada por este patógeno en los 3 sitios registrados, mientras que en los que no hubo detección del quitrido no se observó muerte. Este estudio indica el potencial de utilizar técnicas de eDNA para la detección temprana de *Bd* en el medio ambiente.

Igualmente, en el estudio realizado por Barnes et al. (2020), en Texas, siguieron los métodos de Barnes et al. (2014), a través de ensayos para la vigilancia de los patógenos anuros *Bd* y Ranavirus, recolectaron muestras de agua de cinco lagos de playa urbanos y un embalse de Lubbock y sus alrededores y utilizaron los métodos de PCR cuantitativa (qPCR) descritos por Kamoroff y Goldberg (2017), y Hall et al., (2016), respectivamente. Así, el método de ADN ambiental resultó exitoso y una opción novedosa y complementaria para el monitoreo de patógenos que atentan contra la integridad de anuros.

#### **2.1.4.3. Detección de especies invasoras**

Uno de los grandes inconvenientes para la eliminación de especies invasoras es el conflicto de lograr identificarlas en fases larvianas y juveniles, resultando en un gran inconveniente ya que pasan imprevistas, obstaculizando su exterminio cuando son adultos reproductores. El eDNA brinda una detección temprana, ayuda a identificar ADN incluso si la muestra total posee un porcentaje menor al 0.5% (Pochon et al.,

2013). También posee la facultad de identificar diferentes taxones a la vez y se puede emplear en aguas dulces y saladas. Sin embargo, se debe tomar precauciones al momento de interpretar los resultados guiándose de información relevante de presencia/ausencia de especies (Hatzenbuehler et al., 2017).

#### **2.1.4.4. Positivos y negativos usados en eDNA**

Los estudios con eDNA requieren controles positivos y negativos para confirmar los resultados en cada etapa del estudio. Pilliod et al. (2013) menciona que los controles negativos, consisten en una muestra libre de ADN para detectar una posible contaminación. Además, la reacción de PCR deberá incluir un control positivo (muestras que contiene el ADN de la especie de estudio) para asegurar que la reacción no fue errónea.

#### **2.1.4.5. Tiempo para monitorear especies**

Es importante conocer la ecología y el ciclo de vida de la especie en estudio; como el tiempo de reproducción, ya que esta valiosa información ayudaría a elaborar un plan de muestreo o monitoreo basado en eDNA con mayores posibilidades de detección (Pilliod et al., 2013).

#### **2.1.4.6. Ciclos y replicación en la PCR con el eDNA**

Los estudios con eDNA suelen incrementar el número de ciclos de PCR (a más de 50) a diferencia del ADN tradicional (Dejean et al., 2011; Goldberg et al., 2011; Herder et al., 2014) esto se debe a que:

1. El eDNA se comporta de manera extraña al ADN normal y un menor número de ciclos puede aumentar el riesgo de “perder” el ADN objetivo. Sin embargo, Herder et al. (2014) advierte que al incrementar el número de ciclos también aumenta la posibilidad de encontrar falsos positivos.
2. Las probabilidades de que la PCR falle debido a que los cebadores no se unan al ADN objetivo por las bajas concentraciones en la que este puede encontrarse.

El número de réplicas de PCR a partir de una misma muestra de ADN varía en las investigaciones con eDNA, en su mayoría se utilizan 3 réplicas por muestras (Ficetola et al., 2008). Otros estudios utilizan hasta 12 réplicas por muestras (Biggs et al., 2015; Herder et al., 2014). Los resultados obtenidos en las PCR con eDNA, dan como resultado positivo a la amplificación de una de las réplicas (Herder et al., 2014).

#### **2.1.4.7. Normas de seguridad con el eDNA**

Herder et al. (2014) han postulado el uso de las siguientes normas de seguridad para trabajar con eDNA:

1. Los diferentes pasos (toma de muestras, extracción, controles, PCR) deberán poseer áreas separadas para evitar contaminaciones y de ser posible tener cuartos con descontaminación UV.
2. Las condiciones ambientales del muestreo (agentes externos) donde se encuentra la especie objetivo, pueden afectar los resultados dando falsos resultados, para asegurar la credibilidad de la investigación. En lo posible, se sugiere comparar el monitoreo de eDNA con otro tipo de monitoreo que puede basarse en la observación o la captura del animal (Twardochleb et al., 2013).
3. De acuerdo con la distancia del punto de muestreo, el transporte y conservación de las muestras es un factor muy importante para tomar en cuenta, debiendo usar aditivos (como hielo) o preservantes que mantengan el ADN presente en la muestra evitando su degradación.

#### **2.1.5. Lineamientos de manejo**

Los lineamientos de manejo se refieren al acceso que tienen las personas a un recurso, quiénes y de qué manera lo usan y quiénes y cómo lo administran. La administración de los recursos naturales se relaciona con su cuidado, regulación y reparto o distribución (Cahuasqui, 2019). Vasconcelos, (2009) define a los lineamientos como la descripción de etapas, fases, pautas necesarias para

desarrollar actividades o tareas específicas y pretenden servir de orientación y ayuda para usar, manipular o dirigir algo cuyo empleo requiere cuidado.

Además, el diseño de lineamientos tiene la ventaja de que cuando estos conocen los resultados de la evaluación y toman conciencia de que es una percepción compartida, puede propiciarse en ellos la reflexión y como consecuencia de estas, se podrán en conjunto diseñar acciones para mejorar la conservación (Romero, 2018). Los lineamientos de manejo se proponen con el fin de brindar una base científica y técnica que contribuya al proceso de planificación e implementación de pautas para el manejo de los recursos naturales (Kandus y Minotti, 2018).

## **2.2. Marco Legal**

El presente estudio se ha basado en la siguiente política considerando la legislación vigente:

### ***2.2.1. Constitución de la República del Ecuador 2008***

De acuerdo con la Constitución de la República del Ecuador (2008). En particular, las disposiciones del Título II, Derechos, Capítulo Segundo Derechos del Buen Vivir, Sección II Ambiente Sano: en su Art 14 menciona: Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, Sumak Kawsay. Se declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados.

### ***2.2.2. Convenio de la Diversidad Biológica (CDB)***

El presente convenio tiene como objeto la conservación de la diversidad biológica, la utilización sostenible de sus componentes, y la participación justa y equitativa en los beneficios de la utilización de los recursos genéticos y teniendo en cuenta todos los derechos sobre esos recursos y tecnologías apropiadas, promoviendo medidas que conduzcan un futuro sostenible. Esta investigación se sustenta en el Art. 7.

Sobre la identificación y seguimiento, literal b, que se refiere a la procedencia adecuada a la diversidad biológica mediante muestreo y otras técnicas y el seguimiento de los componentes de la diversidad biológica identificados, con especial atención a los que requieren la adopción de medidas urgentes de conservación (Naciones Unidas, 1992).

### ***2.2.3. Reglamento al Código Orgánico del Ambiente***

En conformidad con el Reglamento al Código Orgánico del Ambiente (RCOA) (2019). Se expresa en el Art. 82 la importancia ecológica, social, cultural o económica que poseen las especies de Vida silvestre. También el Art. 87 sobre el deber estatal de protección, menciona que “Todas las especies de vida silvestre están protegidas por el Estado. Las especies nativas, endémicas, amenazadas o migratorias tendrán un grado mayor de protección”.

La conservación de la biodiversidad se realizará ex sito o in situ, en función de sus características ecológicas, niveles de endemismo y categoría de amenaza; por ello el Art. 95, sobre los Instrumentos y medidas de protección, expresa que “La Autoridad Ambiental Nacional, en coordinación con las autoridades competentes, identificará las especies o grupos de especies de vida silvestre y sus ecosistemas, sobre los cuales se establecerán instrumentos o medidas preventivas o precautorias para su protección, conservación y uso sostenible, incluyendo: vedas; planes de acción; herramientas de monitoreo; medidas de bioseguridad para actividades que puedan causar impactos adversos en la vida silvestre; mecanismos de conservación; y otras que la Autoridad Ambiental Nacional determine”.

El Art. 198 sobre manejo de especies invasoras, destaca que se entenderá al manejo de especies invasoras como el conjunto de actividades que permitan la gestión de especies que generen impactos sobre el ambiente, la salud o la economía, por invasiones biológicas. Además, menciona que las estrategias contempladas para el manejo de estas especies son: mitigación; contención; control; erradicación; y otras que determine la Autoridad Ambiental Nacional.

#### ***2.2.4. Plan de Creación de Oportunidades 2021-2025***

La presente investigación se fundamenta en el objetivo 11 del Plan de creación de oportunidades 2021-2025, que plantea conservar, restaurar, proteger y hacer uso sostenible de los recursos naturales, de este modo se considera a la investigación, desarrollo e innovación para responder a las necesidades de conservación de la biodiversidad (Secretaría Nacional de Planificación, 2021-2025).

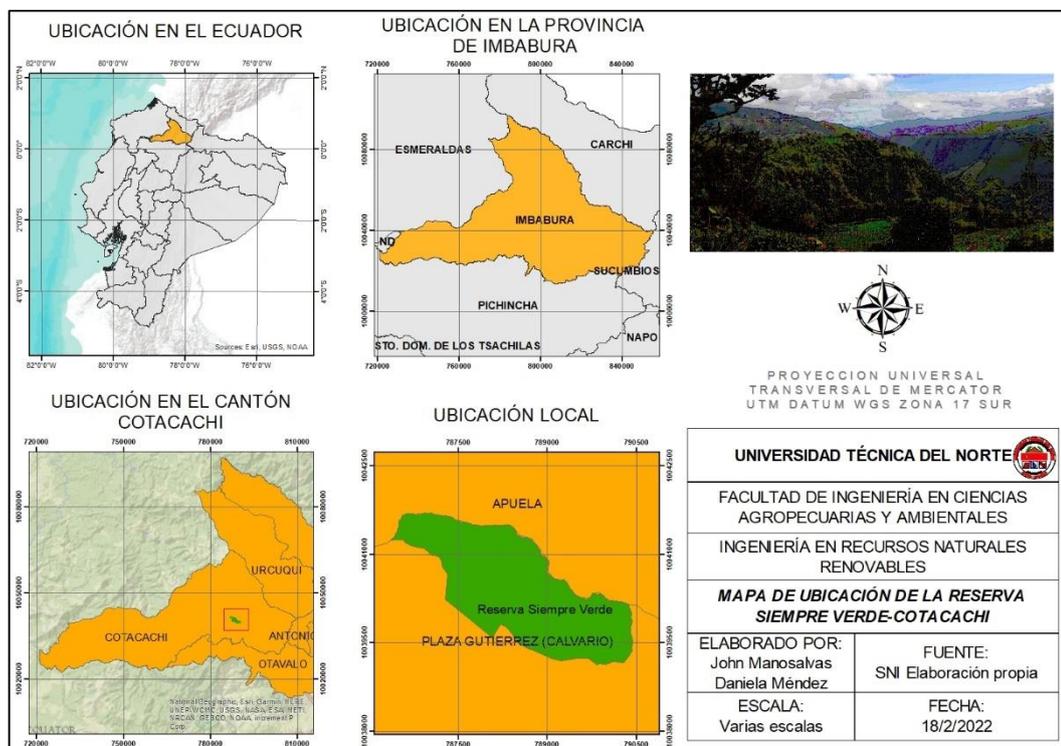
## CAPITULO III

### METODOLOGÍA

#### 3.1. Área de estudio

El presente estudio se realizó en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi, perteneciente al cantón Cotacachi de la provincia de Imbabura. En el área de estudio se seleccionaron sitios óptimos con presencia de anuros, los cuales fueron elegidos para realizar muestreo de acuerdo con cercanías con cuerpos de agua, tales como el río, arroyos y estanques.

En la Reserva Siembre Verde-Cotacachi se registra la presencia del bosque nuboso. Esta se encuentra ubicada en la parroquia de Plaza Gutiérrez, al sur del río Toabunche (Figura 2). Se extiende en un área de 503 ha, tiene una temperatura anual que oscila entre 12 a 27 °C., y presenta un rango de elevación entre 1981 y 3252 m s.n.m. (Lovett, 2008).



**Figura 2.** Mapa de ubicación de la Reserva Siempre Verde

### 3.2. Métodos

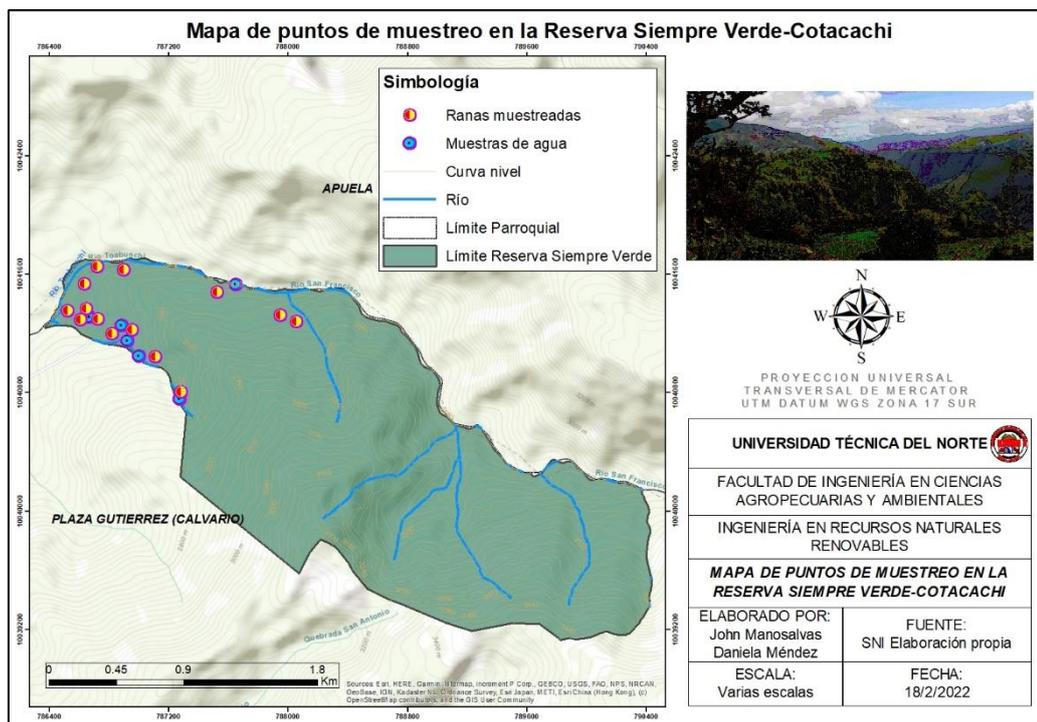
Para llevar a cabo cada objetivo planteado en esta investigación se emplearon varios métodos sustentados en la revisión bibliográfica de diferentes autores. En esta sección se siguió la metodología descrita a continuación:

#### 3.2.1. Determinar la presencia de *Bd* en especies de anuros de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi.

##### 3.2.1.1. Toma de muestras en campo y estudio de *Bd* en el laboratorio

- **Puntos de muestreo**

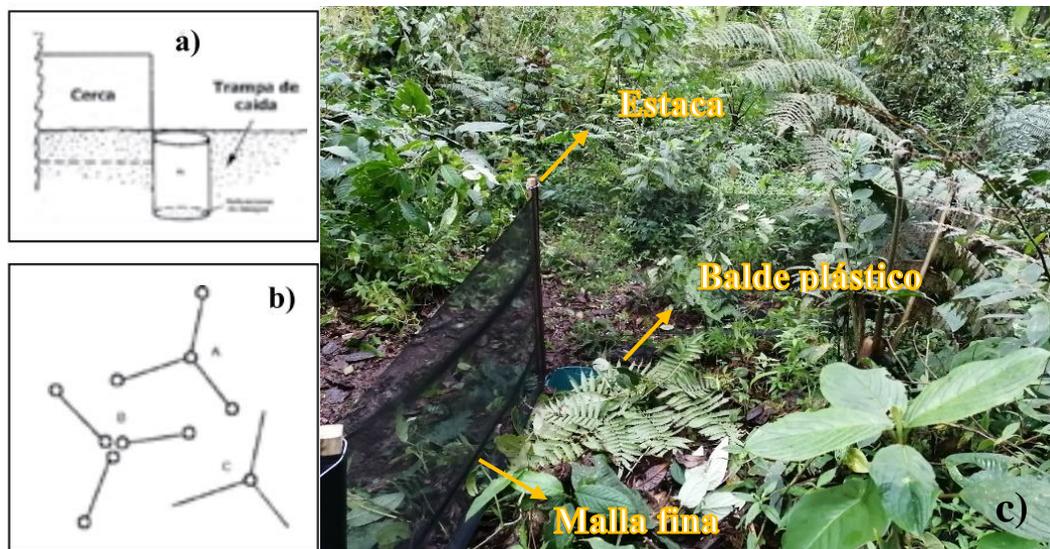
Los puntos de muestreo donde se realizó esta investigación fueron tomados en la zona norte de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi por ser la zona más húmeda y lluviosa del sitio (Figura 3).



**Figura 3.** Mapa de puntos de muestreo en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi

### 3.2.1.2. Trampas de Caída (Pitfall).

Las trampas utilizadas para la captura de individuos de anuros en la búsqueda de *Bd* fueron elaboradas de acuerdo con el método de muestreo indirecto a partir del modelo propuestos por Ballesteros et al. (2019), el cual propone lo siguiente: Se trata de colocar barreras o cercas cortas que interceptan a los animales y los conduzcan a una trampa de caída o de puerta unidireccional ubicadas en los extremos de la cerca (Vogt y Hine, 1982). Se utilizaron cercas con una longitud de 3m y una altura de 1m, se implementaron 3 de estas trampas con el diseño tipo C propuestos por Ballesteros et al. (2019) (Figura 4).



**Figura 4.** Construcción a) y diseño de trampas de caídas y sus cercas de desvío, b) Tipos de trampas de caída según Ballesteros et al. (2019). c) Derecha: Registro fotográfico de una trampa de caída con el diseño tipo C.

**Fuente:** (Ballesteros et al., 2019)

Corn (1994), menciona que este método es eficiente para capturar anuros terrestres de los hábitos fosoriales y comportamiento discreto, aunque algunos autores sugieren que también pueden ser utilizadas para coleccionar especies de hábitos acuáticos e incluso arborícolas. Este método requiere herramientas tales como palas, láminas rígidas y resistentes, de poco peso y volumen (Dodd y Scott, 1994). Para la elaboración de estas trampas se utilizaron mallas delgadas sujetas en sus extremos con estacas y baldes plásticos de 5 galones.

### 3.2.1.3. Observación directa

Es un método seleccionado por el tiempo límite que requiere la realización del presente estudio. Este consistió en inspeccionar el sitio de muestreo e identificar a todos los individuos de anuros que se observen en cada recorrido (Mustelier et al., 2016). Se realizaron recorridos diurnos y nocturnos por los senderos de la Reserva en sitios cercanos a cuerpos de agua. Este método se complementó con la captura de anuros directa a través de redes de mano (20 x 20 cm) (Muñoz et al., 2018). Se tomaron muestras de los individuos de anuros capturados *in situ*, por medio de hisopos estériles, para ello se pasó el hisopo de 10 a 12 veces a través de la zona pélvica y de 3 a 5 veces entre los dígitos de los dedos, haciendo que el individuo agarre el hisopo (Figura 5). Cada hisopo fue etiquetado y situado en su respectivo tubo con solución Buffer (600  $\mu$ L) (Pessier y Mendelson, 2017). Las ranas fueron liberadas inmediatamente en el sitio de captura después de frotar.



**Figura 5.** Hisopados de piel en anuros muestreados mediante metodologías de observación directa y captura con redes de mano

*Nota.* El gráfico representa: a) Hisopado en dígitos de un anuro. b) Tesistas sujetando las redes de mano y un cooler. c) Muestreo de anuros por el método de observación directa. d) Hisopado en pelvis de un anuro.

Posteriormente, las muestras que se obtuvieron por medio del hisopado fueron llevadas en tubos Eppendorf de 1.5ml en cadena de frío al Laboratorio de Investigaciones Ambientales (LABINAM) de la Universidad Técnica del Norte. Con este material se pudo posteriormente identificar al hongo.

#### **3.2.1.4. Identificación taxonómica de los anuros muestreados**

Las especies de anuros encontradas en la investigación fueron identificadas mediante fotografías, con la ayuda del Dr. Mario Yáñez, investigador agregado del Instituto Nacional de Biodiversidad (INABIO). Además, varios datos de cada especie como hábitat, descripción, distribución se obtuvieron del repositorio de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador mediante la base de datos Bioweb Ecuador.

La determinación de la presencia de *Bd* en especies de anuros se realizó mediante los siguientes protocolos de trabajo en laboratorio:

#### **3.2.1.5. Protocolos de aislamiento de ADN a partir de muestras de *Bd***

En el laboratorio, se utilizó el protocolo descrito por Geerts et al. (2018) con modificaciones descritas a continuación:

1. A partir de los tubos que contienen los hisopos se procedió a mezclar 600  $\mu$ L de Solución de Tejido y Lysis Celular (Buffer) con 8  $\mu$ L de Proteínasa K (50 g/ $\mu$ L) seguido de vórtex por 5 minutos.
2. Todos los tubos con las muestras se incubaron a 65 °C por 30 minutos, mezclando en el vórtex de 3 a 5 segundos cada 10 minutos.
3. Con una pipeta se retiró todo el líquido de cada tubo, y se transfirió a otro Eppendorf estéril de 1,5 ml. El tubo Eppendorf con el hisopo fue desechado.
4. Se realizó un vórtex de 5 segundos y posteriormente los tubos fueron incubados a 37 °C por 10 minutos en el termobloque.

5. Los tubos Eppendorf con las muestras fueron colocados en el congelador (-10 °C) durante 5 minutos.
6. Se añadió 175 µl de MPC (Protein Precipitation Reagent) a cada muestra y se realizó un vórtex riguroso a máxima velocidad por 10 segundos.
7. Se centrifugó los tubos con las muestras a 13000 RPM por 10 minutos a 4 °C.
8. Después de la centrifuga se obtuvo un Pellet y un Sobrenadante. El Sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 ml, y el Pellet con el tubo se lo desechó.
9. Al sobrenadante en el tubo Eppendorf se agregó 300 µl de isopropanol frío y se invirtió el tubo a mano de 30 a 40 veces.
10. Se centrifugó el nuevo tubo Eppendorf a 13000 RPM durante 10 minutos a 4 °C.
11. A continuación, se obtuvo un Pellet y un Sobrenadante, cuidadosamente se pipeteó el sobrenadante (isopropanol) y se lo desechó, todo esto sin que el pellet se despegue.
12. Se añadió 300 µl de etanol frío al 70% y se invirtió los tubos de 30 a 40 veces con cuidado que no se despegue el pellet y se realizó un centrifugado a 13000 RPM de 30 segundos a 1 minuto.
13. Con una pipeta se removieron los restos de etanol.
14. Se añadió 40 µl de agua ultrapura y se almacenaron a -20 °C para conservar la calidad de las muestras.
15. Para la electroforesis en gel de agarosa, se preparó 50 ml de TBE al 0,5x, con 5 µL de Sybr safe/Green y agarosa ultrapura al 1% (0,50 g).
16. Se utilizó el microondas para la mezcla de la agarosa y TBE, luego se colocó la mezcla en un molde con un peine para crear los pocillos donde el ADN fue depositado.
17. Después de que el gel quede solidificado, se retiró el peine y el gel se colocó dentro de la cámara de electroforesis, se añadió TBE 0,5x hasta cubrir el gel.
18. Para cargar el ADN en el gel, se mezcló 3 µL de ADN con 1,5 µL de loading dye de la casa comercial Invitrogen.

19. Para correr el gel se utilizó una cámara de electroforesis (Mupid One) a 100 V por 30 minutos.
20. Los resultados fueron visualizados en un transiluminador (pp. 566-568).

#### **3.2.1.6. Cebadores específicos de la especie en muestras de tejido**

Los cebadores específicos utilizados en la investigación fueron diseñados por Annis et al., (2004). Amplifican la región ITS1 (146 bp) del ADNr 5.8S. La PCR se realizó en un gradiente de nexo Mastercycler (Eppendorf), el siguiente máster mix se usó en la investigación: 5 µL TaqMan Environmental Master Mix, 0.6 µL de cada cebador, 2.6 µL de agua esterilizada MilliQ y 1.2 µL de ADN de cada muestra, obteniendo un volumen final de 10 µL.

Las temperaturas establecidas para la PCR en muestras de hisopos con Taqman® Environmental Master Mix según Annis et al., (2004) con modificaciones fueron: un ciclo de 93 °C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de 93 °C por 45 segundos, 55 °C por 45 segundos y 72 °C por 1 minuto y un ciclo final de 72 °C por 10 minutos (Tabla 3).

#### **3.2.1.7. Secuenciación de MACROGEN**

Para secuenciar los productos PCR se enviaron los productos para su posterior purificación a la empresa MACROGEN. Cada muestra se envió en un tubo Eppendorf de 1,5 ml con 20 µl de ADN a una concentración de 40 ng/µl. Adicionalmente, se envió uno de los dos cebadores. Los resultados de la secuenciación fueron tratados en la base de datos de Genbank, mediante el programa BLAST para comparar el porcentaje de identidad.

**Tabla 3.** Características de los cebadores utilizados durante la PCR de las muestras de hisopos

Nombre	Código	Secuencia (5'-3')	Objetivo	Objetivo de BP	Condiciones de PCR	Temperatura de recorrido (°C)	Especies objetivo
<b>Bd_fw.2</b>	Bd_fw	CAGTGTGCC ATATGTCAC G	ITS1	146	10' 93 grados Celsius, 35x (45" 93 grados Celsius, 45" 55 grados Celsius, 1' 72 grados Celsius), 10' 72 grados Celsius	55	Fungus <i>(Batrachochytrium dendrobatidis)</i>
<b>Bd_rv.2</b>	Bd_rv	CATGGTTCA TATCTGTCC AG					

*Nota.* Esta tabla muestra los cebadores que se utilizaron y las condiciones de PCR en el termociclador para las muestras de hisopos.

**3.2.2. Detectar la presencia de *Bd* en cuerpos de agua de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi utilizando la técnica de ADN ambiental.**

**3.2.2.1. Toma de muestras y aislamiento de ADN**

En cada punto de muestreo, las botellas se enjuagaron con agua destilada (autoclave) antes de realizar el muestreo. En el río, se llenaron dos botellas de agua de 1500 ml en un rango de 50 metros. Cada una de las botellas se completó mediante la agrupación de 10 muestras de 150 ml tomadas a lo largo de cada tramo.

En los estanques (estanque grande y estanque pequeño) se recogieron 4 muestras de 1000 ml de agua en un rango de 5 metros. Posteriormente, en cada uno de los tres riachuelos se tomaron 1000 ml de agua en un rango de 5 metros. Completando así 6 puntos de muestreo en la zona (Figura 6).



**Figura 6.** Toma de muestras ambientales de agua en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi

*Nota.* El gráfico muestra: a) Toma de muestras de agua en el río Toabunche. b) Toma de muestras de agua en estanques. c) Toma de muestras de agua en riachuelos. d) Tesistas con muestras ambientales en trabajo de campo in situ.

Con el fin de evitar la contaminación todos los materiales utilizados para la toma de muestras de eDNA (botellas, tijeras y otros) fueron esterilizados en una solución de hipoclorito de sodio (1/5 de cloro comercial 10%) durante una hora; y se enjuagaron con agua destilada. Para evitar la contaminación de ADN ambiental se utilizaron nuevos guantes y prácticas de limpieza durante cada muestreo. Se utilizó un cooler con elementos de refrigeración para la preservación de las muestras; las botellas de muestreo se cubrieron con bolsas Ziploc para etiquetar cada punto de muestreo.

En el laboratorio, dentro de las 6 horas después del muestreo, las muestras de agua se filtraron a través de filtros de nitrocelulosa (0,45  $\mu\text{m}$  del tamaño del poro y 47 mm de diámetro). De las muestras de los ríos se filtraron 800 ml de agua y de los estanques y riachuelos se filtraron 500 ml de agua. Los filtros se dividieron por igual en 4 tubos Eppendorf de 1,5 ml para el proceso de extracción de ADN. A continuación, se siguió el protocolo de aislamiento de ADN descrito previamente en el numeral 3.2.1.5.

### **3.2.2.2. Desarrollo de primer y PCR para muestras ambientales**

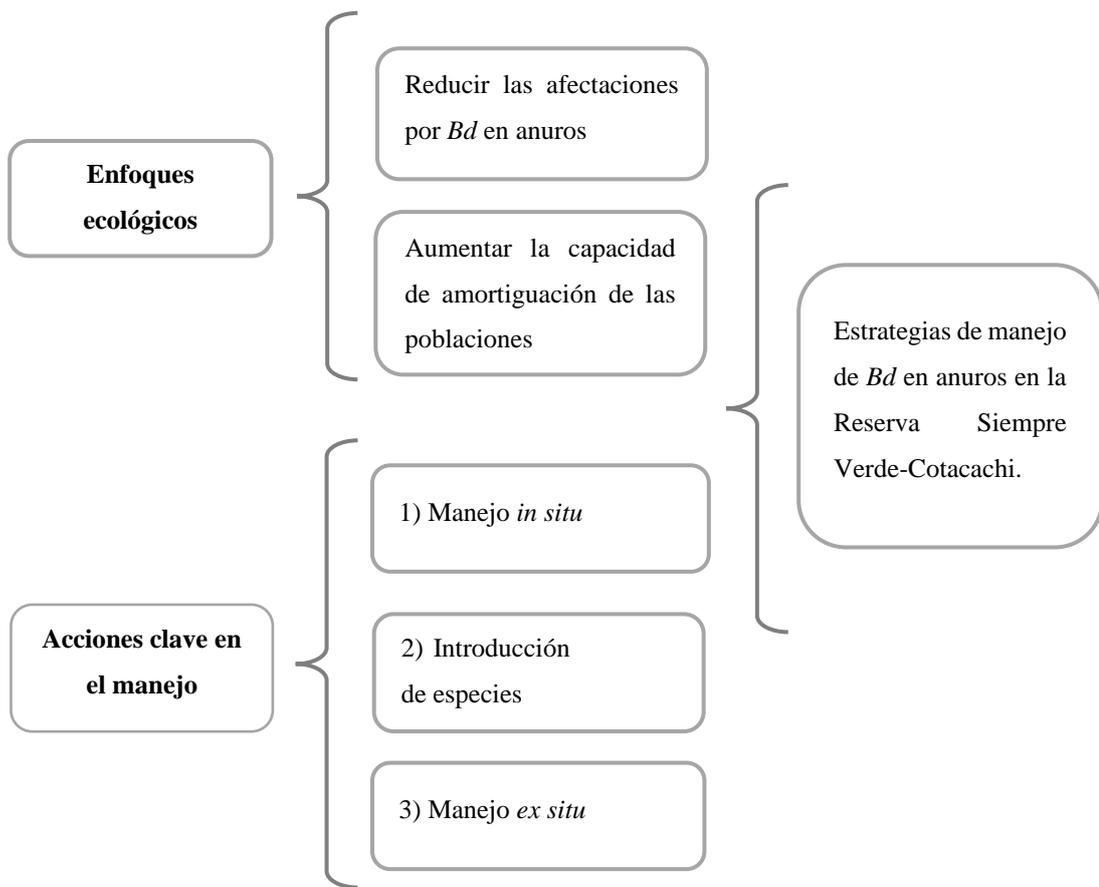
Se utilizaron los mismos cebadores específicos y condiciones de PCR para *Bd* descritos en la Tabla 3 antes citada. Se analizaron tres réplicas de PCR con el ADN aislado de cada punto de muestreo. Durante la PCR se utilizó un control positivo y un control negativo. El control positivo consistió en ADN extraído previamente y probado de *Bd*. La PCR se realizó en un gradiente de nexo Mastercycler (Eppendorf). El Taqman<sup>®</sup> Environmental Master Mix 2.0 se utilizó en todas las reacciones. Para verificar los resultados de amplificación se cargaron muestras (producto de PCR de 10  $\mu\text{L}$  y 2  $\mu\text{L}$  ladder) en un gel de agarosa al 1.5% con una escalera de 100 bp (Invitrogen). El ADN se visualizó con un transiluminador de luz azul (Thermo Fisher Scientific). Si las muestras indican una banda de 146 bp, la amplificación del ADN de *Bd* se considera exitosa. Los resultados sólo se toman en cuenta si el control positivo reacciona positivamente, y el control negativo

reacciona negativamente. Finalmente, para secuenciar los productos PCR se realizó el mismo procedimiento descrito en el numeral 3.2.1.7.

### ***3.2.3. Diseñar lineamientos de manejo de Bd en anuros en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi.***

El diseño de los lineamientos se enfocó en un marco de trabajo conceptual que permite realizar acciones de manejo que se pueden implementar de inmediato en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi. Estas acciones permitirán mantener y conservar las poblaciones de anuros que han experimentado afectaciones por *Bd*. Por lo tanto, para el diseño de los lineamientos se consideraron dos enfoques ecológicos, los cuales fueron: i) Reducir las afectaciones por *Bd*, y ii) Aumentar la capacidad de amortiguación de las poblaciones de anuros (Figura 7). Estos dos enfoques son considerados por varios autores como prioritarios para obtener resultados en el corto plazo (McMahon et al., 2013; Rohr et al., 2013; Viáfara et al., 2020), porque brindan una mayor claridad para establecer objetivos de conservación y guían la práctica de manejo de especies amenazadas por quitridiomycosis (Heard et al., 2013; Joseph et al., 2013; Phillott et al., 2013).

Por consiguiente, en este trabajo, y con base en cada enfoque, los tres tipos de acciones clave en el manejo y conservación de vida silvestre: manejo in situ, introducción de individuos y manejo ex situ (Briggs et al., 2010; Phillott et al., 2013), y la necesidad actual en el área de estudio, se propusieron diferentes estrategias de manejo (Figura 7). A partir de este marco de trabajo conceptual y desde un sustento científico de manejo se proponen estrategias que se pueden adaptar localmente, y que constituyen una solución ampliamente aplicable para mantener y recuperar poblaciones de anuros afectados por *Bd*. Además, los lineamientos de manejo proporcionan un protocolo de bioseguridad para el muestreo y curación de anuros durante el desarrollo de enfermedad.



**Figura 7.** Marco de trabajo conceptual para diseñar lineamientos de manejo de *Bd* en anuros en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi.

## CAPÍTULO IV.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Detección de *Bd* en especies de anuros de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi

##### 4.1.1. Muestreo de anuros en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi

Se capturaron 14 individuos de anuros mediante el método de búsqueda directa y red de mano. Estas capturas se distribuyeron a lo largo de la zona de estudio e implicaron 144 horas de muestreo. Los anuros fueron encontrados a una altitud entre 2 335 y 2 493 m s.n.m (Anexo 1). De los 14 individuos, 12 pertenecen a la familia Strabomantidae y dos a la familia Hylidae. La especie más abundante fue *Pristimantis actites* con diez individuos, seguida de *Dendropsophus carnifex* con dos individuos, *Pristimantis hectus* y *Pristimantis sp.* con un individuo cada una (Tabla 4).

**Tabla 4.** Identificación taxonómica de los anuros muestreados en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi

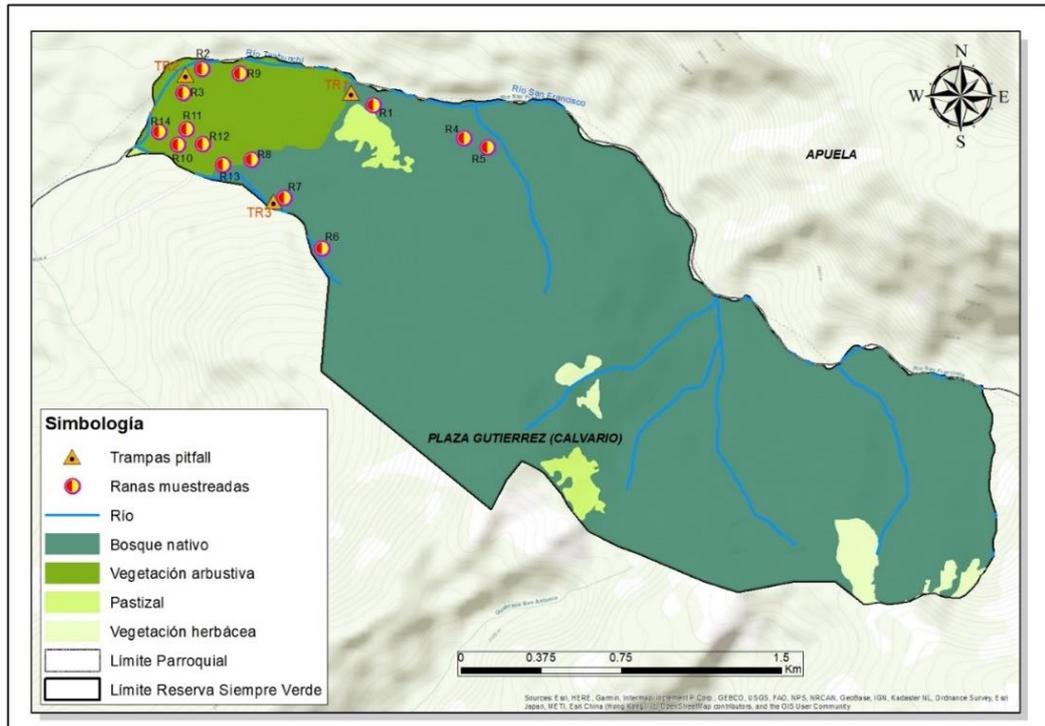
Número	Familia	Especie	Estado de conservación UICN	Código
1	Strabomantidae	<i>Pristimantis actites</i>	Vulnerable	R1
2	Strabomantidae	<i>Pristimantis sp.</i>	N/A	R2
3	Strabomantidae	<i>Pristimantis actites</i>	Vulnerable	R3
4	Strabomantidae	<i>Pristimantis hectus</i>	En peligro	R4
5	Strabomantidae	<i>Pristimantis actites</i>	Vulnerable	R5
6	Strabomantidae	<i>Pristimantis actites</i>	Vulnerable	R6
7	Strabomantidae	<i>Pristimantis actites</i>	Vulnerable	R7
8	Strabomantidae	<i>Pristimantis actites</i>	Vulnerable	R8
9	Strabomantidae	<i>Pristimantis actites</i>	Vulnerable	R9
10	Hylidae	<i>Dendropsophus carnifex</i>	Preocupación menor	R10
11	Hylidae	<i>Dendropsophus carnifex</i>	Preocupación menor	R11
12	Strabomantidae	<i>Pristimantis actites</i>	Vulnerable	R12
13	Strabomantidae	<i>Pristimantis actites</i>	Vulnerable	R13
14	Strabomantidae	<i>Pristimantis actites</i>	Vulnerable	R14

*Nota.* anuros que se muestrearon *in situ*, siendo un total de 14 individuos pertenecientes a cuatro especies.

Mediante el método de trampas de caída no se capturaron anuros. Esto ocurrió posiblemente porque las trampas pitfall tienen sesgos por la preferencia y uso del suelo por parte de las distintas especies anuras (López y Kubisch, 2008). Uno de los sesgos más estudiados de estas trampas es el tamaño de apertura de la trampa. Como un estudio realizado por Jiménez (2020), sugiere que el aumentar el tamaño de la boca de la trampa pitfall aumenta el número de especies capturadas, otro factor puede ser la profundidad de la trampa y el tiempo en que deben estar activas debe ser de al menos 48 horas. Sin embargo, durante el presente estudio se efectuaron tres muestreos de 96 horas cada uno, tiempo en el que estuvieron activas las trampas pitfall. Además la boca de las trampas fue de 45 cm de diámetro y 60 cm de profundidad.

En este sentido, Almora (2000), menciona que este tipo de metodologías pueden emplearse para conocer la riqueza y abundancia de los anuros. Sin embargo, Troya (2017), utilizó esta técnica en su trabajo realizado en la laguna de Cuicocha, después de un periodo de muestreo de cuatro meses únicamente capturó una rana. De manera similar, en el presente estudio esta técnica no permitió realizar capturas. Por lo tanto, las trampas de caída no son un método efectivo para realizar este tipo de muestreos. En consecuencia, se deben implementar otros métodos de muestreo como el de observación directa y red de mano con los cuales se pueda aumentar la posibilidad de captura.

En cuanto a los 14 individuos capturados mediante el método de observación directa y red de mano, de acuerdo con el uso de suelo y cobertura vegetal fueron hallados en las zonas de vegetación arbustiva y bosque nativo o tierra forestal. En vegetación arbustiva se encontraron ocho individuos pertenecientes a las especies: *P. actites*, *D. carnifex*, *P. hectus* y *Pristimantis sp.*, mientras que en bosque nativo se hallaron seis individuos pertenecientes a las especies *P. actites*, y *P. hectus* (Figura 8).



**Figura 8.** Uso de suelo y Cobertura Vegetal de la Reserva Siempre Verde. Ubicación de los anuros muestreados en la Reserva Siempre Verde.

*Nota.* La figura detalla las 14 ranas que se muestrearon mediante observación directa y captura con red de mano y que fueron encontradas en cercanías con cuerpos de agua, también se detalla el tipo de cobertura vegetal de la Reserva Siempre Verde.

Es importante destacar que *P. actites* y *D. carnifex* son especies endémicas de Ecuador y se encuentran categorizadas como Vulnerable y Preocupación Menor, mientras que *P. hectus* se ubica en la categoría En Peligro (Yáñez et al., 2018; Ron y Read, 2019). Estas especies fueron localizadas en hábitats perturbados en el bosque nublado y muy húmedo, tales como: potreros pantanosos dentro del bosque, charcos o aguajales, zanjas llenas agua y praderas húmedas, lo que está en directa relación con su estado de conservación. Además, es sustancial considerar que estas especies se encuentran en una zona con posible presencia de *Bd*, lo que puede incrementar su riesgo de extinción.

El estudio realizado por García et al. (2007), determinó la distribución de especies de anuros en áreas de un Bosque muy húmedo Montano Bajo con distintos grados de perturbación antrópica. Obtuvieron que los anuros seleccionan remanentes de bosque con una alta cobertura vegetal, amplia capa de hojarasca, alta humedad

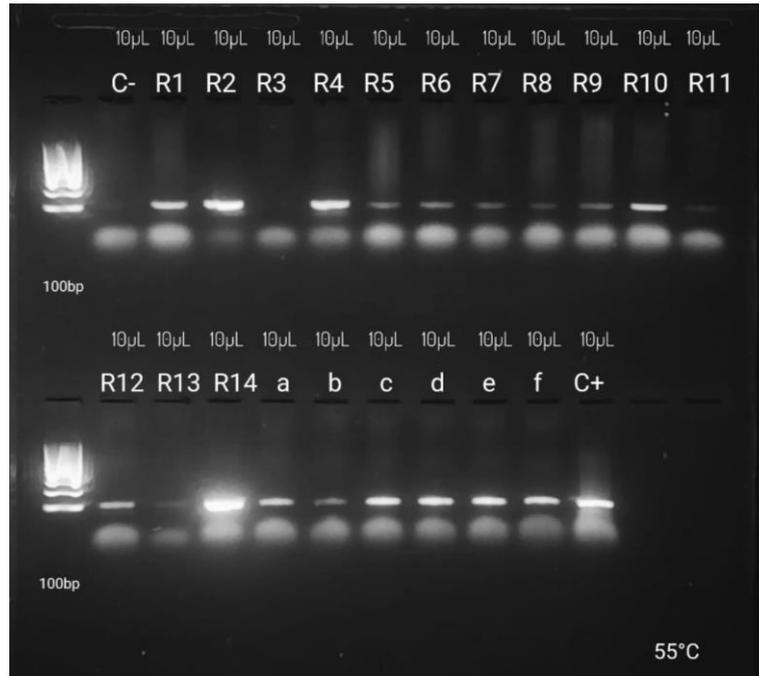
relativa y bajas temperaturas ambientales (aire y suelo). Esta información es importante para diseñar estrategias o lineamientos de conservación de anuros y en los bosques donde habitan.

Gómez y Méndez (2018), mencionan que la presencia y ausencia de anuros está en función de las características ambientales como temperatura, precipitación, altitud y modificaciones de sus hábitats. Esto se comprueba en el presente estudio, ya que se evidenció mayor presencia de anuros en áreas de potrero pantanoso con agua proveniente de una acequia donde se registra temperatura entre los 14 y 15°C y precipitación entre los 1219 y 1271 mm de la Reserva (Anexo 6). Por lo tanto, es necesario que estos parámetros ambientales sean tomados en cuenta en el diseño de estrategias de conservación para los anuros. Es decir, que estos parámetros sean elementos clave en la determinación de las áreas donde se deban llevar a cabo las estrategias de conservación.

#### ***4.1.2. Determinación de la presencia de Bd mediante hisopados en anuros***

##### **4.1.2.1. PCR con TaqMan Environmental Master Mix en muestras de hisopos y volúmenes de 10 µL**

Se determinó que un volumen final de 10µl es suficiente para obtener amplificaciones en la PCR usando Taqman ® Environmental Master Mix en muestras de frotis de tejido de anuros (Figura 9). Esto se respalda en la investigación de Riascos et al. (2018), quienes realizaron un monitoreo basado en ADN de *Procambarus clarkii* y utilizaron 10 µl de volumen. La temperatura óptima de alineamiento para los primers Bd\_rv.2 y Bd\_fw.2 utilizados en la investigación fue 55°C. También Viáfara et al. (2020), en su estudio utilizaron una temperatura óptima de alineamiento de 55°C. El número de ciclos empleados en el presente estudio fueron 35 ciclos, a diferencia de los ciclos utilizados por Annis et al. (2004) donde usaron 30 ciclos. Lo anterior se debe probablemente a que la concentración de ADN fue baja y al aumentar el número de ciclos se logró una amplificación de ADN exitosa.



**Figura 9.** Amplificaciones de la PCR con muestras de frotis de tejido de anuros usando volúmenes de 10 µl

*Nota.* La figura muestra la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Green (InvitrogenTM, s. f.), donde se observan los resultados de la PCR con los cebadores Bd\_rv.2 y Bd\_fw.2 en muestras de hisopados en anuros (R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13 y R14) y muestras ambientales de agua (a, b, c, d, e y f) utilizando TaqMan Environmental master mix en un volumen final de 10 µl.

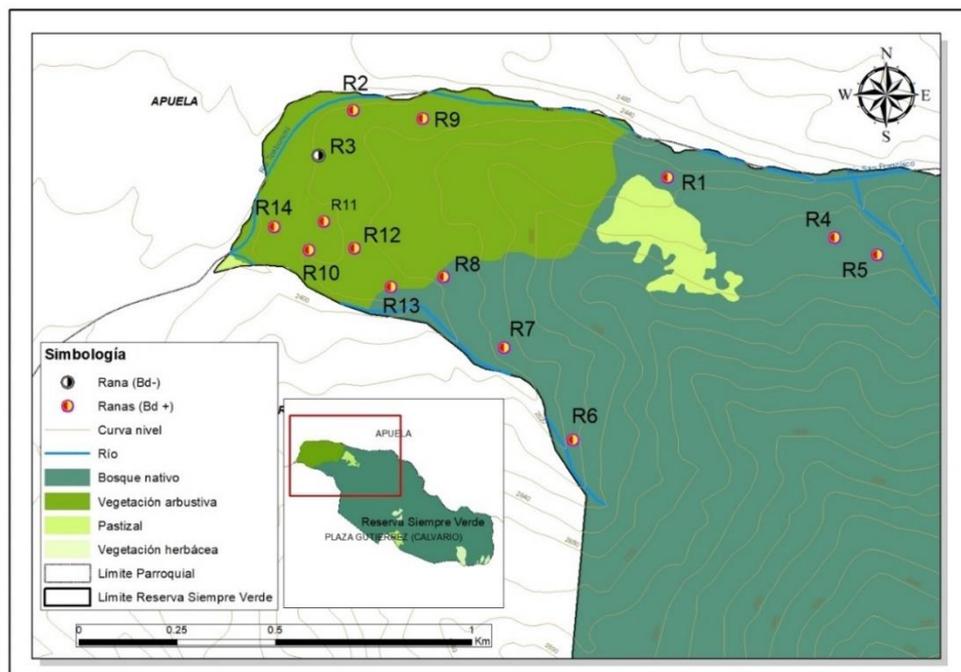
#### ***4.1.3. Muestreo basado en ADN de Bd extraído de muestras de hisopos con 3 réplicas***

De las 14 muestras de hisopos que se obtuvieron durante el frotis de los anuros muestreados, 13 resultaron positivas para *Bd*, de éstas: 12 muestras tuvieron tres réplicas positivas y una tuvo dos réplicas positivas. Por otro lado, una muestra negativa, la cual obtuvo dos réplicas negativas.

De los 14 individuos a los que se les efectuó el frotis, 13 resultaron positivos para *Bd* (Figura 10). La Marca et al. (2005), realizaron un estudio del *Bd* en anuros donde no lograron encontrar una sola población sana de *Atelopus*, estableciendo que las disminuciones y pérdidas de anuros son más significativas en elevaciones por encima de los 1000 m s.n.m. McCracken et al. (2009), detectaron la presencia de este patógeno en anuros de las selvas tropicales del Amazonas del oriente

ecuatoriano en elevaciones inferiores a los 300 m s.n.m., por lo que el hongo podría estar contribuyendo con la disminución de anuros de zonas tropicales, y a su vez, estaría infectando los anuros en sitios de mayor elevación. McCracken et al. (2009), también demostraron que *Bd* se desarrolla mejor a 22°C, destacando que las poblaciones de especies montanas serían las más vulnerables a la declinación. Hernández et al. (2019), sugieren que la presencia de *Bd* en las zonas con mayor altitud puede favorecer su dispersión de las zonas altas hacia las zonas bajas debido a las conexiones hidrológicas. Ron y Merino (2000) y Vizcaíno et al. (2013), destacan que la presencia de *Bd* no solo depende de la altitud, ésta también depende de la vulnerabilidad de las diferentes especies al patógeno, la cual puede estar explicada por sus rasgos conductuales, genéticos, historias de vida, entre otros.

En tal sentido, las zonas con mayor altitud pueden estar propensas a una mayor dispersión de *Bd* debido a que tiene un mejor desarrollo en hábitats fríos y húmedos. Mientras que en ecosistemas de menor altitud se le dificulta prevalecer porque no tolera altas temperaturas. Es posible que este hongo se transporte mediante fuentes hídricas y de esta manera llegue a establecerse en diferentes ecosistemas, y puede ser que afecte a especies de anuros en riesgo de amenaza.

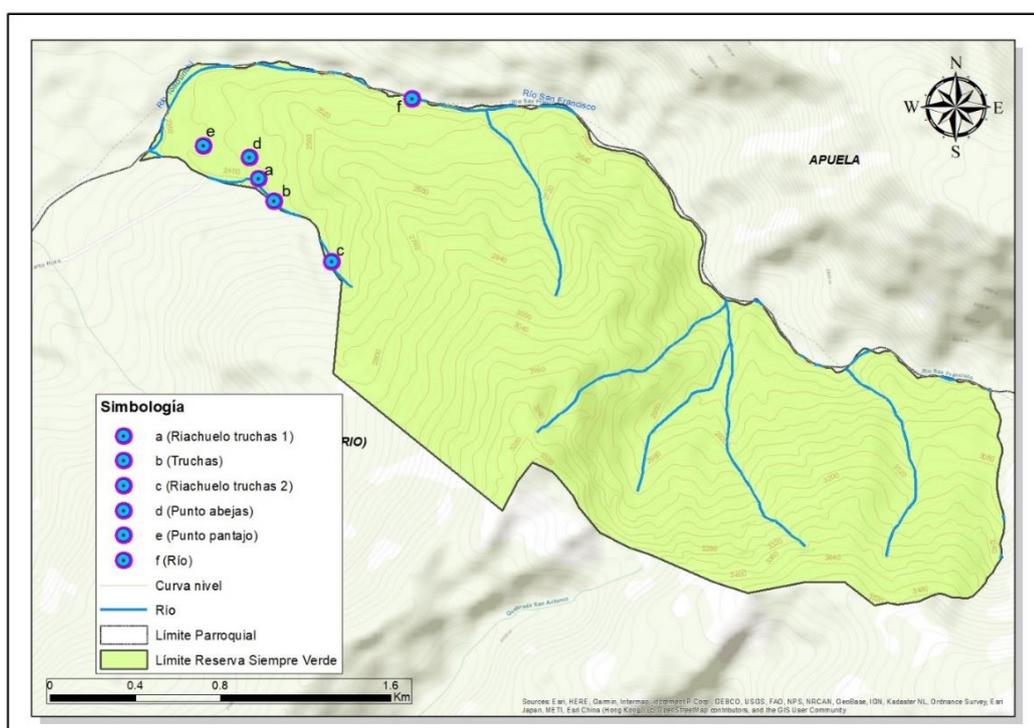


**Figura 10.** Presencia/Ausencia de *Bd* en anuros de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi

*Nota.* La figura muestra a los anuros positivos para *Bd* (R1, R2, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13 y R14), y el anuro negativo para *Bd* (R3).

#### 4.2. Detección de *Bd* en muestras ambientales de cuerpos de agua en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi

Se colectaron muestras de agua en seis sitios ubicados en el río Toabunche, riachuelos y estanques de agua. La colecta se realizó siguiendo el criterio con cercanías con los anuros muestreados previamente (Figura 11).

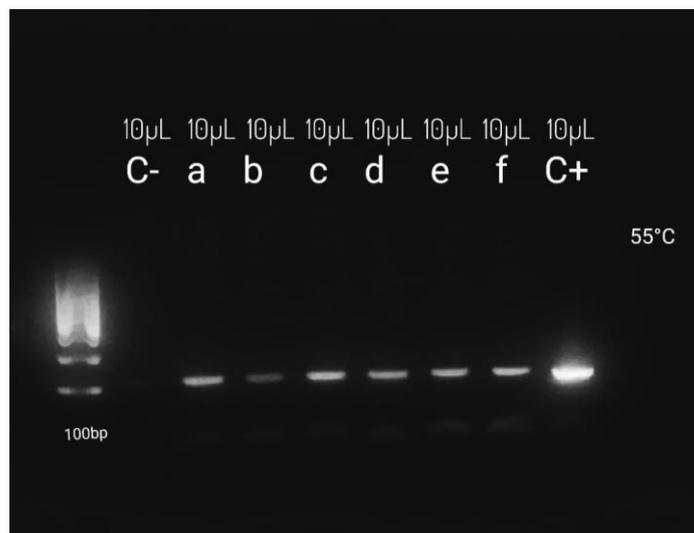


**Figura 11.** Sitios de colecta de muestras ambientales de agua en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi

##### 4.2.1. Aislamiento de ADN ambiental de *Bd* en muestras de agua tomadas en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi

La electroforesis muestra la presencia de material genético de *Bd* en todas las muestras de agua analizadas (Figura 12). Por lo tanto, los resultados obtenidos a partir de las muestras ambientales tomadas *in situ* en la Reserva confirman la

efectividad de la metodología para el aislamiento de ADN y PCR. Además, se obtuvo que un volumen final de 10 $\mu$ l es suficiente para obtener resultados en la PCR usando Taqman® Environmental Master Mix. En concordancia con lo reportado en este estudio, Encarnación (2020) y Geerts et al. (2018) obtuvieron una identificación positiva de ADN puro a partir de muestras de agua. Por lo tanto, también evidenciaron la efectividad del método de aislamiento de ADN ambiental. En consecuencia, este método puede ser considerado efectivo para la obtención de ADN a partir de muestras de agua.



**Figura 12.** Amplificaciones de la PCR con muestras ambientales de agua usando volúmenes de 10  $\mu$ l.

*Nota.* Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Green (Invitrogen™, s. f.) donde se observan los resultados de la PCR con los cebadores *Bd\_rv.2* y *Bd\_fw.2* en las muestras ambientales (agua) utilizando TaqMan Environmental master mix en un volumen final de 10  $\mu$ l. Se aprecian amplificaciones en todas las muestras analizadas (a, b, c, d, e, f).

#### ***4.2.2. Muestreo basado en ADN ambiental de *Bd* extraído en muestras de agua con 3 réplicas***

En los sitios donde se colectaron las muestras de agua se realizaron tres réplicas de filtración de agua como de PCR. Los resultados fueron todos positivos para *Bd* (Anexo 2). Estudios que también emplearon tres réplicas por sitio (Ficetola et al., 2008; Allard, 2018) y 12 réplicas por punto (Biggs et al., 2015; Herder et al., 2014; Martinelli, 2021) encontraron resultados positivos para la amplificación de al menos una de estas. En el estudio de Kamoroff y Goldberg (2017), donde se realizó

la detección de *Bd* a través de eDNA en muestras de agua, obtuvieron que todas las réplicas técnicas detectaron ADN de *Bd* con precisión. Por consiguiente, utilizar al menos tres réplicas quizás sea necesario para tener confiabilidad de las amplificaciones, y tal vez sea útil para lograr detectar a *Bd* en muestras de agua.

Dentro del presente estudio se incluyó en el muestreo de agua a un estanque con truchas (punto b). Luego de los previos análisis moleculares realizados se obtuvo que este sitio también posee ADN de *Bd*, pese a que no se visualizó ningún anuro. Lo anterior podría sugerir que el quítrido es transportado por el agua que fluye, ya que tal como menciona Piotrowski et al. (2004), *Bd* puede sobrevivir en el medio ambiente sin un huésped siempre que las condiciones sean favorables. Por otro lado, podría significar que el quítrido habita en hospedadores distintos a los anuros como las truchas.

En el trabajo realizado por Prada et al. (2011), encontraron ranas infectadas en un arroyo de aguas claras coexistiendo con la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), cuyo hallazgo sugiere una posible transmisión de este patógeno entre especies. Por su parte, Chestnut et al. (2014), establece que es necesario determinar los hospedantes y reservorios alternativos de *Bd*. Varios hospedadores y reservorios alternativos de *Bd* documentados y sugeridos como son: Cangrejo de río (Oficialdegui et al., 2019) nematodos (Shapard et al., 2012), aves (Garmyn et al., 2012), y salamandras (Robinson et al., 2018) se encuentran dentro de los mismos cuerpos de agua que los anuros, y algunas especies de hospedadores/reservorios potenciales como el zooplancton consumen esporas de *Bd* (Buck, Truong y Blaustein, 2011). Es evidente que se han producido cambios en el balance entre hospedador y patógeno y que los declives se suelen producir también en zonas bien conservadas (Bosch, 2003), como es el caso de la Reserva Siempre Verde, un área natural de bosque nativo primario. Es posible que el hongo quítrido no solo esté presente en los anuros, sino en otros hospedadores como la trucha arcoíris y en el mismo ambiente (Scheele et al., 2019).

Por otro lado, la efectividad de los resultados que se obtuvieron durante la detección de *Bd* de este estudio, puede estar relacionada con el tiempo de muestreo y filtración

de agua. Durante la presente investigación se realizó la extracción de ADN en el mismo mes en el que se colectaron las muestras y se pudieron realizar los análisis satisfactoriamente. En el estudio de Hall et al. (2016), se colectaron muestras de agua y se realizó la extracción de ADN después de tres meses, posteriormente se obtuvieron resultados positivos para *Bd*, donde se explica que mediante el método de ADN ambiental no solo se puede detectar la presencia de patógenos en el hábitat de una población, sino también se puede detectar algunos patógenos hasta un mes después de los eventos de mortalidad. En consecuencia, la técnica de ADN ambiental debería ser implementada cuando se realicen muestreos del hongo quítrido.

#### 4.2.3. Secuenciación de productos PCR amplificados con hisopos y eDNA

Se secuenció un total de 14 muestras de hisopos y 6 muestras ambientales de agua amplificadas en la PCR. Los resultados de identidad indican un porcentaje mayor al 97.50% en 17 de 20 muestras. La única muestra que no se secuenció debido a que no se tuvo suficiente ADN fue la que correspondió a R3 o rana 3 de la especie *Pristimantis actites* (Tabla 5).

**Tabla 5.** Secuenciación por identidad en la base de datos de GenBank-Blast

Código de muestras	Género	Especie	Identidad (GenBank-Blast)
<b>R1</b>	<i>Batrachochytrium</i>	<i>dendrobatidis</i>	<b>100.00%</b>
<b>R2</b>	<i>Batrachochytrium</i>	<i>dendrobatidis</i>	<b>97.50%</b>
<b>R3</b>	<i>Batrachochytrium</i>	<i>dendrobatidis</i>	---
<b>R4</b>	<i>Batrachochytrium</i>	<i>dendrobatidis</i>	<b>97.67%</b>
<b>R5</b>	<i>Batrachochytrium</i>	<i>dendrobatidis</i>	<b>97.67%</b>
<b>R6</b>	<i>Batrachochytrium</i>	<i>dendrobatidis</i>	<b>97.67%</b>
<b>R7</b>	<i>Batrachochytrium</i>	<i>dendrobatidis</i>	<b>97.67%</b>
<b>R8</b>	<i>Batrachochytrium</i>	<i>dendrobatidis</i>	<b>97.78%</b>

<b>R9</b>	<i>Batrachochytrium</i>	<i>dendrobatidis</i>	<b>98.21%</b>
<b>R10</b>	<i>Batrachochytrium</i>	<i>dendrobatidis</i>	<b>94.44%</b>
<b>R11</b>	<i>Batrachochytrium</i>	<i>dendrobatidis</i>	<b>98.21%</b>
<b>R12</b>	<i>Batrachochytrium</i>	<i>dendrobatidis</i>	<b>96.43%</b>
<b>R13</b>	<i>Batrachochytrium</i>	<i>dendrobatidis</i>	<b>94.64%</b>
<b>R14</b>	<i>Batrachochytrium</i>	<i>dendrobatidis</i>	<b>100.00%</b>
<b>a</b>	<i>Batrachochytrium</i>	<i>dendrobatidis</i>	<b>97.67%</b>
<b>b</b>	<i>Batrachochytrium</i>	<i>dendrobatidis</i>	<b>98.21%</b>
<b>c</b>	<i>Batrachochytrium</i>	<i>dendrobatidis</i>	<b>97.67%</b>
<b>d</b>	<i>Batrachochytrium</i>	<i>dendrobatidis</i>	<b>97.67%</b>
<b>e</b>	<i>Batrachochytrium</i>	<i>dendrobatidis</i>	<b>97.44%</b>
<b>f</b>	<i>Batrachochytrium</i>	<i>dendrobatidis</i>	<b>97.67%</b>
<b>Total promedio</b>			<b>97.59%</b>

En el estudio realizado por Chestnut et al. (2014), se muestreó con éxito a *Bd* mediante la técnica de ADN ambiental. En ese estudio tomaron muestras de agua de estanques, arroyos e incluso agua dentro de bromelias, registraron un 95% de probabilidad de detectar a *Bd* con cuatro muestras de 600 ml de agua o cinco muestras de 60 ml. En el presente estudio se filtraron 800 ml de agua en el río y 500 ml en los estanques y riachuelos con un 97.59% de probabilidad de detectarlo, por lo que la cantidad de agua filtrada pudo haber influido en la efectividad del método de ADN ambiental para la detección del hongo quítrido.

Según Brannelly et al. (2020), el estudio comparativo de eDNA en *Bd* indica que el volumen de agua que pasa a través del filtro tiene un impacto en la detección de patógenos, en donde mayor es el volumen de agua, más probabilidades hay de detectar el patógeno. En consecuencia, hay bajas probabilidades de detección por debajo de los 500 ml por filtro. Además, dichos autores después de haber detectado a *Bd* solo en uno de los dos sitios muestreados en los que el patógeno estaba presente en anuros, indicaron que la detección por medio de la técnica de eDNA es menos sensible que los hisopados en hábitats de anuros escasamente poblados.

Por lo tanto, se puede sugerir que la utilidad del eDNA depende de la técnica y el sitio donde se muestree (Julian et al., 2019). Además, al no ser esta técnica tan sensible como los hisopados de piel en anuros para determinar al *Bd*, se debería considerar los dos métodos para determinar la presencia o ausencia de este patógeno. Cádiz et al. (2019), indican que tanto el método de hisopado como el de ADN ambiental, aunque sean eficaces de forma independiente, deberían ser complementarios para detectar y controlar la presencia de *Bd* con éxito. No obstante, no se puede hacer una inferencia sobre el estado de la enfermedad en las poblaciones de anuros sin analizar directamente en campo, por ello es importante que se consideren los dos métodos, ADN ambiental y frotis en piel de anuros con hisopos para llevar a cabo estudios de detección de *Bd*, como se realizó en este estudio.

#### **4.3. Lineamientos de manejo de *Bd* en anuros en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi**

Un desafío clave para el manejo de los anuros afectados por *Bd* es la dificultad de desarrollar soluciones a largo plazo. Sin embargo, el logro de objetivos a corto plazo proporcionará una plataforma para la investigación a futuro. Por lo tanto, los lineamientos de manejo que propone el presente trabajo tienen como objetivo a corto plazo:

- Establecer poblaciones silvestres autosuficientes de especies de anuros amenazados por *Bd* en respuesta a las amenazas inmediatas en la naturaleza.

En ese marco, este trabajo se enfocó en desarrollar acciones que puedan implementarse de inmediato para poder proteger a las poblaciones que han experimentado afectaciones por *Bd*. Por consiguiente, los lineamientos comprenden estrategias de manejo que se agrupan en dos enfoques (Tabla 6). Dentro de cada enfoque se clasificaron las estrategias de manejo en tres tipos de acción en función de si las estrategias se implementan *in situ*, involucran introducción de anuros o son estrategias para implementar *ex situ*. Además, se presentan los protocolos de bioseguridad para el muestreo y curación de anuros que se deben implementar en

los respectivos tipos de manejo. Estos lineamientos se sustentan en una base científica de manejo que incluye la manipulación del hábitat, el tratamiento anti-fúngico *in situ*, la translocación de animales, la bioaumentación, selección inicial y *ex situ* para la resistencia de los anuros al *Bd*.

**Tabla 6.** Lineamientos de manejo de *Bd* en anuros de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi

Tipo de acción	Enfoque	
	Reducir <i>Bd</i> en el ambiente	Aumentar la capacidad de amortiguación de la población.
Manipulación ambiental	1) Manipulación del hábitat: 1) Agua tibia poco profunda para los renacuajos. 2) Disminuir el sombreado para crear sitios abiertos para adultos. 3) Fuentes de calor artificial en todas las etapas de vida eliminan las especies hospedantes del reservorio de <i>Bd</i> . 4) Introducir inhibidores de <i>Bd</i> tales como sales y fungicidas. 5) Bioumento con bacterias. 6) Programa de vigilancia de enfermedades, enfatizando en quitridiomycosis, que permita tomar acciones preventivas.	1) Minimizar los impactos humanos (por ejemplo, la caza, la colección, la degradación del hábitat). 2) Manejar otros procesos amenazadores (e.g. especies invasoras, competencia simpátrica, depredación). 3) Evitar las introducciones y reducir los impactos de otras enfermedades. 4) Modificar el hábitat para minimizar la mortalidad debido a extremos climáticos.
Introducción de anuros	1) Identificar refugios ambientales donde <i>Bd</i> está ausente (e.g. partes altas de montaña, fuentes de agua, otros) o refugios donde la idoneidad ambiental para <i>Bd</i> es baja (e.g. elevación más baja, hábitat más seco) y translocada. 2) Evitar los sitios de reservorio <i>Bd</i> . 3) Identificar las etapas de vida donde la <i>Bd</i> está amenazando la viabilidad de la población, lo que aportará información clave para la eliminación de la infección en cautiverio y en consecuencia	1) Preparación de progenie silvestre criada en cautividad para minimizar la mortalidad natural de los depredadores, la competencia y la longitud insuficiente del hidroperíodo. Aumento de la población de la progenie criada cautiva. 2) Creación de nuevos hábitats con una alta capacidad de amortiguación contra la variabilidad del clima y otras amenazas específicas de especies y translocación.

	regresar a la vida silvestre individuos tratados.	
Conservación <i>ex situ</i>	1) Tratamientos para eliminar la infección por <i>Bd</i> (e.g. tratamientos químicos y físicos). 2) Identificación de resistencia de anuros ante <i>Bd</i> u otros rasgos en colonias cautivas.	1) Establecer poblaciones <i>ex situ</i> en instalaciones de bioseguridad. 2) Establecer un banco de recursos genéticos.

#### **4.3.1. Manipulación ambiental para reducir *Bd***

En las poblaciones de anuros remanentes amenazadas por *Bd* se puede implementar la manipulación ambiental para disminuir las tasas y cargas de infección y, por lo tanto, mejorar la supervivencia del huésped. La manipulación ambiental es un método *in situ* que se ha utilizado con éxito para combatir las enfermedades de la vida silvestre y se puede implementar en una amplia gama de escalas (Wobeser, 2007).

Manipular las condiciones ambientales puede influir en el desarrollo de enfermedades (Wobeser, 2007). La preferencia térmica de *Bd* se entiende relativamente bien: el crecimiento óptimo es de 17 a 25 °C (Stevenson et al., 2013). En cualquier lado de este rango (5–17 °C y 25–28 °C) el crecimiento es lento. Por encima de 30 °C, *Bd* muere (Piotrowski et al., 2004) y la mortalidad es rápida a temperaturas más altas (4 h a 37 °C) (Johnson et al., 2003). El hongo no tolera la desecación y muere dentro de 1 h después del secado (Stevenson et al., 2013). Los estudios de campo y los modelos son consistentes con estos resultados y sugieren que los factores que afectan el crecimiento de *Bd* (particularmente las temperaturas superiores a 25 °C) son factores limitantes clave para la dinámica de la quitridiomycosis (Rowley y Alford, 2013). Además, la alta variabilidad climática, especialmente las temperaturas inusualmente bajas, aumenta el impacto de la quitridiomycosis (Rohr et al., 2013).

El agua cálida (>30 °C) proporciona un refugio importante de *Bd* para los anuros acuáticos (Savage et al., 2011). Debido a que la vegetación colgante reduce la temperatura del agua de los estanques de reproducción de anuros (Freidenburg y

Skelly, 2004), es probable que la eliminación estratégica de parches de vegetación, particularmente en lugares poco profundos cerca de las fuentes hídricas cree refugios de agua tibia para los individuos infectados (Geiger et al., 2011). La evidencia de campo sugiere que la disminución de la sombra en fuentes hídricas está relacionada con una menor intensidad de infección por *Bd* (Heard et al., 2013). La temperatura del agua también se puede aumentar mediante la creación de áreas de aguas poco profundas que se calientan rápidamente.

La manipulación ambiental también se puede utilizar para aumentar la temperatura en los hábitats terrestres. Muchas especies ribereñas toman el sol para elevar la temperatura corporal. Por lo tanto, aumentar la cantidad de radiación solar mediante la eliminación de cierta parte de vegetación podría eliminar o reducir la infección. Puschendorf et al. (2011) plantearon la hipótesis de que, para la especie altamente susceptible *Litoria lorica*, la exposición a corto plazo a las temperaturas cálidas de las rocas podría facilitar la persistencia de la población con *Bd* endémico. Esto está respaldado por un estudio de seguimiento que muestra que exponer cultivos de *Bd* a 33 °C durante solo 1 h redujo significativamente el crecimiento de hongos (Daskin et al., 2011).

En situaciones donde la modificación del hábitat no es posible, las fuentes de calor artificiales en la tierra o en el agua podrían brindar refugio a los individuos infectados para reducir o eliminar la infección. Esta estrategia ha sido sugerida para proteger a las poblaciones de murciélagos en América del Norte amenazadas por el síndrome de la nariz blanca (Boyles y Willis, 2010). Las fuentes de calor artificial brindan oportunidades para que los individuos mantengan las temperaturas corporales preferidas, que a menudo son más altas que las temperaturas del aire ambiente y es probable que sean particularmente efectivas para las especies que muestran fiebre conductual (Murphy et al., 2011).

El desarrollo de tratamientos químicos para aplicación ambiental es un área de investigación importante actualmente. La sal y varios productos agrícolas eliminan o reducen las infecciones por *Bd* en condiciones de laboratorio (McMahon et al., 2013). Por ejemplo, el tiofanato-metilo, un fungicida de amplio espectro

ampliamente utilizado, eliminó la infección en los renacuajos cuando se aplicó seis días después de la inoculación experimental, pero los renacuajos crecieron más que los controles, lo que sugiere que pueden ocurrir efectos secundarios (Hanlon et al., 2012). De manera similar, la adición de sal a los ambientes de los estanques es una estrategia prometedora para inhibir el crecimiento de *Bd*. Sin embargo, también puede tener efectos negativos (Stockwell et al., 2012). Recientemente, Geiger y Schmidt (2013), utilizaron General Tonic (acriflavina/azul de metileno) para reducir el *Bd* en cautiverio, y se están realizando más investigaciones para evaluar la eficacia de las aplicaciones en estanques. Por lo tanto, aunque el uso de productos químicos en hábitats naturales es prometedor, es importante determinar las concentraciones y las tasas de aplicación y evaluar los posibles efectos secundarios negativos.

El bioaumentación podría ayudar a mantener las poblaciones amenazadas y facilitar las reintroducciones exitosas (Joseph et al., 2013). La bioaumentación implica la inoculación de anuros anfitriones o hábitats con microbios que producen metabolitos que inhiben el crecimiento y la supervivencia de *Bd* (Bletz et al., 2013). Los microbios que ocurren localmente son los más apropiados. Muletz et al. (2012), proporcionan métodos para identificar microbios que inhiben *Bd* y persisten en los huéspedes objetivo, porque el suelo proporciona un importante reservorio de microbios beneficiosos (Loudon et al., 2013) que pueden transmitirse a los anuros (Muletz et al., 2012). En este sentido la aplicación ambiental parece factible. Al igual que con otras intervenciones, se necesita investigación para mejorar la comprensión mientras se evalúan simultáneamente las aplicaciones de campo.

Realizar programas de vigilancia de enfermedades de anuros, enfatizando en quitridiomycosis, que permitan tomar acciones preventivas, diseñadas para reducir el riesgo de transmisión de patógenos. Este tipo de programas tendría como propósito obtener información actualizada de la problemática referida a la incidencia, localización, repercusión y la cuantificación de la quitridiomycosis, para implementar acciones de control y prevención oportuna (Fernández, 2021). Estos programas estarían compuestos de dos componentes primordiales: 1) Vigilancia pasiva vinculada con la recopilación permanente de información epidemiológica

por actores secundarios como laboratorios, universidades, Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE), entre otros. 2) Vigilancia activa, relacionada con la generación de información por medio de toma de muestras y registro de información epidemiológica para obtener un panorama real del estatus zosanitario. Estos esfuerzos se enfocarían primordialmente en la quitridiomycosis he incluirían la evaluación de eventos como las mortalidades registradas en poblaciones silvestres señaladas con antecedentes y las implicancias sanitarias en el manejo en dichas poblaciones (Anexo 7.1).

#### ***4.3.2. Manipulación ambiental para aumentar la capacidad de amortiguamiento de las poblaciones***

Un enfoque alternativo para reducir directamente la presión de *Bd* en poblaciones de anuros amenazadas por enfermedades es minimizar otras fuentes de mortalidad. Las poblaciones de anuros pueden tolerar la mortalidad de adultos por *Bd* cuando el reclutamiento es suficientemente alto (Phillott et al., 2013). La pérdida y degradación del hábitat son procesos amenazantes clave para muchas especies de anuros (Stuart et al., 2004), y es crucial proteger el hábitat de las especies amenazadas por la quitridiomycosis.

Las especies introducidas también pueden influir en el incremento de la mortalidad de anuros, lo que disminuiría el tamaño de las poblaciones (Vredenburg, 2010). Sin embargo, después de la erradicación de especies introducidas, es posible que incremente el tamaño de la población de anuros, y por ende, teóricamente, puede aumentar la transmisión de *Bd*. Por lo tanto, este es un aspecto que debe evaluarse detenidamente en cada área de estudio (Briggs et al., 2010).

Finalmente, en muchas poblaciones de anuros, los extremos climáticos son una fuente importante de mortalidad (Shoo et al., 2011). Para minimizar el fracaso del reclutamiento inducido por la sequía, los hábitats de reproducción de los anuros pueden manipularse para aumentar el hidroperíodo, y la mortalidad de adultos puede reducirse mediante la creación de refugios húmedos (Shoo et al., 2011). Al manipular el hábitat, es importante tener en cuenta los efectos relativos de las

diferentes fuentes de mortalidad porque puede haber compensaciones entre la supervivencia y el hábitat mejorados para *Bd* (Murray et al., 2011) (*Anexo 7.1*).

#### **4.3.3. Introducción de anuros en entornos desfavorables para *Bd***

Cuando el *Bd* no se puede controlar *in situ*, las translocaciones de especies se pueden usar para mover animales a ambientes desfavorables para el crecimiento del *Bd* o a lugares libres de *Bd*. La translocación animal puede mitigar las enfermedades infecciosas en los mamíferos (Wobeser, 2007), pero aún no se ha probado para combatir la quitridiomycosis.

Se propone la translocación de individuos de anuros a refugios ambientales dentro o cerca de su área de distribución. Los refugios deben tener características ambientales óptimas de acuerdo con el hábitat natural de las especies (Hoegh-Guldberg et al., 2008) y deben estar dentro de los límites de estrés fisiológico de la especie objetivo o ser manipulados para permanecer dentro de esos límites. Los refugios se pueden identificar a través de una combinación de muestreo de campo de *Bd* y modelado de distribución (Puschendorf et al., 2013).

En general, es más probable que los refugios ocurran en elevaciones más bajas donde las temperaturas ambientales excedan el óptimo para el crecimiento de *Bd*, o en áreas más secas. Sin embargo, otros factores, como la ausencia de especies reservorio de enfermedades pueden ser igualmente importantes en algunas circunstancias (Joseph et al., 2013). La efectividad de las introducciones de anuros a nuevas áreas se está evaluando en el Parque Nacional Kosciuszko, Australia, donde *Litoria spenceri*, en Peligro Crítico de extinción, está restringida a un solo arroyo y está amenazada por la quitridiomycosis endémica. Se ha establecido una colonia de reproducción de esta especie en cautiverio y proporcionará descendencia para la reintroducción en el sitio de origen luego de la reducción del dosel, así como una introducción experimental a una segunda corriente que tiene una cubierta de dosel naturalmente baja, un microclima cálido y ningún huésped reservorio o peces depredadores introducidos.

Aunque las translocaciones son bastante prometedoras, pueden tener consecuencias no deseadas, y los beneficios y riesgos potenciales requieren una evaluación cuidadosa (Hoegh-Guldberg et al., 2008). Es importante destacar que es crucial seguir los protocolos de bioseguridad para mitigar el riesgo de propagación de enfermedades y brotes posteriores (*Anexo 7.2*).

#### ***4.3.4. Introducción de anuros para aumentar la capacidad de amortiguamiento de las poblaciones***

Puede ser posible contrarrestar los impactos de la mortalidad causado por *Bd* incorporando individuos criados en cautiverio a las poblaciones silvestres. Dos estrategias que se basan en los enfoques tradicionales de reintroducción son: i) la ventaja inicial, y ii) el aumento de la población. Ventaja implica criar individuos recolectados en la naturaleza, generalmente huevos o renacuajos, hasta una edad óptima para la liberación y, por lo tanto, permitir la supervivencia durante períodos de mortalidad naturalmente alta (por ejemplo, debido a la depredación) o alta mortalidad inducida por *Bd* o exposición a *Bd*.

Para diseñar estrategias efectivas de inicio para cada especie, es crucial saber qué etapa de la historia de vida tiene la mayor exposición a *Bd* o sufre mortalidad por quitridiomycosis. Por ejemplo, en los arroyos de las tierras altas de la selva tropical de América Central, esta enfermedad causa una mortalidad mucho mayor en los individuos metamorfoseados que en los adultos (Kolby et al., 2010). El Centro de Rescate y Conservación de Anfibios de Honduras (HARCC) está trabajando para abordar esta preocupación y reponer la población de ranas adultas reproductivas. Para mejorar la supervivencia, los renacuajos en etapa tardía de desarrollo se llevarán a cautiverio, se tratarán y eliminarán la infección, y se mantendrán en las instalaciones bioseguras de HARCC a través de la metamorfosis. Estas ranas se criarán en cautiverio más allá de su fase de vida más vulnerable al *Bd* y luego se liberarán como adultos jóvenes en su sitio de captura.

La ventaja inicial tiene un beneficio importante sobre los programas de cría *ex situ*: los individuos para la reintroducción se pueden producir rápidamente, lo que

elimina los desafíos y fallas asociados con la cría en cautiverio en especies con diversos requisitos reproductivos y de manejo. Por lo tanto, en sistemas donde *Bd* es endémico pero los adultos continúan produciendo descendencia, los huevos iniciales o los renacuajos podrían contribuir a la supervivencia de la población dentro de su hábitat natural.

Cuando los sitios receptores no están disponibles y la manipulación del hábitat no es posible, es probable que sea útil crear un nuevo hábitat para los animales trasladados. Los estanques creados por humanos ya brindan refugios importantes para los anuros amenazados por quitridiomycosis (Heard et al., 2013). Los beneficios de la creación de hábitat incluyen un alto nivel de control de las condiciones ambientales y prevención de impactos en el hábitat natural para especies no objetivo. Se debe crear una variedad de hábitats que incluyan ambientes cálidos donde los individuos puedan reducir o eliminar la infección por *Bd*. El hábitat creado debe diseñarse para minimizar los impactos de otras amenazas como la depredación de peces o la falta de reclutamiento inducida por la sequía porque un mayor reclutamiento puede compensar la mortalidad inducida por quitridiomycosis (Muths et al., 2011) (*Anexo 7.2*).

#### ***4.3.5. Conservación ex situ para reducir Bd y aumentar la capacidad de amortiguamiento de las poblaciones***

Para las especies que dependen de colonias cautivas para sobrevivir es importante mantener la diversidad genética de los individuos durante generaciones en cautiverio porque esta diversidad no se puede recuperar. Sin embargo, la selección para una mayor resistencia a las enfermedades podría facilitar la persistencia de la población con infección por *Bd* y, por lo tanto, dar lugar a poblaciones sostenibles (Venesky et al., 2013). Una población de *Mixophyes fleayi* se recuperó naturalmente debido al aumento de la longevidad de los adultos, lo que sugiere que en esta especie estaba evolucionando la resistencia a enfermedades (Newell et al., 2013).

La selección directa para la resistencia a enfermedades en cautiverio implica la exposición de anuros a *Bd* y la reproducción de sobrevivientes o de aquellos que sobreviven por más tiempo; estos pueden tratarse con antifúngicos para evitar la mortalidad (Venesky et al., 2012). Alternativamente, los marcadores genéticos para la resistencia a enfermedades (Newell et al., 2013) podrían usarse para identificar individuos resistentes para la reproducción. Además, el stock reproductor debe actualizarse con individuos potencialmente resistentes que actualmente sobreviven en la naturaleza bajo la selección natural.

De manera similar, la selección para una mayor capacidad reproductiva puede permitir que algunas poblaciones persistan al compensar la mortalidad adulta inducida por quitridiomycosis (Phillott et al., 2013). La presión de selección debe ser moderada para evitar la depresión endogámica de otros rasgos mediante el cruzamiento ocasional con individuos menos resistentes o reproductivos (Frankham et al., 2011). Finalmente, en todas las operaciones *ex situ* es importante desarrollar tratamientos para eliminar la infección por *Bd* para su uso en situaciones de emergencia en el caso de una brecha en bioseguridad y un brote de esta enfermedad en la colonia cautiva.

También el uso de tratamiento químico y térmico puede ser implementado. Se pueden usar compuestos antimicóticos y tratamientos térmicos para reducir o eliminar la infección por *Bd* (Woodhams et al., 2011). El itraconazol es el tratamiento químico más utilizado y puede eliminar la infección en una variedad de especies (Baitchman y Pessier, 2013). El voriconazol (Martel et al., 2011), el cloranfenicol (Young et al., 2012) y el clorhidrato de terbinafina (Bowerman et al., 2010), también pueden eliminar la infección en varias especies, proporcionando alternativas al itraconazol.

Se necesita una optimización específica de especie para los tratamientos químicos porque el uso de itraconazol se ha asociado con toxicidad en renacuajos y adultos (Baitchman y Pessier, 2013) y puede provocar un aumento de las tasas de infección después de la exposición posterior a *Bd* (Cashins et al., 2013). El tratamiento térmico ofrece una alternativa económica a los tratamientos químicos (Chatfield y

Richards-Zawacki, 2011). La exposición a temperaturas de 27 a 37 °C ha eliminado la infección en una variedad de especies (Baitchman y Pessier, 2013), aunque fue ineficaz en otras especies (Woodhams et al., 2012). Los tratamientos químicos y térmicos deben probarse en un pequeño número de individuos para confirmar la eficacia y la seguridad para cada especie. Baitchman y Pessier (2013), brindan una revisión detallada, que incluye tasas de dosificación y tiempos de exposición, para tratamientos químicos y térmicos.

En poblaciones con muertes estacionales predecibles, se sugiere recolectar y mantener anuros para un tratamiento de corta duración durante los momentos de carga máxima para mejorar la supervivencia. Si bien, la reducción de las cargas puede aumentar la supervivencia durante las mortandades, el hecho de no eliminar la infección permite el desarrollo de resistencia a los medicamentos por parte de los patógenos (*Anexo 7.3*).

#### ***4.3.6. Elección de estrategia***

Evaluar qué estrategias de manejo son las más adecuadas para una especie en particular depende de una comprensión detallada de la dinámica de *Bd* y la ecología de las especies. Las intervenciones contra el *Bd* deben enfocarse en las etapas de la historia de vida de los anuros más afectados por la enfermedad o en alto riesgo de exposición al *Bd*. Se necesitan estudios ecológicos para identificar brotes, disminuciones en curso y priorizar poblaciones de alto riesgo (Murray et al., 2011). Para la mayoría de las especies, será necesaria una variedad de enfoques implementados a diferentes escalas espaciales, como comenzar en sitios donde el entorno ha sido manipulado para disminuir la idoneidad de *Bd*. Dada la falta de estrategias efectivas comprobadas, todas las intervenciones deben implementarse dentro de un marco experimental (*Anexo 7.4*).

#### ***4.3.7. Protocolo de Bioseguridad para el muestreo de anuros***

También es plausible que el proceso de recolección de anuros para la detección de patógenos pueda conllevar mayores riesgos de bioseguridad que el muestreo con eDNA, especialmente si no se siguen protocolos estrictos de descontaminación. Sin

duda la quitridiomycosis es una enfermedad infecciosa y alarmante de gran importancia a nivel global (Yáñez y Estupíñán, 2016). Posiblemente una causa de su introducción en los ecosistemas sea debido a una manipulación inadecuada de anuros por parte de los mismos investigadores, naturistas o aficionados, ya que el hongo quítrido puede dispersar sus esporas en el material de trabajo de dichos investigadores. Para evitar la propagación de *Bd* es necesario tomar medidas preventivas para minimizar la posibilidad de introducir o diseminar este u otros patógenos de la naturaleza (Angulo et al., 2006). Por lo tanto, se recomienda implementar el siguiente protocolo para el muestreo de anuros:

- Planificar visitas, tomando en cuenta empezar con localidades que todavía no han sido infectadas. Pessier y Mendelson (2017), establecen que la prevención para la transmisión de enfermedades entre poblaciones anfibias es delimitar con cautela el o los sitios de campo.
- Desinfectar el equipo de campo: redes, mangas, trampas, botas, ruedas de vehículos y cualquier material que hayan estado en contacto con el agua en zonas de infección, se deberá desinfectar con lejía al 4%, formol al 40%, etanol al 70%. La desinfección debe hacerse en el campo. Asimismo, Johnson y Speare (2003), mencionan que los compuestos de amonio cuaternario y etanol al 70% son eficientes para la desinfección de equipo e instrumentos usados en la gestión de anuros, y es efectivo contra el hongo *Bd*.
- Transporte de animales vivos: No se recomienda, pero si fuera el caso debería realizarse con los individuos dentro de bolsas individuales con aire y sustrato húmedo.
- Manipulación de cadáveres: utilizar guantes tanto para animales moribundos como para muertos que pudieran estar infectados, los guantes deberán ser desechados y destruidos como “desechos contaminados”. También Mendez et al., (2008) sugieren utilizar guantes desechables sin talco para manipular anuros. Por su parte, Aguirre y Lampo (2006), indican que nunca se debe manipular anuros muertos o moribundos sin guantes.

- Desinfección de instrumental: cualquier instrumento utilizado en campo o laboratorio para manipulación e identificación (pinzas, tijeras, etc.) debe desinfectarse sumergiéndolos en etanos al 70% durante al menos 30 minutos, de ser posible pasar por el autoclave (método de desinfección no químico) (*Anexo 7.4*).

#### **4.3.8. Protocolo de curación de *Bd* en anuros**

El objetivo principal de este protocolo es el de prevenir y minimizar los efectos de la enfermedad de quitridiomycosis producida por el hongo *Bd* cuando se esté trabajando con anuros en vida libre en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi, como puede ser replicado en cualquier otro sitio. Está dirigido a herpetólogos, veterinarios, conservacionistas, biólogos, investigadores, ambientalistas y aficionados a la herpetología (Angulo et al., 2006).

El diagnóstico de la enfermedad normalmente se hace por histopatología de los tejidos afectados. En anuros vivos se han usado dedos cortados y raspados de piel, también se ha descrito que el hongo puede ser detectado utilizando técnicas de amplificación de fragmentos de ADN (reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, por sus siglas en inglés) de exudados de piel tomados con hisopos estériles (Boyle et al., 2004; Annis et al., 2004). Pessier y Mendelson (2017), insinúan que la PCR es la prueba por elección en la revisión de poblaciones silvestres para detectar la presencia de *Bd*.

La enfermedad ha sido tratada con éxito en dendrobátidos, bañando a las ranas moribundas por cinco minutos cada día, durante 11 días, con una suspensión de itraconazol (antimicótico) al 0.01% en solución salina al 0.6%. Como la infección es superficial también se ha recomendado aplicar una pomada cutánea de itraconazol (Wright y Whitaker, 2001). Según Gagliardo et al. (2008), el uso de itraconazol ha tenido éxito en varios programas de conservación de anuros y el tratamiento de aplicación diaria es de corto tiempo (5 minutos). Sin embargo, Garner et al. (2009) manifiestan que este tratamiento es tóxico para los renacuajos y algunas ranas recién metamorfoseadas, por lo que sugiere que no se debería

aplicar en estas etapas de vida, pero si se pudiera usar una concentración más baja de itraconazol. Por otro lado, Pessier y Mendelson (2017), mencionan que el éxito del tratamiento puede ser verificado mediante pruebas PCR de hisopos después de dos semanas de haber finalizado el tratamiento, ya que en este tiempo los anuros terminan de descamar piel que pueda contener restos del hongo quítrido (*Anexo 7.5*).

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- Se determinó la presencia de *Bd* en 13 de 14 anuros muestreados en la Reserva Siempre Verde mediante hisopados, aislamiento de ADN, PCR y secuenciación.
- Se detectó la existencia de *Bd* en los seis puntos de muestreo correspondientes a cuerpos de agua de la Reserva mediante la técnica de ADN ambiental, validando los datos a través de secuenciación.
- Los lineamientos de manejo comprenden estrategias que están en función de si se implementan in situ, involucran introducción de anuros o son estrategias para implementar *ex situ*. Las estrategias que se proponen son relativamente simples de adaptar localmente y constituyen una solución ampliamente aplicable para mantener y recuperar poblaciones de anuros afectados por *Bd*.
- Mediante los lineamientos de manejo establecidos en esta investigación se busca favorecer la preservación de anuros mediante adecuadas manipulaciones y muestreos por parte de investigadores y aficionados para evitar la dispersión de *Bd*.

#### 5.2. Recomendaciones

- Realizar inventarios de composición y abundancia de la anfibio fauna en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi.
- Efectuar muestreos con hisopados y eDNA a escalas mayores integrando la comparación de la presencia del quítrido en diferentes altitudes y también en diferentes temporadas: lluviosa y seca.
- Realizar estudios de detección de *Bd* en la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, ya que el hongo quítrido podría estar habitando en individuos de esta especie en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi.
- Implementar programas de educación ambiental con respecto a la conservación de la anfibio fauna y manejo del hongo quítrido *Bd*.

## REFERENCIAS

- Aguirre, A., y Lampo, M. (2006). Protocolo de bioseguridad y cuarentena para prevenir la transmisión de enfermedades en anfibios. En A. Angulo, J. Rueda-Almoacid, J. V. Rodríguez-Mahecha, y E. La Marca, *Técnicas de Inventario y Monitoreo para los anfibios de la Región Tropical Andina* (págs. 73-92).
- Aguirre, G. (2011). Métodos de estimación, captura y contención de anfibios y reptiles. En S. Gallina, y C. López, *Manual de Técnicas para el estudio de la Fauna* (págs. 61-83).
- Allard, A. (2018). *Patrones de diversidad genética y desarrollo de marcadores genéticos para la detección de ADN ambiental de especies de tilapia Oreochromis sp (Perciformes: Cichlidae) presentes en sistemas lénticos en la República de Panamá*. Universidad de Panamá.
- Amézquita, A., Molina, C., y García-Pérez, J. (2006). Diseño experimental y análisis estadístico. En A. Angulo, J. Rueda-Almoacid, J. Rodríguez-Mahecha, y E. La Marca, *Técnicas de Inventario y Monitoreo para los Anfibios de la Región Tropical Andina* (págs. 51-71). Panamericana Formas e Impresos S.A.
- Angulo, A., Rueda, J., Rodríguez, J., y La Marca, E. (2006). *Técnicas de Inventario y Monitoreo para los Anfibios de la Región Tropical Andina*. Bogotá: Panamericana Formas e Impresos S.A.
- Annis, S. L., Dastoor, F., Ziel, H., Daszak, P., y Longcore, J. (2004). A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases*, 420-428.
- Armesto, L., y Sénaris, J. (2017). Anuros del norte de los andes: Patrones de riqueza de especies y estado de conservación. *Papéis Avulsos de Zoología*, 491-526.
- Arnhem, C., y Kiessling, N. (2006). *Infection of amphibians with chytrid fungus resulting in chytridiomycosis*.
- Bahamón, J. (2010). *Detección de Batrachochytrium dendrobatidis en anfibios de un bosque húmedo tropical submontano localizado en el Municipio de*

- Santa María-Boyacá*. Tesis de Pregrado, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.
- Baitchman, E.J. y Pessier A.P. (2013). Pathogenesis, diagnosis, and treatment of amphibian chytridiomycosis. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 16:669–685.
- Ballesteros, J., Vidal, C., y Ortega, Á. (2019). *Anfibios de Córdoba*. Fondo Editorial Universidad de Córdoba.
- Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, W. L., y Lodge, D. M. (2014). Environmental Conditions Influence eDNA Persistence in Aquatic Systems. *Environmental Science y Technology*, 1819-1827. Obtenido de <https://doi.org/10.1021/es404734p>
- Barnes, M; Brown, A; Daum, M; de la Garza, K; Driskill, J; Garrett, K; Goldstein, M; Luk, A; Maguire, J; Moke , R; Ostermaier , E; Sanders, Y; Sandhu, T; Stith, A; Suresh, V. (2020). Detección de patógenos anfibios, hongo quítrido ( *Batrachochytrium dendrobatidis* ) y ranavirus en el oeste de Texas, EE. UU., Utilizando ADN ambiental. *Journal of Wildlife Diseases*, 702-706.
- Basanta, M. (2019). Ecología y evolución de enfermedades emergentes en anfibios: una revisión de ranavirus y quitridiomycosis. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 9-25.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, E., Cunningham, A., Goggin, L., Slocombe, R., Ragan, M., Hyatt, A., McDonald, K., Hines, H., Lips, K., 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.
- Beltrán, N., Martínez, R., y Perales, J. (2016). *Guía de anfibios de los Parques Nacionales Españoles*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- Bentley, P. J. (1966). Adaptations of Amphibia to arid environments. *Science*, 619-623.

- Berger, L., Hyatt, A. D., Speare, R., y Longcore, J. E. (2005). Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68(1), 51-63.
- Berger, L., Longcore, J. E., Speare, R., Hyatt, A., y Skerratt, L. F. (2009). Fungal Diseases in Amphibians. *Amphibian Biology*, 8, 2986-3052.
- Berger, L., Speare, R., Hines, H., Marantelli, G., y Hyatt, A. (2004). Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Australian Veterinary Journal*, 434–439.
- Berger, Lee; Speare, Rick; Daszak, Peter; Green, Earll; Cunningham, Andrew; Goggin, Louise; Slocombe, Ron; Ragan, Mark; Hyatt, Alex; McDONALS, Keith; Hines, Harry; Lips, Karen; Marantelli, Gerry; Parkes, Helen. (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*, 9031-9036.
- Biggs, J; Ewald, N; Valentini, A; Gaboriaud, C; Dejean, T; Griffiths, R A; Foster, J; Wilkinson, J; Arnell, A; Brotherton, P; Williams, P; Dunn, F. (2015). Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation*(183), 19-28.
- Blaustein, A., Romansic, J., Kiesecker, J., y Hatch, A. (2003). Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and distributions*, 123-140.
- Bletz, M., Archer, H., Harris, R., McKenzie, V., Rabemananjara, F., Rakotoarison, A., y Vences, M. (2017). Host Ecology Rather Than Host Phylogeny Drives Amphibian Skin Microbial Community structure in the Biodiversity Hotspot of Madagascar. *Frontiers in Microbiology*, 1530. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01530>
- Bletz, M.C., Loudon, A.H., Becker, M.H., Bell, S.C., Woodhams, D.C., Minbiole, K.P.C. y Harris. R.N. (2013). Mitigating amphibian chytridiomycosis with bioaugmentation: characteristics of effective probiotics and strategies for their selection and use. *Ecology Letters*, 16:807–820.

- Bonaccorso, E., Guayasamin, D., Méndez, y Spear, R. (2003). Chytridiomycosis as a possible cause of population declines in *Atelopus cruciger* (Anura: Bufonidae). *Herpetological Review*, 331-334.
- Bosch, J. (2003). Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. *Munibe*(16), 56-73.
- Bosch, J., Sanchez, E., Fernández, A., Oliver, J., Fisher, M., y Garner, T. (2015). Successful elimination of a lethal wildlife infectious disease in nature. *Biology Letters*, 20150874.
- Boyle, D. G., Boyle, D. B., Olsen, V., Morgan, J. A., y Hyatt, A. D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of aquatic organisms*, 60, 141-148. doi:10.3354/dao060141
- Boyles, J.G. y Willis, C.K.R. (2010). Could localized warm areas inside cold caves reduce mortality of hibernating bats affected by white-nose syndrome? *Frontiers in Ecology and the Environment*, 8:92–98.
- Bowerman, J., Rombough, C., Weinstock, S.R. y Padgett-Flohr, G.E. (2010). Terbinafine hydrochloride in ethanol effectively clears *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 20:24–28.
- Brannelly, L., McMahon, T., Hinton, M., Lenger, D., y Richards-Zawazhi, C. (2015). *Batrachochytrium dendrobatidis* in natural and farmed Louisiana crayfish populations: prevalence and implications. *Diseases of Aquatic Organisms*, 112(3), 229-235. doi:10.3354/dao02817.
- Brannelly, L., Wetzel, D., Ohmer, M., Zimmerman, L., Saenz, V., y Richards, C. (2020). Evaluating environmental DNA as a tool for detecting an amphibian pathogen using an optimized extraction method. *CONSERVATION ECOLOGY*, 1-16.
- Bravo, J., y Moreno, G. (2020). Chytridiomycosis en anfibios. *Bol. Soc. Micol.*, 27-49.
- Briggs, C.J., Knapp, R.A. y Vredenburg, V.T. (2010). Enzootic and epizootic dynamics of the chytrid fungal pathogen of amphibians. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, 107:9695–9700.
- Buck, J., Truong, L., & Blaustein, A. (2011). Predation by zooplankton on *Batrachochytrium dendrobatidis*: biological control of the deadly amphibian chytrid fungus? *Biodiversity and Conservation*, 3549–3553.
- Burrowes, P., Joglar, R., y Green, D. (2004). Potential causes for amphibian declines in Puerto Rico. *Herpetológica*, 141-154.
- Cádiz, A., Reytor, M. L., Díaz, L. M., Chestnut, T., Burns, J. A., y Amato, G. (2019). The Chytrid Fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, is Widespread Among Cuban Amphibians. *EcoHealth*, 16, 128-140. doi:<https://doi.org/10.1007/s10393-018-1383-9>
- Cahuasqui, D. (2019). *Lineamientos de manejo y uso sostenible de áreas con altos valores de conservación en el ecosistema de bosque seco alto andino, Yachay – Urcuqui - Imbabura - Ecuador*. Turrialba: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
- Campbell, C. R., Voyles, J., Cook, D., y Dinudom, A. (2012). Frog skin epithelium: electrolyte transport and chytridiomycosis. *The international journal of biochemistry y cell biology*, 44(3), 431-434. doi:<https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.biocel.2011.12.002>.
- Cashins, S.D., Grogan, L.F., McFadden, M., Hunter, D., Harlow, P.S., Berger, L. y Skerratt, L.F. (2013). Prior infection does not improve survival against the amphibian disease chytridiomycosis. *PLoS One* 8, DOI:10.1371/journal.pone.0056747.
- Castillo, A., y Tituaña, P. (2019). *Evaluación de los nichos ecológicos y diversidad de anuros en las Siete Cascadas San Lorenzo, Ecuador*. Tesis de pregrado, Universidad Técnica del Norte.
- Catalá, I. (2011). Los conceptos de especies indicadoras, paraguas, banderas y claves: su uso y abuso en ecología de la conservación. *Interciencia*, 31-38.
- Chatfield, M. y Richards-Zawacki, C. (2011). Elevated temperature as a treatment for *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in captive frogs. *Diseases of Aquatic Organisms*, 94:235–238.

- Chestnut, T., Anderon, C., Popa, R., Blaustein, A., Voyket, M., Olson, D., y Kirshtein, J. (2014). Heterogeneous Occupancy and Density Estimates of the Pathogenic Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Waters of North America. *PLOS ONE*, 1-11.
- Cisneros, D. F. (2006). *La Herpetofauna de la Estación de Biodiversidad Tiputini, Ecuador*. Tesis (B.S. en Ecología Aplicada), Universidad San Francisco de Quito.
- Constitución de la República del Ecuador. (20 de octubre de 2008). *Registro Oficial*, 449. Ciudad Alvaro Asamblea Constituyente.
- Corn, P. S. (1994). Straight-line drift fences and pitfall traps. En *Measuring and monitoring biological diversity: Standard methods for amphibians* Smithsonian Institution Press (págs. 109-117). Smithsonian Institution Press.
- Cushman, S. (2006). Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. *Biological conservation*, 231-240.
- Daskin, J.H., Alford, R.A. y Puschendorf, R. (2011). Short-term exposure to warm microhabitats could explain amphibian persistence with *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS One* 6, DOI: 10.1371/journal.pone.0026215.
- Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., y Miaud, C. (2011). Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS ONE*, 6(8), e23398. doi: doi:10.1371/journal.pone.0023398.
- Díaz, H. (2003). *Dinámica espacio temporal de una comunidad de anfibios en el centro-sur de Chile, relevancia en las interacciones sociales de Pleurodema thaul*. Tesis doctoral, Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanografía.
- Díaz, H., y Ortiz, J. C. (2003). Hábitos alimentarios de *Pleurodema thaul* (Anura, Leptodactylidae), en Concepción, Chile. *Gayana (Concepción)*, 25-32.
- Díaz, J., Orozope, M., y Aguilar, J. (2019). Servicios ecosistémicos de los anfibios en México: un análisis de diversidad, distribución y conservación. *Etnobiología*, 49-60.

- Diz, O. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas . *NPunto*, 88-111.
- Dodd, C. K., y Scott, D. E. (1994). Drift fences encircling breeding sites. En W. R. Heyer, M. A. Donnelly, R. W. McDiarmid, L. C. Hayek, y M. S. Foster, *Measuring and monitoring biological diversity: Standard methods for amphibians* (págs. 125-130). Smithsonian Institution Press.
- Dopereiro, D. (2019). *Incidencia de una enfermedad emergente de anfibios en Galicia: la infección por dermocistidios en el tritón palmeado (Lissotriton helveticus)*. Tesis de pregrado, Universidad de la Coruña.
- Duellman, W., y Trueb, L. (1986). *Biology of amphibians*. McGraw-Hill.
- Duffus, L., y Cunningham, A. (2010). Major disease threats to European amphibians. *The Herpetological Journal*, 117-127.
- Echeverría, C., Bolados, G., Rodríguez, J., Aguayo, M., y Premoli, A. (2014). Ecología de paisajes forestales. *Ecología forestal. Bases para el manejo sustentable y conservación de los bosques nativos de Chile*, Ediciones UACH, 583-604.
- Eiler, A., Löfgren, A., Hjerne, O., Nordén, S., y Saetre, P. (2018). Environmental DNA (eDNA) detects the pool frog (*Pelophylax lessonae*) at times when traditional monitoring methods are insensitive. *Scientific Reports*, 5452.
- Encarnación, A. (2020). *Determinación de la concentración del eDNA de *Poecilia reticulata* en sedimentos acuáticos y aguas superficiales*. Universidad Técnica del Norte.
- Fernández, A. (2021). *Quitridiomycosis en anfibios: Inmunidad, tratamiento y mitigación en el medio natural*. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/69940/>
- Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., y Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4(4), 423-425. Obtenido de <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>
- Frankham, R., Ballou, J.D., Eldridge, M.D., Lacy, R.C., Ralls, K., Dudash, M.R. y Fenster, C.B. (2011). Predicting the probability of outbreeding depression. *Conservation Biology*, 25:465– 475.

- Freidenburg, L. K. y Skelly, D.K. (2004). Microgeographical variation in thermal preference by an amphibian. *Ecology Letters*, 7:369–373.
- Frenkel, C., Páez, N., Varela, A., y Guayasamín, J. (2018). *Pristimantis hectus*. Obtenido de Anfibios del Ecuador. Versión 2021.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Pristimantis%20hectus>
- Gagliardo, R., Crump, P., Griffith, E., Mendelson, J., Ross, H., y Zippel, K. (2008). The principles of rapid response for amphibian conservation, using the programmes in Panama as an example. *International Zoo Yearbook*, 42(1), 125-135
- García, J., Cárdenas, H., y Castro, F. (2007). Relación entre la diversidad de anuros y los estadios sucesionales de un bosque muy húmedo montano bajo del Valle del Cauca, suroccidente colombiano. *Caldasia*, 2357-3759.
- Garmyn, A; Van Rooij, P; Pasmans, F; Hellebuyck, T; Van Den Broeck, W; Haesebrouck, F; Martel, A. (2012). Waterfowl: Potential Environmental Reservoirs of the Chytrid Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS One*, e35038.
- Garner, TWJ., Garcia, G., Carroll, B., y Fisher, M. (2009). Using itraconazole to treat *Batrachochytrium dendrobatidis* infection, and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms*, (83), 257-260.
- Gascon, C., Collins, J. P., Moore, R. D., Church, D. R., McKay, J. E., y Mendelson, J. R. (2007). *Amphibian Conservation Action Plan*. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group, Switzerland and Cambridge, UK.
- Geerts, A., Boets, P., Van den Heede, S., Goethals, P., y Van der heyden, C. (2018). A search for standardized protocols to detect alien invasive crayfish based on environmental DNA (eDNA): A lab and field evaluation. *Ecological Indicators*, 564-572.
- Ghirardi, R., Lopez, P., Scarabotti, M., Steciow, y Perotti, M. (2011). First record of the chytrid fungus in *Lithobates catesbeianus* from Argentina: exotic species and conservation. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 1337-1339.

- Goka, K; Yokoyama, J; Une, Y; Kuroki, T; Suzuki, K; Nakahara, M; Kobayashi, A; Inaba, S; Mizutani, T; Hyatt, A. (2009). Amphibian chytridiomycosis in Japan: Distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular ecology*, 4757-4774.
- Goldberg, C. S., Pilliod, D. S., Arkle, R. S., y Waits, L. P. (2011). Molecular Detection of Vertebrates in Stream Water: A Demonstration Using Rocky Mountain Tailed Frogs and Idaho Giant Salamanders. *PLoS ONE*, e22746. Obtenido de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022746>
- Gómez, S., y Méndez, L. (2018). *Anuros como bioindicadores de calidad ambiental de la zona de influencias de la parte alta de la microcuenca Sagala Huaycu Parroquia San Roque provincia de Imbabura*. Tesis de pregrado, Universidad Técnica del Norte.
- Geiger, C.C. y Schmidt, B.R. (2013). Laboratory tests of antifungal agents to treat tadpoles against the pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 103:191–197.
- Geiger, C.C., Kupfer, E., Schar, S., Wolf, S. y Schmidt, B.R. (2011). Elevated temperature clears chytrid fungus infections from tadpoles of the midwife toad, *Alytes obstetricans*. *Amphibia-Reptilia*, 32: 276–280.
- Guayasamín, J. M., Mendoza, A. M., Longo, A. V., Zamudio, K. R., y Bonaccorso, E. (2014). High prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in an Andean frog community (Reserva Las Gralarias, Ecuador). *Amphibian y Reptile Conservation*, 33-44.
- Hall, E., Crespi, E., Goldberg, C., y Brunner, J. (2016). Evaluating environmental DNA-based quantification of ranavirus infection in wood frog populations. *Molecular Ecology Resources*, 423 - 433.
- Hanlon, S.M., Kerby, J.L. y Parris, M.J. (2012). Unlikely remedy: fungicide clears infection from pathogenic fungus in larval southern leopard frogs (*Lithobates sphenoccephalus*). *PLoS One* 7, DOI:10.1371/journal.pone.0043573.

- Heard, G.W., Scroggie, M.P., Clemann, N. y Ramsey, D.S.L. (2013). Wetland characteristics influence disease risk for a threatened amphibian. *Ecological Applications*, DOI:10.1890/1813-0389.1891.
- Hammond, P. M. (1994). Practical approaches to the estimation of the extent of biodiversity in speciose groups. *Philosophical Transactions of the Royal Society*(345), 119-136.
- Hanselmann, R; Rodríguez, A; Lampo, M; Fajardo-Ramos, L; Aguirre, A; Kilpatrick, A; Rodríguez, J; Daszak, P. (2004). Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in Venezuela. *Biological Conservation*, 115-119.
- Hatzenbuehler, C., Kelly, J., Martinson, J., Okum, S., y Pilgrim, E. (2017). Sensitivity and accuracy of high-throughput metabarcoding methods for early detection of invasive fish species. *Scientific Reports*, 1-10.
- Herder, J., Valentini, A., Bellemain, E., Dejean, T., van Delft, J., Thomsen, P., y Taberlet, P. (2014). *Environmental DNA - a review of the possible applications for the detection of (invasive) species*. Stichting RAVON.
- Hernández, L., Romero, U., González, J., García, M., y Amézquita, A. (2019). Nuevos registros y prevalencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anuros de la cuenca Nazas-Aguanaval en la región norte-centro de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 1-9.
- Herrera, J., Díaz, J., Pineda, E., y Cultid, C. (2020). Desde el suelo hasta el dosel: el papel ecológico de las ranas y los sapos. 8-11.
- Hoegh-Guldberg, O., Hughes, L., McIntyre, S., Lindenmayer, D.B., Parmesan, C., Possingham, H.P. y Thomas. C.D. (2008). Assisted colonization and rapid climate change. *Science*, 321:345–346.
- Hudson, M., Young, R., Lopez, J., Martin, L., Fenton, C., McCrea, R., Griffiths, R., Adams, S., Gray, G., Garcia, G., Cunningham, A. (2016). In-situ itraconazole treatment improves survival rate during an amphibian chytridiomycosis epidemic. *Biological Conservation*, 37-45.
- Hutchinson, M. (2009). *Reptiles y Anfibios*. Australia: Oceano Travesia.
- Jambatu. (2021). *Lista Roja Anfibios Ecuador*. Obtenido de <http://www.anfibiosecuador.ec/index.php?lr,10>

- Jensen, J., y Camp, C. (2003). Human exploitation of amphibians: direct and indirect impacts. *Amphibian Conservation*, 199-213.
- Jiménez, F. (2020). *Las hormigas como bioindicadores de calidad ambiental en el marco de la gestión de los recursos naturales en el sur de la península Ibérica*. Madrid: IDEP.
- 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*, 57:255–260.
- Johnson, M., y Speare, R. (2003). Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: Quarantine and disease control implications. *Emerging Infectious Diseases*, 9:922-925.
- Joseph, M.B., Mihaljevic, J.R., Arellano, A.L., Kueneman, J.G., Preston, D.L., Cross, P.C. y Johnson, P.T. (2013). Taming wildlife disease: bridging the gap between science and management. *Journal of Applied Ecology*, 50:702–712.
- Julian, J., Glenney, G., y Rees, C. (2019). Evaluating observer bias and seasonal detection rates in amphibian pathogen eDNA collections by citizen scientists. *Diseases of Aquatic Organisms*, 134, 15-24. doi:<https://doi.org/10.3354/dao03357>
- Kamoroff, C., y Goldberg, C. S. (2017). Using environmental DNA for early detection of amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* prior to a rapid die-off. *Diseases of Aquatic Organisms*, 75-79.
- Kandus, P., y Minotti, P. (2018). *Propuesta de un marco conceptual y lineamientos metodológicos para el Inventario Nacional de Humedales*. UNSAM.
- Knapp, R; Joseph, M; Smith, T; Hegeman, E; Vredenburg, V; Erdman, J; Boiano, D; Jani, A; Briggs, C;. (2022). Effectiveness of antifungal treatments during chytridiomycosis epizootics in populations of an endangered frog. *PeerJ*, e12712.
- Kolby, J.E., Padgett-Flohr, G.E. y Field. R. (2010). Amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Cusuco National Park, Honduras. *Diseases of Aquatic Organisms*, 92:245–251.

- La Marca, E., Lips, K., Lötters, S., Puschendorf, R., Ibáñez, R., Rueda, J., Schulte, R., Marty, C., Castro, F., Manzanilla, J., García, J., Bolaños, F., Chaves, G., Pounds, A., Toral, E., y Young, B. (2005). Catastrophic population declines and extinctions in Neotropical harlequin frogs (Bufonidae: Atelopus). *Biotropica*, 37(2), 190-201.
- Lebboroni, M., Ricchiardino, G., Bellavita, M., y Chelazzi, G. (2006). Potencial use of anurans as indicators of biological quality in upstreams of central Italy. *Amphibia-Reptilia*, 73-79.
- Lescano, J. N., Longo, S., y Robledo, G. (2013). Chytridiomycosis in endemic amphibians of the mountain tops of the Cordoba and San Luis ranges, Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms*, 249-254.
- Lips et al. (2006). Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 3165-3170.
- Lips, K. (1999). Mass mortality and population declines of anurans at an upland site in eastern Panama. *Conservation Biology*, 117-125.
- Lips, K., Reaser, B., Young, B., y Ibáñez, R. (2001). Monitoreo de anfibios en América Latina: Manual de protocolos. *Society for study of amphibians and reptiles. Herpetological Circulars.*, 30-114.
- Lips, K., Reeve, J., y Witters, L. (2003). Ecological Traits Predicting Amphibian Population Declines in Central America. *Conservation Biology*(17), 1078-1088.
- Longcore, J. E., Pessier, A., y Nichols, D. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91(2), 219-227.
- Longo, A. B., Burrowes, P. A., y Joglar, L. L. (2010). Seasonality of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in direct-developing frogs suggests a mechanism for persistence. *Diseases of Aquatic Organisms*, 253-260.
- López, C., y Kubisch, E. (2008). Relevamiento in situ de la herpetofauna del Refugio Privado de Vida Silvestre Yacutinga, Provincia de Misiones (Argentina). *Aprona Boletín Científico*, 1-12.

- Loudon, A.H., Woodhams, D.C., Parfrey, L.W., Archer, H., Knight, R., McKenzie, V. y Harris, R.N. (2013). Microbial community dynamics and effect of environmental microbial reservoirs on red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*). *The ISME Journal*, DOI:10.1038/ismej.2013.1200.
- Lovett. (2008). *Siempre Verde The Lovett School*. Obtenido de <https://www.siempreverde.org/>
- Lozano, P. J., y Cadiñanos, J. A. (2007). Valoración biogeográfica de los anfibios en la Comunidad Autónoma de Euskadi. *Lurralde*, 181-202.
- Lynch, J., y Duellman, W. (1997). Frogs of the genus *Eleutherodactylus* in Western Ecuador: systematics, ecology, and biogeography. *The University of Kansas, Natural History Museum, Special Publication*, 1-236.
- Maneyro, R. (2019). Colecta y manejo de anfibios en el ambiente. En F. T. Mello, *Experimentación con animales no tradicionales en Uruguay* (págs. 71-79). CHEA-UdelaR.
- Manzanilla, J., y Péfaur, J. (2000). Consideraciones sobre métodos y técnicas de campo para el estudio de anfibios y reptiles. *Revista de ecología latinoamericana*, 17-30.
- Manzano, A. (2010). *Variación estacional en la prevalencia de Batrachochytrium dendrobatidis en una población larvaria de la rana marsupial Gastrotheca riobambae (Anura: Hemiphractidae) en Quito*. Tesis de pregrado, Escuela Politécnica Nacional del Ejército.
- Martel, A., et al. (2011). Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. *Medical Mycology*, 49:143–149.
- Martín, J., Kitchens, W. M., y Hines, J. E. (2007). Importance of well-designed monitoring programs for the conservation of endangered species: case study of the snail kite. *Conservation Biology*(21), 472-481.
- Martinelli, R. (2021). *Estudio de la biodiversidad acuática de vertebrados en la Amazonía y Orinoquía Colombiana por medio de ADN ambiental*. Universidad de los Andes.
- McCracken, S., Gaertner, J., Forstner, M., y Hahn, D. (2009). Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amphibians from the Forest Floor to the

- Upper Canopy of an Ecuadorian Amazon Lowland Rainforest. *Herpetological Review*, 190-195.
- McMahon, T; Brannelly, L; Chatfield, M; Johnson, P; Joseph, M; McKenzie, V; Richards, C; Venesky, M; Rohr, J;. (2013). Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* has nonamphibian hosts and releases chemicals that cause pathology in the absence of infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 210-215.
- McMahon, T.A., Romansic, J.M. y Rohr. J.R. (2013). Non-monotonic and monotonic effects of pesticides on the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in culture and on tadpoles. *Environmental Science & Technology*, 47:7958–7964.
- Mendez, D., Webb, R., Berger, L., y Speare, R. (2008). Survival of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* on bare hands and gloves: hygiene implications for amphibian handling. *Diseases of Aquatic Organisms*, 97-104.
- Merino, A. (2001). *Analisis 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.
- Merino-Viteri, A., Coloma, L. A., y Almendàriz, A. (2005). Los Temlatobius de los Andes de Ecuador y su disminuciòn poblacional. *Monografias de Herpetologia*, 9-37.
- Ministerio del Ambiente. (2016). *Informe de la UICN para la República del Ecuador*.
- Morgan, J; Vredenburg, V; Rachowicz, L; Knapp, R; Stice, M; Tunstall, T; Bingham, R; Parker, J; Longcore, J; Mortiz, C; Briggs, C; Taylor, J. (2007). Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 13845-14850.
- Muletz, C.R., Myers, J.M., Domangue, R.J., Herrick, J.B. y Harris R.N. (2012). Soil bioaugmentation with amphibian cutaneous bacteria protects amphibian hosts from infection by *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Biological Conservation*, 152:119–126.

- Muñoz, J., Camacho, C., Ovalle, A., y Castillo, A. (2018). Capítulo V. Anfibios y Reptiles. En G. d. (SisBio), *Área Temática 2: Fauna* (págs. 236-276).
- Murphy, P.J., St-Hilaire, S. y Corn. P.S. (2011). Temperature, hydric environment, and prior pathogen exposure alters the experimental severity of chytridiomycosis in boreal toads. *Diseases of Aquatic Organisms*, 95: 31–42.
- Murray, K.A., Skerratt, L.F., Speare, R. y McCallum, H. (2009). Impact and dynamics of disease in species threatened by the amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology*, 23:1242–1252.
- Mustelier, O., Téllez, E., y Rodríguez, R. (2016). Inventario parcial de anfibios en localidades del macizo montañoso Nipe-Sagua- Baracoa, Guantánamo, Cuba. *Hombre, Ciencia y Tecnología*, 91-98.
- Muths, E., Scherer, R.D. y Pilliod. D.S. (2011). Compensatory effects of recruitment and survival when amphibian populations are perturbed by disease. *Journal of Applied Ecology*, 48:873–879.
- Mutschmann, F. (2015). Chytridiomycosis in amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 276-282.
- Muzio, R. N. (1995). *Estudio del aprendizaje asociativo en el anfibio anuro Bufo arenarum: aspectos comparados*. Tesis de Posgrado, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Obtenido de [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2716\\_Muzio.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2716_Muzio.pdf)
- Naciones Unidas. (1992). *Convenio sobre la Diversidad Biológica*.
- Narváez, D. A. (2014). *Determinación de la infección de Batrachochytrium dendrobatidis en el Cutín de Quito (Pristimantis unistrigatus) y su relación con la infección en renacuajos de la Rana Marsupial de Quito (Gastrotheca riobambae) en el Parque Metropolitano Guanguiltagua*. Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Newell, D.A., Goldingay, R.L. y Brooks. L.O. (2013). Population recovery following decline in an endangered stream-breeding frog (*Mixophyes fleayi*) from subtropical Australia. *PloS One* 8, DOI: 10.1371/journal.pone.0058559.

- Norwegian Scientific Committee for food and Environment (VKM); Nielsen, A; Dolmen, D; Höglund, J; Kausrud, K; Malmstrøm, M; Taugbøl, A; Vrålstad, T; Ytrehus, B; de Boer, H; Hindar, K; Kirkendall, L; Nilsen, E B; Rueness, E K; y Velle, G;. (2019). *Assessment of the risk to Norwegian biodiversity from the pathogenic fungi Batrachochytrium dendrobatidis (Bd) and Batrachochytrium salamandrivorans (Bsal)*. Norwegian Scientific Committee for food and Environment (VKM).
- Oficialdegui, F., Sánchez, M., Carcaño, C., Boyero, L., y Bosch, J. (2019). The invasive red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) increases infection of the amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *Biol Invasions*, 3221-3231.
- Olson, D., Aanensen, D., Ronnenberg, K., Powell, C., Walker, S., Bielby, J., y al. e. (2013). Mapping the Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the Amphibian Chytrid Fungus. *PLoS ONE*, 8(2), e56802. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056802>
- Parra, G., Burrowes, P., y Mendoza, C. (Marzo de 2015). Chytridiomycosis in amphibians from Mexico: a revision. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86, 238-248. doi:<https://doi.org/10.7550/rmb.42588>
- Pessier, A., y Mendelson, J. (2017). *Manual para el control de enfermedades infecciosas en las colonias de resguardo para anfibios y programas de reintroducción a la naturaleza*. UCN/SSC Conservation Breeding Specialist: Apple Valley, MN.
- Pessier, A., Nichols, D., Longcore, J., y Fuller, M. (1999). Cutaneous Chytridiomycosis in Poison Dart Frogs (*Dendrobates* spp.) and White's Tree Frogs (*Litoria Caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11(2), 194-199. doi:10.1177/104063879901100219
- Phyllott, A.D., Grogan, L.F., Cashins, S.D., McDonald, K.R., Berger, L. y Skerratt, L.F. (2013). Chytridiomycosis and seasonal mortality of tropical stream-associated frogs 15 years after introduction of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology*, 27:1058– 1068.

- Picheira, D. (2002). Dieta de *Batrachyla raeniata* (Girard, 1854) en poblaciones de Concepcion, Chile (Anura: Leptodactylidae). *Noticiero Mensual del Museo Nacional de Historia Natural*, 3-7.
- Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Laramie, M. B., y Waits, L. P. (2013). *Application of environmental DNA for inventory and monitoring of aquatic species (USGS Numbered Series No. 2012-3146)*. Reston, VA: U.S. Geological Survey. doi:<https://doi.org/10.3133/fs20123146>
- Piotrowski, j., Annis, S., y Longcore, J. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, 9-15.
- Pochon, X., Bott, N., Smith, K., y Wood, S. (2013). Evaluating Detection Limits of Next-Generation Sequencing for the Surveillance and Monitoring of International Marine Pests. *PLoS ONE*, 8(9), e73935. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073935>
- Pounds, J; Bustamante, M; Coloma, L; Consuegra, J; Fogden, M; Foster, P; La Marca, E; Masters, K; Merino-Viteri, A; Puschendorf, R; Ron, S; Sánchez-Azofeifa, G; Still, C; Young, B. (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 161-167.
- Prada, L., Franco, M., y Acosta, A. (2011). First record of *Saprolegnia* sp. in an amphibian population in Colombia. *Universitas Scientiarum*, 16(3), 234-242.
- Puschendorf, R., Hoskin, C.J., Cashins, S.D., McDonald, K., Skerratt, L.F., VanDer Wal, J. y Alford, R.A. (2011). Environmental refuge from disease-driven amphibian extinction. *Conservation Biology*, 25:956– 964.
- Puschendorf, R., Hodgson, L., Alford, R.A., Skerratt, L.F. y Van-Der Wal, J. (2013). Underestimated ranges and overlooked refuges from amphibian chytridiomycosis. *Diversity and Distributions*, 19:1313– 1321.
- Quispe, T. (2018). *Densidad y diversidad de anfibios anuros de Cacaotales de San Gabán y la Zona de amortiguamiento del Parque Nacional Bahuaja Sonene-Puno-Madre de Dios*. Puno: Universidad Nacional del Altiplano de Puno.
- Ramírez, M. A. (2010). *Detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* por medio de técnicas moleculares y microbiológicas en ensambles de anfibios en las*

*localidades de Santa María (Boyacá), Samaná (Caldas) y Guanentá (Boyacá).* Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.

Reglamento al Código Orgánico del Ambiente (RCOA). (12 de junio de 2019).

*Suplemento Registro Oficial No. 507.*

Relyea, R., y Diecks, N. (2008). An unforeseen chain of events: lethal effects of pesticides on frogs at sublethal concentrations. *Ecological Applications*, 1728-1742.

Riascos, Lenin; Geerts, Aurora; Oña, T; Goethals, P; Cevallos-Cevallos, J; Vanden Berghe, W; Volckaert, F; Bonilla, J; Muylaert, K; Velarde, E; Boets, P; Van der heyden, C. (2018). DNA-based monitoring of the alien invasive North American crayfish *Procambarus clarkii* in Andean lakes (Ecuador). *Limnologica*, 20-25.

Robinson, C., McNulty, S., y Titus, V. (2018). No Safe Space: Prevalence and Distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians in a highly-protected landscape. *Herpetological Conservation and Biology*, 373-382.

Rohr, J.R., Raffel, T.R., Blaustein, A.R., Johnson, P.T., Paull, S.H. y Young, S. (2013). Using physiology to understand climate-driven changes in disease and their implications for conservation. *Conservation Physiology* 1, DOI:10.1093/conphys/cot1022.

Romero, Z. (2018). Lineamientos estratégicos para la optimización del clima organizacional de la dirección sectorial de control de la administración descentralizada de la contraloría del Estado Mérida. *Conocimiento Global*, 56-69.

Ron, S. (2005). Predicting the Distribution of the Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *BIOTROPICA*, 209-221. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2005.00028.x>

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*, 116-126.

Ron, S. R., Merino-Viteri, A., y Ortiz, D. A. (3 de enero de 2021). *Anfibios del Ecuador*. Obtenido de Version 2021.0. Museo de Zoología, Pontificia

Universidad Católica del Ecuador:  
<https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb>>

- Ron, S., y Merino, A. (2000). Amphibian declines in Ecuador: Overview and first report of chytridiomycosis from South America. *Froglog*, 2-3.
- Ron, S., y Read, M. (2019). *Dendropsophus carnifex*. Obtenido de Anfibios del Ecuador. Versión 2021.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador:  
<https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Dendropsophus%20carnifex>
- Rowley, J.J.L. y Alford. R.A. (2013). Hot bodies protect amphibians against chytrid infection in nature. *Scientific Reports* 3, DOI:10.1038/srep01515.
- Rueda-Almonacid, J. V., Lynch, J. D., y Amézquita, A. (2004). *Libro rojo de los Anfibios de Colombia. Serie Libros rojos de especies amenazadas de Colombia. ICN-Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente. Conservación Internacional Colombia.*
- Ruibal, R. (1962). The adaptative value of bladder water in the toad, *Bufo cognatus*. *Physiological Zoology*, 35, 218-223.
- Ruppert, K. M., Kline, R. J., y Rahman, M. S. (2019). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, e00547.
- Salla, R F; Rizzi-Possignolo, G M; Oliveira, C R; Lambertini, C; Franco-Belussi, L; Leite, D S; Silva-Zacarin, E; Abdalla, F; Jenkinson, T; Toledo, L; Jones-Costa, M. (2018). Novel findings on the impact of chytridiomycosis on the cardiac function of anurans: sensitive vs. tolerant species. *PeerJ*, 6, e5891. doi:<https://dx.doi.org/10.7717/2Fpeerj.5891>
- Sánchez, D., Chacon-Ortiz , F., Leon, B., Han, y Lampo, M. (2008). Widespread occurrence of an emerging pathogen in amphibian communities of the Venezuelan Andes. *Biological Conservation*, 2898-2905.
- Savage, A.E., Sredl, M.J. y Zamudio, K.R. (2011). Disease dynamics vary spatially and temporally in a North American amphibian. *Biological Conservation*, 144:1910–1915.

- Scheele, BC; Pasmans, F; Skerratt, LF; Berger, L; Martel, A; Beukema, W; Acevedo, A; Burrowes, P; Carvalho, T; Catenazzi, A; De la Riva, I; Fisher, M; Flechas, S; Foster, C; Frías, P; Garner, T; Gratwicke, B; Guayasamin, J; Hirschfeld, M; ...; Canessa, S. (2019). Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science*, 363(6434), 1459-1463. doi:10.1126/science.aav0379.
- Seanna, A., Farahad, D., Heather, Z., Peter, D., y Joyce, L. (1 de Agosto de 2004). A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of wildlife diseases*, 40. doi:10.7589/0090-3558-40.3.420
- Secondi, J., Dejean, T., Valentini, A., Audebaud, B., y Miaud, C. (2016). Detection of a global aquatic invasive amphibian, *Xenopus laevis*, using environmental DNA. *Amphibia-Reptilia*, 131-136.
- Secretaría Nacional de Planificación. (2021-2025). *Plan de Creación de Oportunidades*.
- Shapard, E., Moss, A., y San Francisco, M. (2012). *Batrachochytrium dendrobatidis* can infect and cause mortality in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mycopathologia*, 121-126.
- Shoo, L.P. et al. (2011). Engineering a future for amphibians under climate change. *Journal of Applied Ecology*, 48:487–492.
- Skerratt, Lee F; Berger, Lee; Clemann, Nick; Hunter, Dave A; Marantelli, Gerry; Newell, David A; Philips, Annie; McFadden, Michael; Hines, Harry; Scheele, Ben; Brannelly, Laura; Speare, Rick; Versteegen, Stephanie; Cashins, Scott; West, Matt. (2016). Priorities for management of chytridiomycosis in Australia: saving frogs from extinction. *Wildlife Research*, 43(2), 105-120. doi:https://doi.org/10.1071/WR15071
- Smith, F. (2013). *The epidemiology of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the UK*. Thesis Doctoral.
- Solis, R., Lobos, S., Walker, M., Fisher, y Bosch, J. (2010). Presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in feral populations of *Xenopus laevis* in Chile. *Biology Invasions*, 1641-1646.

- Spitzen- van der Sluijs, A; Stark, T; Dejean, T; Verbrugghe, E; Herder, J; Gilbert, M; Janse, J; Martel, A; Pasmans, F; Valentini, A. (2020). Using environmental DNA for detection of *Batrachochytrium salamandrivorans* in natural water. *Environmental DNA*, 565-571. doi:<https://doi.org/10.1002/edn3.86>
- Stevenson, L.A., Alford, R.A., Bell, S.C., Roznik, E.A., Berger, L. y Pike, D.A. (2013). Variation in thermal performance of a widespread pathogen, the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS One* 8, DOI:10.1371/journal.pone.0073830.
- Stockwell, M.P., Clulow, J. y Mahony, M.J. (2012). Sodium chloride inhibits the growth and infective capacity of the amphibian chytrid fungus and increases host survival rates. *PLoS One* 7, DOI: 10.1371/journal.pone.0036942.
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L. y Waller, R.W. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306:1783– 1786.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabae, M., y Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 1789-1793.
- Tedersoo, L; Sánchez-Ramírez, U; Kõljalg, M; Baharam, M; Döring, D; Schingel, T; May, T; Ryberg, M; Abarenkov, K. (2018). High-level classification of the Fungi and tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity*, 135-159.
- Troya, J. (2017). *Evaluación del potencial bioindicador de los anfibios en la Laguna Cuicocha cantón Cotacachi Provincia de Imbabura*. Tesis de Pregrado, Pontificia Universidad Católica dle Ecuador Sede Ibarra.
- Twardochleb, L. A., Olden, J. D., y Larson, E. R. (2013). A global meta-analysis of the ecological impacts of nonnative crayfish. *Freshwater Science*, 4(32), 1367-1382. Obtenido de <https://doi.org/10.1899/12-203.1>
- Van Rooij, P., Martel, A., Haesebrouck, F., y Pasmans, F. (2015). Amphibian chytridiomycosis: a review with focus on fungus-host interactions. *Veterinary Research*, 46(1), 137. doi:10.1186/s13567-015-0266-0.
- Vasconcelos, J. (2009). *Guía técnica para elaborar o actualizar lineamientos*.

- Vásquez, A., Bahamón, P., Prada, L. D., y Franco, M. (2012). Detección y cuantificación de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios de las regiones andina central, oriental, Orinoquia y Amazonía de Colombia. *Herpetotropicos*, 8(1-2), 13-21.
- Velázquez, B., Castro, F., Bolívar, W., y Herrera, M. (2008). Infección por el hongo quitrido *Batrachochytrium dendrobatidis* en anuros de la Cordillera Occidental de Colombia. *Herpetotropicos*, 65-70.
- Venesky, M.D., Raffel, T.R., McMahon, T.A. y Rohr, J.R. (2013). Confronting inconsistencies in the amphibian-chytridiomycosis system: implications for disease management. *Biological Reviews*, DOI: 10.1111/brv.12064.
- Viáfara, R., Castro, F., y Cárdenas, H. (2020). Detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* (Chytridiomycota) en localidades del Valle del Cauca por técnica de PCR. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 81-89.
- Vizcaíno, M., Barnes, C., y Ordonez, M. (2013). Estructuración genética de muestras del hongo *Batrachochytrium dendrobatis* en Ecuador. *Revista ecuatoriana de medicina y ciencias biológicas*, 47-61. doi:10.26807/remcb.v34i1-2.235
- Vogt, R. C., y Hine, R. L. (1982). *Evaluation of techniques for assessment of amphibian and retile population in Wisconsin*. Washington, D.C.: U.S. Fish y Wildlife Research Report 13.
- Voyles, J., Rosenblum, E. B., y Berger, L. (2011). Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity. *Microbes and infection*, 13(1), 25-32. doi:10.1016/j.micinf.2010.09.015
- Vredenburg, V. (2004). Reversing introduced species effects: experimental removal of introduced fish leads to rapid recovery of a declining frog. *roceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 7646-7650.
- 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 of the United States of America*, 107:9689– 9694.

- 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. *PNAS vol. 105*, 11466-11473.
- Wake, D., y Koo, M. (2018). Amphibians. *Current Biology*, R1237-R1241. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.09.028>.
- Walker, R. S., Novarro, A. J., y Nichols, J. D. (2000). Consideraciones para la estimación de abundancia de poblaciones de mamíferos. *Journal of Neotropical Mammalogy*(7), 73-80.
- 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), 2100-2105. doi:10.3201 / eid1012.030804
- Wilcox, T. M., McKelvey, K. C., Young, M. K., Jane, S. F., Lowe, W. H., Whiteley, A. R., y Schwartz, M. K. (2013). Robust Detection of Rare Species Using Environmental DNA: The Importance of Primer Specificity. *PLoS ONE*, 8(3), e59520. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059520>
- Wright, K., y Whitaker, B. (2001). *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. Krieger Publishing Company, Malabar.
- Yáñez, M., Páez, N., Frenkel, C., Varela, A., y Ron, S. (2018). *Pristimantis actites*. Obtenido de Anfibios del Ecuador. Versión 2021.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Pristimantis%20actites>
- Yáñez, P., y Estupíñán, S. (2016). Actividades antropogénicas y la dinámica de la quitridiomycosis como enfermedad infecciosa de anfibios neotropicales. *Biodiversidad y Conservación*, 125-133.
- Young, S., Speare, R., Berger, L. y Skerratt. L.F. (2012). Chloramphenicol with fluid and electrolyte therapy cures terminally ill green tree frogs (*Litoria caerulea*) with chytridiomycosis. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 43:330–337.
- Young, B., Stuart, S., Chanson, J., Cox, N., y Boucher, T. (2004). Joyas que están desapareciendo. El Estado de los Anfibios en el Nuevo Mundo. *Nature Serve*, 53.

- Wobeser, G. (2007). *Disease in wild animals: investigation and management*. Springer, Berlin.
- Woodhams, D., Bosch, J., Briggs, C., Cashins, S., Davis, L., Lauer, A., Muths, E., Puschendorf, R., Schmidt, B., Sheafor, B., y Voyles, J. (2011). Mitigating amphibian disease: strategies to maintain wild populations and control chytridiomycosis. *Frontiers in Zoology* 8, DOI:10.1186/1742-9994-1188-1188.
- Woodhams, D.C., Geiger, C.C., Reinert, L.K., Rollins-Smith, L.A., Lam, B.R., Harris, N., Briggs, C.J., Vredenburg, V.T. y Voyles, J. (2012). Treatment of amphibians infected with chytrid fungus: learning from failed trials with itraconazole, antimicrobial peptides, bacteria, and heat therapy. *Diseases of Aquatic Organisms*, 98:11.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Ubicación y elevación de los anuros muestreados en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi

Código	Ubicación		Elevación	Especie
	Coord. X	Coord. Y		
<b>R1</b>	786010	10040956	2335	<i>Pristimantis actites</i>
<b>R2</b>	786598	10041649	2360	<i>Pristimantis sp.</i>
<b>R3</b>	786635	10041535	2352	<i>Pristimantis actites</i>
<b>R4</b>	786931	10041210	2452	<i>Pristimantis hectus</i>
<b>R5</b>	786993	10041099	2493	<i>Pristimantis actites</i>
<b>R6</b>	786990	10041159	2492	<i>Pristimantis actites</i>
<b>R7</b>	787063	10041042	2446	<i>Pristimantis actites</i>
<b>R8</b>	786931	10041381	2452	<i>Pristimantis actites</i>
<b>R9</b>	787261	10041593	2431	<i>Pristimantis actites</i>
<b>R10</b>	786561	10041293	2354	<i>Dendropsophus carnifex</i>
<b>R11</b>	786539	10041365	2353	<i>Dendropsophus carnifex</i>
<b>R12</b>	786693	10041296	2371	<i>Pristimantis actites</i>
<b>R13</b>	786614	10041365	2362	<i>Pristimantis actites</i>
<b>R14</b>	788040	10041285	2372	<i>Pristimantis actites</i>

*Nota.* La tabla anexo muestra los anuros que se muestrearon in situ, siendo un total de 14 individuos pertenecientes a cinco especies. Asimismo, detalla las coordenadas y altitud en las que fueron halladas.

**Anexo 2.** Resultados del muestreo de *Bd* en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi

**Anexo 2.1.** Resultados del muestreo basado en ADN de *Bd* extraído en muestras de agua con 3 réplicas

<b>Código de muestras</b>	<b>Sitio / Cobertura vegetal</b>	<b>Réplica 1</b>	<b>Réplica 2</b>	<b>Réplica 3</b>	<b>Sumatoria de réplicas</b>	<b>Resultado del muestreo</b>
R1	Bosque nativo	1	1	1	3	+
R2	Vegetación arbustiva	1	1	1	3	+
R3	Vegetación arbustiva	1	0	0	1	-
R4	Bosque nativo	1	1	1	3	+
R5	Bosque nativo	1	1	1	3	+
R6	Bosque nativo	1	1	1	3	+
R7	Bosque nativo	1	1	1	3	+
R8	Bosque nativo	1	1	1	3	+
R9	Vegetación arbustiva	1	1	1	3	+
R10	Vegetación arbustiva	1	1	1	3	+
R11	Vegetación arbustiva	0	1	1	2	+
R12	Vegetación arbustiva	1	1	1	3	+
R13	Vegetación arbustiva	1	1	1	3	+
R14	Vegetación arbustiva	1	1	1	3	+
<b>Total</b>		<b>13</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>39</b>	<b>13</b>

*Nota.* La tabla muestra el resultado que se obtuvo de las tres réplicas de PCR con ADN aislado de cada una de las muestras de hisopados en piel de anuros de en la Reserva Siempre Verde, donde las 6 muestras resultaron para *Bd*, donde se muestra que R1, R2, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13 y R14 resultaron positivas, mientras que R3 resulto negativa para *Bd*.

**Anexo 2.2.** Resultados del muestreo basado en ADN de *Bd* extraído en muestras de agua con 3 réplicas

<b>Código de muestra</b>	<b>Sitio</b>	<b>Elevación (m s. n. m.)</b>	<b>Réplica 1</b>	<b>Réplica 2</b>	<b>Réplica 3</b>	<b>Sumatoria de réplicas</b>	<b>Resultado del muestreo</b>
<b>a</b>	Riachuelo truchas 1	2 451	1	1	1	3	+
<b>b</b>	Truchas	2 438	1	1	1	3	+
<b>c</b>	Riachuelo truchas 2	2 442	1	1	1	3	+
<b>d</b>	Punto abejas	2 460	1	1	1	3	+
<b>e</b>	Punto pantano	2 407	1	1	1	3	+
<b>f</b>	Río	2 422	1	1	1	3	+
<b>Total</b>			<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>18</b>	<b>6</b>

*Nota.* La tabla muestra el resultado que se obtuvo de las tres réplicas de PCR con el ADN aislado de cada una de las muestras de agua tomadas en la Reserva Siempre Verde, donde las 6 muestras resultaron para *Bd*

**Anexo 3. Cronograma de actividades para el muestreo de *Bd***

<b>Cronograma de actividades para el muestreo de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i></b>													
Actividad	Meses	Mes 1				Mes 2				Mes 3			
		Semanas	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3
<b>1.</b> Preparación del material		■											
<b>2.</b> Control positivo (rana o piel de rana con <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> )		■	■										
<b>3.</b> Muestreo de campo y filtración en el laboratorio				■	■	■							
<b>4.</b> Aislamiento de ADN de muestras ambientales							■	■					
<b>5.</b> Reacción en la cadena de la polimerasa (PCR)									■	■			
<b>6.</b> Validación de resultados (secuenciación)													■
Informe final													■

**Anexo 4.** Costos de equipamiento y muestreo de *Bd*

<b>Costos de equipamiento y muestreo</b>	
<b>Tipo</b>	<b>Total</b>
<b>Oficina</b>	
Computadora portátil	\$850,00
Impresora	\$300,00
Material de oficina	\$50,00
<b>Campo</b>	
Cámara fotográfica	\$200,00
GPS	\$500,00
Coolers	\$50,00
Refrigerantes	\$250,00
Botellas de vidrio	\$60,00
Material adicional	\$70,00
4 baldes de 5 galones o 20 litros (+)	\$16,00
<b>Laboratorio</b>	
Pinzas	\$20,00
Micropipetas	\$800,00
Bomba de vacío	
Vórtex	\$200,00
Baño maría	\$200,00
Termociclador Eppendorf	\$15.000,00
Cámara de electroforesis	\$1.200,00
Transiluminador	\$1.200,00
Congelador -20C	\$8.000,00
Balanza digital	\$2.000,00
Kit de EPICENTRE 300 aislamientos	\$650,00
Etanol	\$50,00
Syber Safe	\$200,00
Gel ultra puro	\$50,00

Ladder 100pb	\$50,00
Environmental Taq	\$450,00
Wizard SV Gel and PCR 100 muestras	\$350,00
Tubos de 100 ul y 1.5 ml	\$40,00
Puntas para pipetas	\$300,00
<b>Gastos Adicionales</b>	
Movilidad	\$100,00
Hospedaje (12 noches)	\$360,00
Costos de Secuenciación por muestras (c/u)	\$7,00
<b>Subtotal</b>	<b>\$33.573,00</b>
<b>Gastos imprevistos 10%</b>	<b>\$3.357,30</b>
<b>Total</b>	<b>\$36.930,30</b>

**Anexo 5.** Anexo fotográfico de trabajo en campo y trabajo en laboratorio

**Anexo 5.1.** Colecta de muestras de agua en el río Toabunche, en la Reserva Siempre Verde-Cotacachi



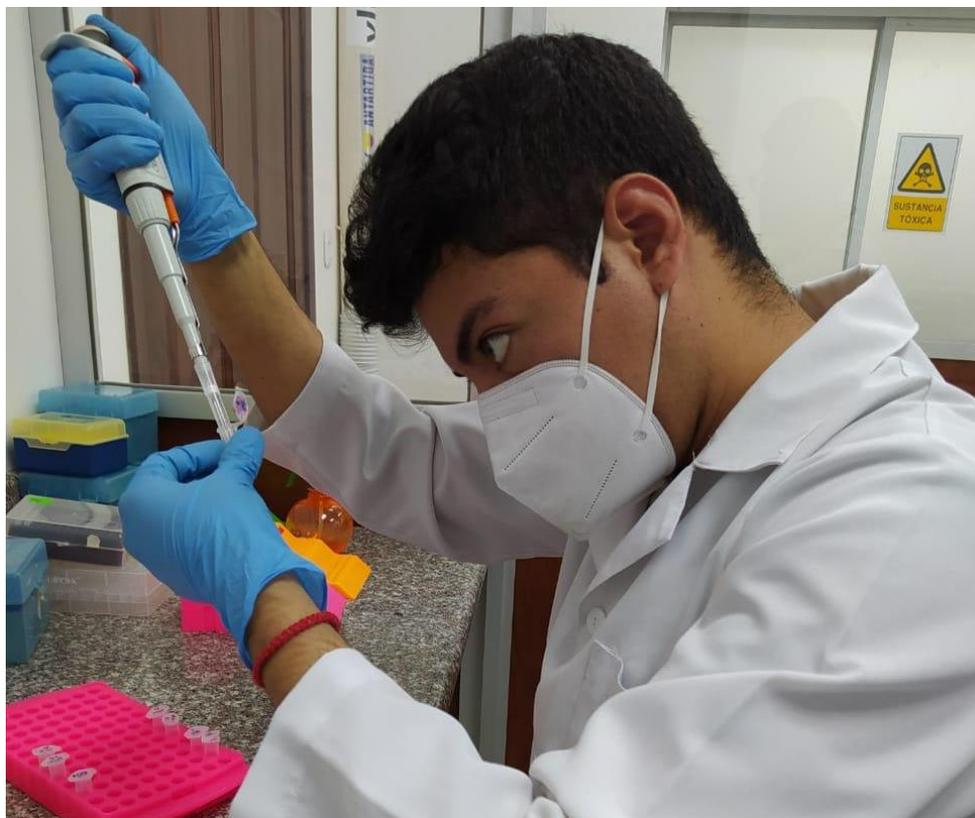
**Anexo 5.2.** Colecta de muestras de agua en estanque de truchas de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi



**Anexo 5.3.** Muestreo mediante hisopados en piel de un individuo de la especie *Pristimantis actites*



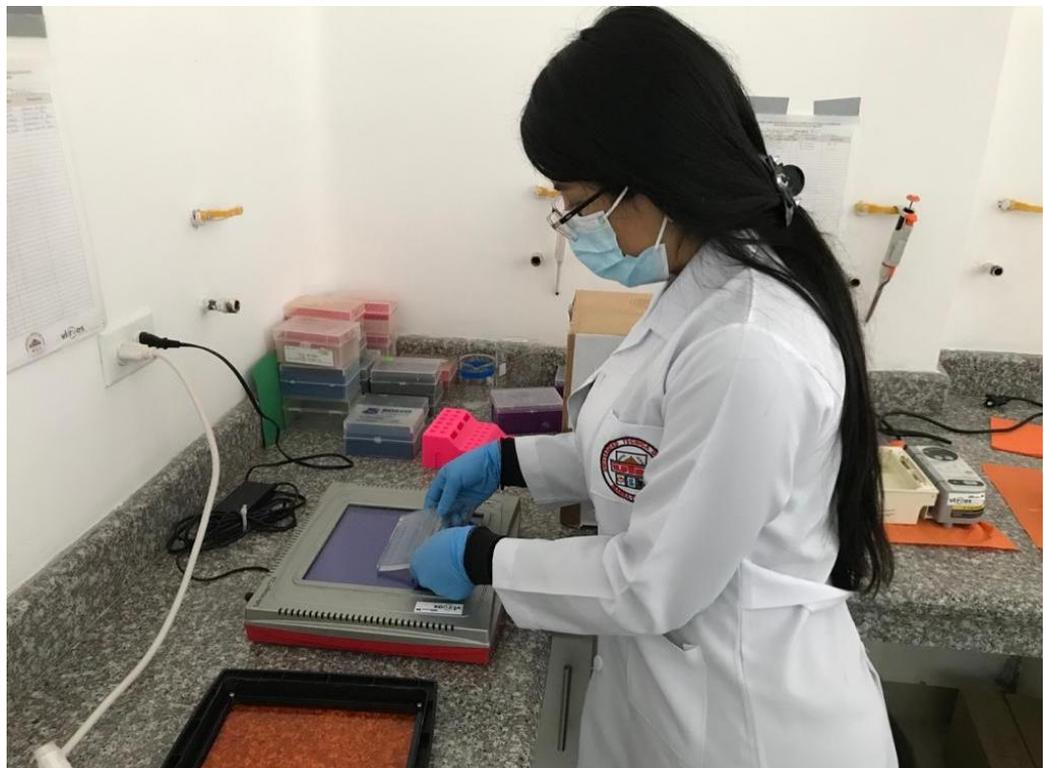
**Anexo 5.4.** Extracción y aislamiento de ADN de *Batrachochytrium dendrobatidis*



**Anexo 5.5.** Reacción en la Cadena de la Polimerasa (PCR) con cebadores específicos de *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Bd\_rv.2* y *Bd\_fw.2*

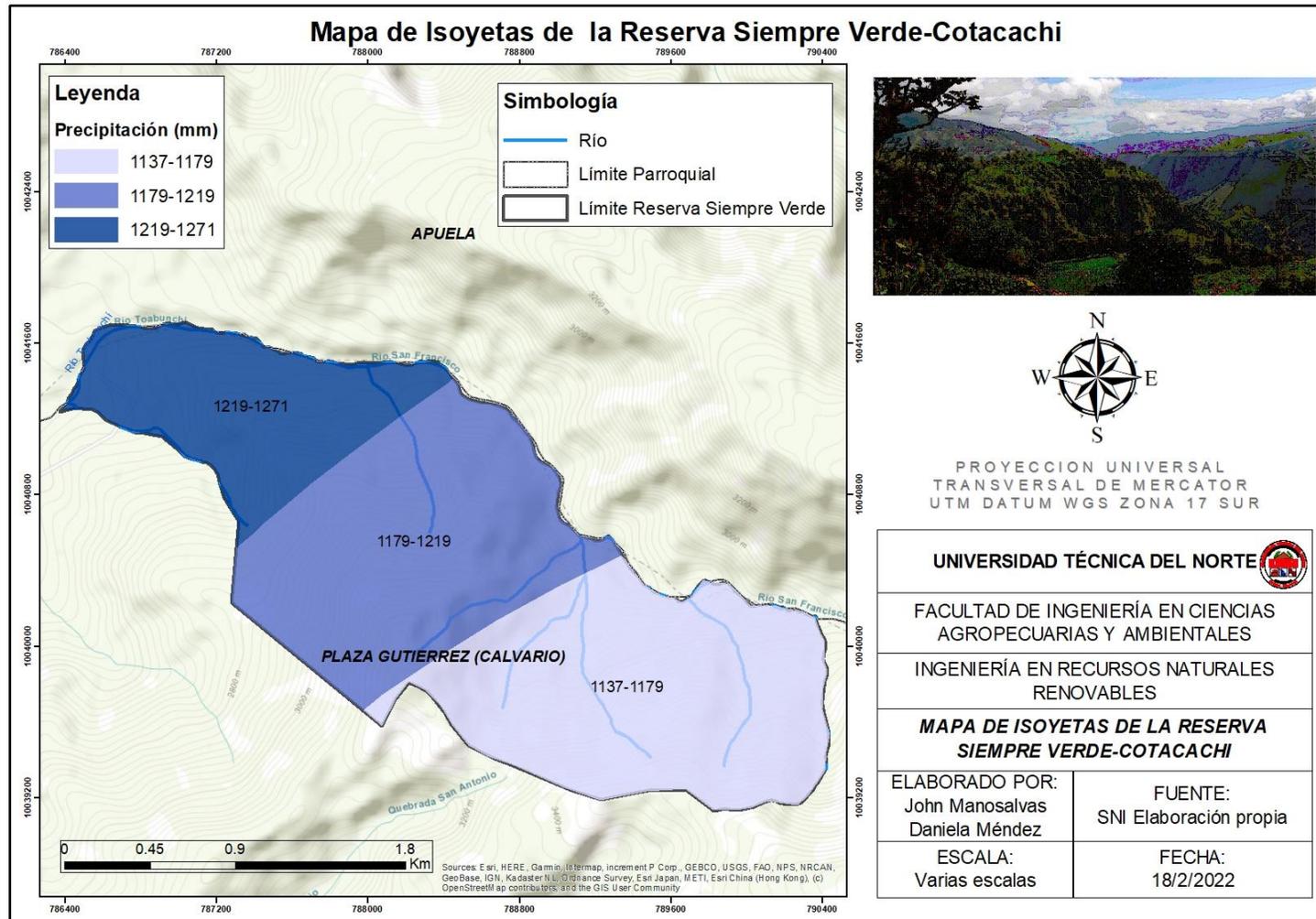


**Anexo 5.6.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñida con SYBR Green con resultados de la PCR con los cebadores específicos de *Batrachochytrium dendrobatidis* *Bd\_rv.2* y *Bd\_fw.2*

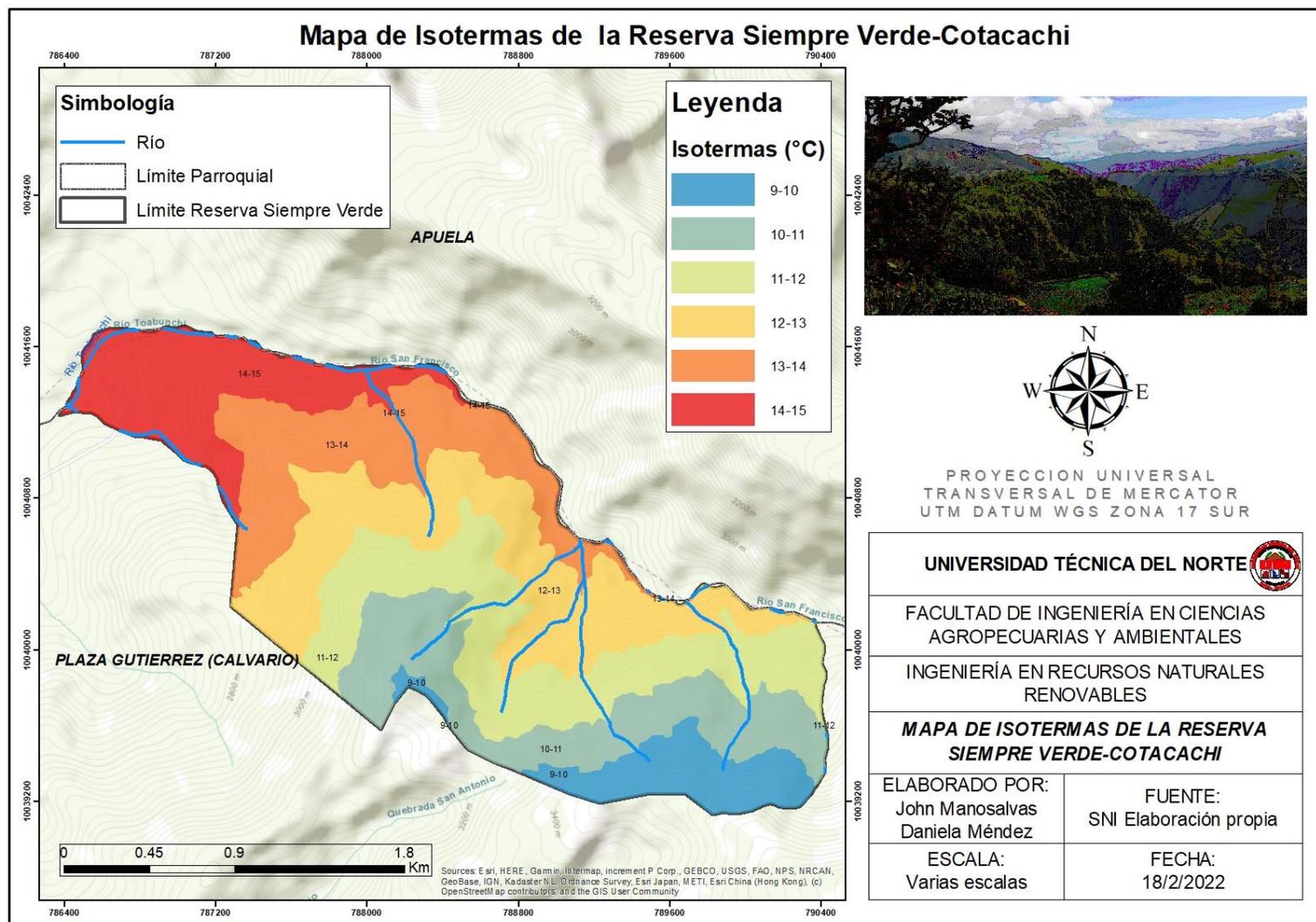


## Anexo 6. Mapas de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi

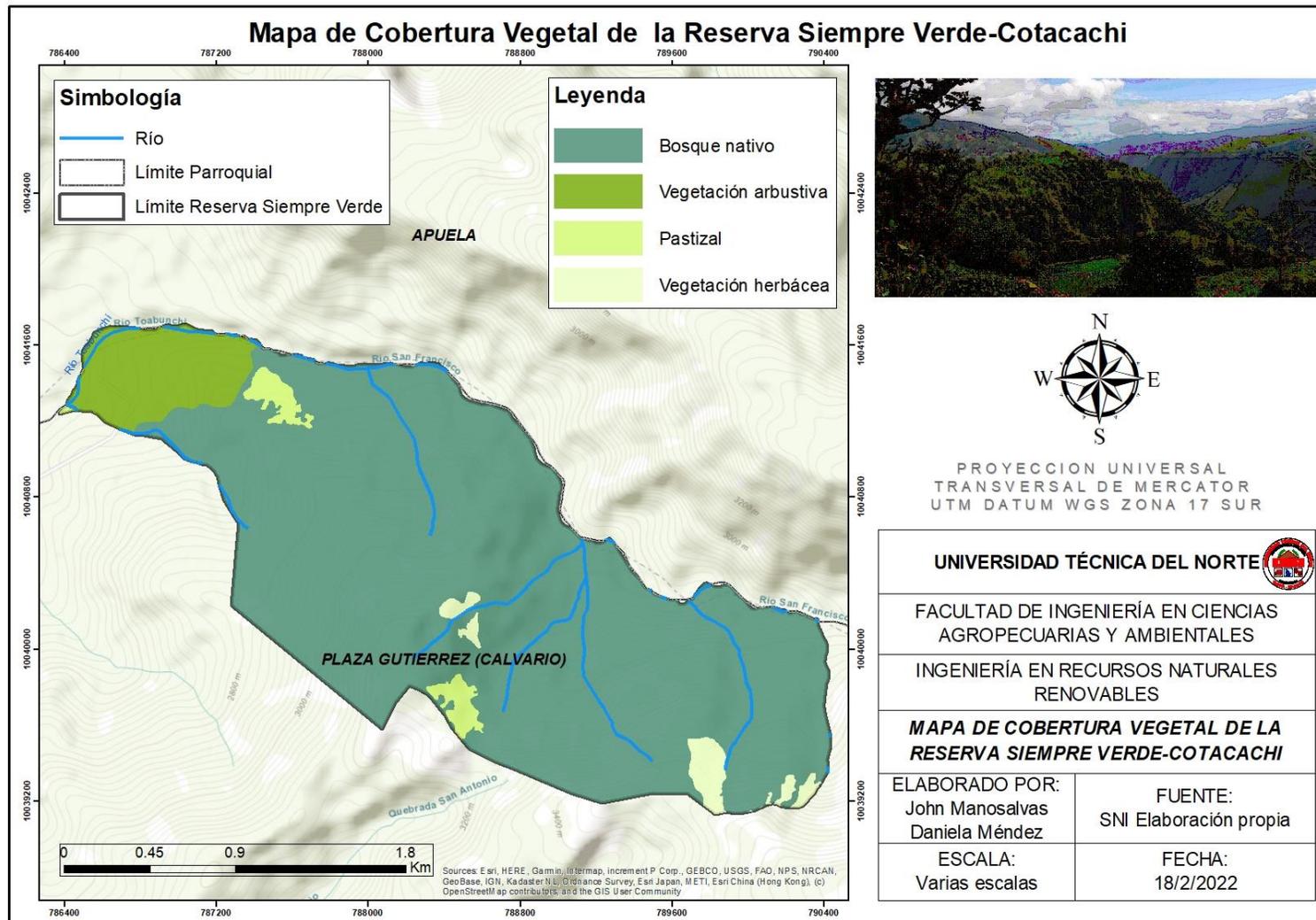
### Anexo 6.1. Mapa de precipitación media anual (mm) de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi



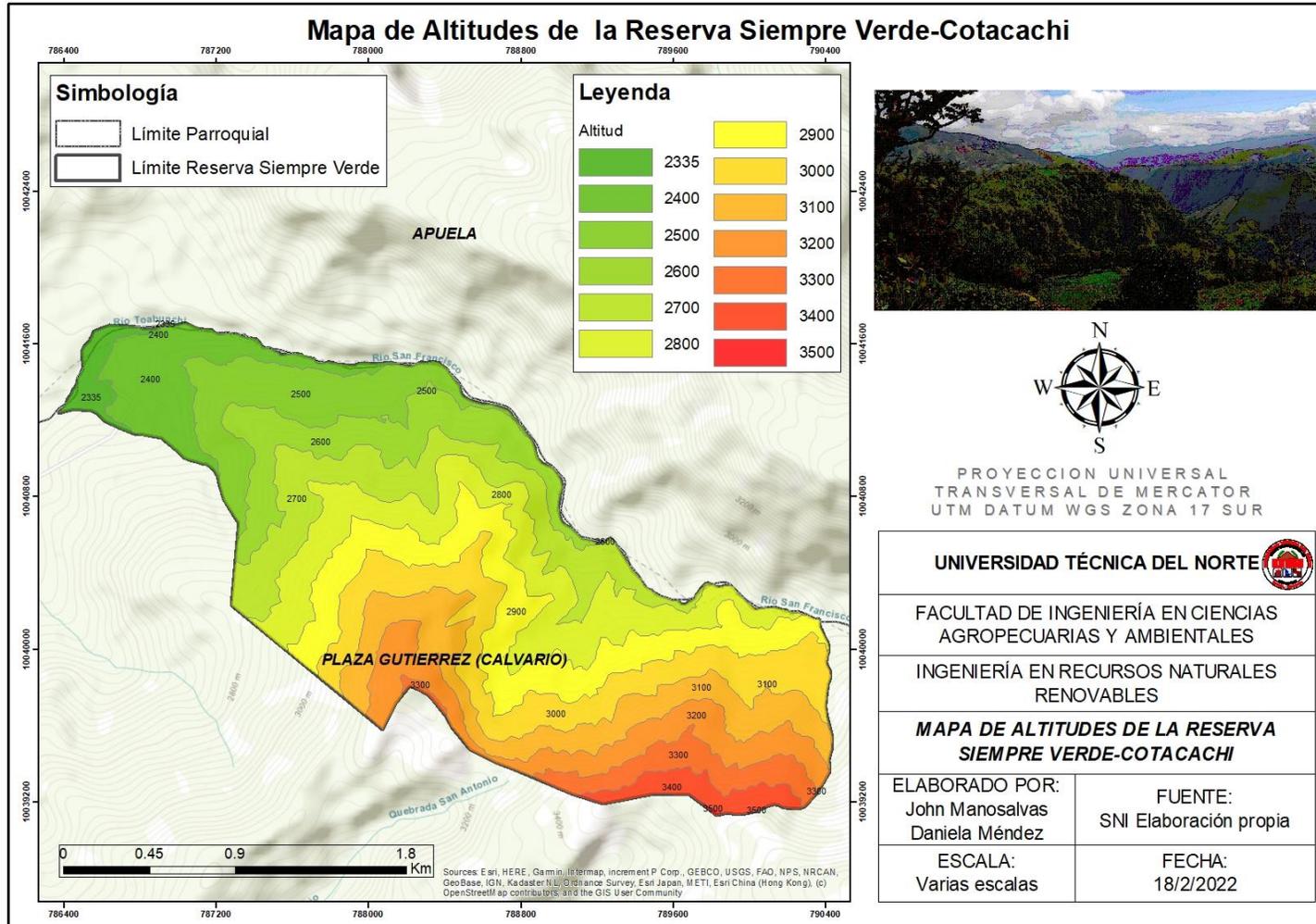
Anexo 6.2. Mapa de temperatura media anual (°C) de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi



Anexo 6.3. Mapa de cobertura vegetal de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi



Anexo 6.4. Mapa de altitudes (m s.n.m) de la Reserva Siempre Verde-Cotacachi



Anexo 7. Infografías sobre “Lineamientos de manejo de *Bd* en anuros de la Reserva Siempre Verde”

Anexo 7.1. Manipulación ambiental para reducir la quitridiomycosis en el ambiente

## ¿QUÉ ES LA QUITRIDIOMICOSIS?

Es una enfermedad producida por el hongo cutáneo *Batrachochytrium dendrobatidis*, vinculada con la extinción masiva de anuros en todo el mundo. En Ecuador se ha detectado en once provincias, entre las cuales consta Imbabura.



### ¿QUÉ PODEMOS HACER PARA EVITAR LA PÉRDIDA DE ANUROS POR ESTA ENFERMEDAD?

Presentamos los siguientes lineamientos de manejo:



#### ELIMINACIÓN DE PARCHES DE VEGETACIÓN

Disminuir el sombreado para crear sitios con mayor cantidad de radiación solar.



#### AGUA TIBIA POCO PROFUNDA PARA RENACUAJOS

De 5 - 17 °C y 25 - 28 °C el crecimiento del hongo es lento, por lo tanto la enfermedad disminuye. Por encima de los 30 °C el hongo muere y la mortalidad es más rápida por encima de los 37 °C.



#### FUENTES DE CALOR ARTIFICIAL EN TODAS LAS ETAPAS DE VIDA ELIMINAN LA ENFERMEDAD



#### AUMENTAR LA TEMPERATURA EN HÁBITATS TERRESTRES

Los anuros deben ser expuestos al sol durante 1 h a 33 °C.



## UTILIZAR SALES Y FUNGICIDAS



El tiofanato-metilo, y General Tonic (acriflavina/azul de metileno) son útiles para eliminar la quitridiomycosis en condiciones de laboratorio.

Determinar previamente las concentraciones, tasas de aplicación y evaluar posibles efectos secundarios.

## BIOAUMENTO CON BACTERIAS

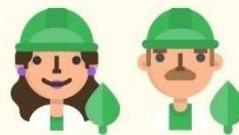
Inoculación de anuros anfitriones o hábitats con microbios que producen metabolitos que impiden el crecimiento y supervivencia de la quitridiomycosis.



## PROGRAMAS DE VIGILANCIA DE ENFERMEDADES DE ANUROS CON ÉNFASIS EN QUITRIDIOMICOSIS

Obtener información actualizada de la incidencia, localización, repercusión y la cuantificación de la quitridiomycosis para implementar acciones de control y prevención oportuna.

- Vigilancia pasiva: recopilación de información epidemiológica por actores como laboratorios, universidades, Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE), entre otros.



- Vigilancia activa: generación de información por medio de toma de muestras y registro de información epidemiológica.



## MINIMIZAR OTRAS FUENTES DE MORTALIDAD



Es importante proteger el hábitat de las especies amenazadas por quitridiomycosis y minimizar los impactos humanos como la caza, colección y degradación del hábitat.



## MANEJAR OTROS PROCESOS AMENAZADORES

- Evitar introducir especies, pues estas pueden influir en el incremento de mortalidad de anuros.
- Evaluar detenidamente la competencia simpátrica y depredación de anuros.
- Reducir los impactos de otras enfermedades que afectan a los anuros.



## EVITAR O REDUCIR EL IMPACTO DE EXTREMOS CLIMÁTICOS

Para minimizar los efectos de la sequía, los hábitats de reproducción de anuros pueden manipularse para reducir la mortalidad de adultos mediante la creación de refugios húmedos.



## Anexo 7.2. Introducción de anuros en entornos desfavorables para quitridiomycosis

### INTRODUCCIÓN DE ANUROS EN ENTORNOS DESFAVORABLES PARA QUITRIDIOMICOSIS



Cuando la quitridiomycosis no se puede controlar *in situ*, las translocaciones se pueden usar para mover a los anuros a lugares libres de la enfermedad cerca de su área de distribución.

Por ejemplo en partes altas de montaña, fuentes de agua, refugios en elevaciones más bajas y hábitat más seco.

### TRANSLOCACIONES DE ANUROS A AMBIENTES DESFAVORABLES PARA EL DESARROLLO DE QUITRIDIOMICOSIS



Son bastante prometedoras pero pueden tener consecuencias no deseadas, y los beneficios y riesgos potenciales requieren una evaluación cuidadosa.

Seguir protocolos de bioseguridad para mitigar el riesgo de propagación de enfermedades y brotes posteriores.



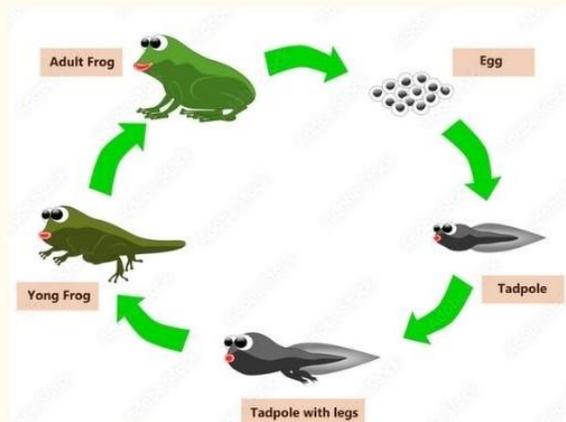
## INTRODUCCIÓN DE ANUROS PARA AUMENTAR LA CAPACIDAD DE AMORTIGUAMIENTO DE LAS POBLACIONES

Incorporar individuos criados en cautiverio a las poblaciones silvestres tiene una ventaja inicial y el aumento de la población.



La ventaja es criar individuos recolectados en la naturaleza, huevos o renacuajos, hasta una edad óptima para la liberación, así se permitirá la supervivencia durante períodos de mortalidad alta.

## ETAPAS DE VIDA DONDE LA QUITRIDOMICOSIS ES UNA MAYOR AMENAZA



Identificar las etapas de vida donde la quitridiomycosis está amenazando a la población, esto ayudará a regresar a la vida silvestre individuos tratados.

## CREACIÓN DE UN NUEVO HÁBITAT PARA LOS ANIMALES TRASLADADOS

Se pueden incorporar cuando los sitios receptores no están disponibles y la manipulación del hábitat no es posible.



## Anexo 7.3. Conservación *ex situ* de anuros

### CONSERVACIÓN *EX SITU* DE ANUROS



Para las especies que dependen de colonias cautivas es importante mantener la diversidad genética de los individuos en cautiverio.

La selección directa en cautiverio implica la exposición de anuros al hongo quitrido y la reproducción de individuos sobrevivientes.

### UTILIZACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS



Podrían usarse para identificar individuos resistentes para la reproducción; individuos potencialmente resistentes que sobrevivan en la naturaleza bajo la selección natural.

La presión de selección debe ser moderada y es importante desarrollar tratamientos para eliminar la quitridiomycosis en situaciones de emergencia.



### USO DE TRATAMIENTOS QUÍMICOS

El itraconazol es el tratamiento químico más utilizado. El voriconazol, cloranfenicol, y el clorhidrato de terbinafina también son una alternativa.

Se necesita una optimización específica de especie para estos tratamientos dada su posible toxicidad y se debe considerar que no eliminar la infección permite el desarrollo de resistencia a medicamentos.



**ESTABLECER UN BANCO DE RECURSOS GENÉTICOS DE LAS ESPECIES DE ANUROS**

## Anexo 7.4. Elección de la estrategia y protocolo de bioseguridad

### ELECCIÓN DE LA ESTRATEGIA



La elección de la estrategia depende de una comprensión de la dinámica de la enfermedad y la ecología de las especies.

Las intervenciones deben enfocarse en las etapas de la historia de vida de los anuros. Se necesitan estudios ecológicos para identificar brotes, disminuciones en curso y priorizar poblaciones de alto riesgo.

Dada la falta de estrategias efectivas comprobadas, todas las intervenciones deben implementarse dentro de un marco experimental.



### PROTOCOLO DE BIOSEGURIDAD PARA EL MUESTREO DE ANUROS



- Planificar visitas, y empezar con localidades que todavía no han sido infectadas.
- Desinfectar el equipo de campo: redes, mangas, trampas, botas, ruedas de vehículos y cualquier material que hayan estado en contacto con el agua en zonas de infección, utilizar lejía al 4%, formol al 40%, etanol al 70% o amonio.
- El transporte de animales debe realizarse con los individuos dentro de bolsas individuales con aire y sustrato húmedo.
- Al manipular cadáveres y animales moribundos usar guantes, que deberán ser desechados y destruidos como "desechos contaminados".
- Cualquier instrumento utilizado en campo o laboratorio debe desinfectarse sumergiéndolos en etanol al 70% durante 30 min.

## Anexo 7.5. Protocolo de curación de quitridiomycosis en anuros

### PROTOCOLO PARA LA CURACIÓN DE QUITRIDIOMICOSIS EN ANUROS



El objetivo es prevenir y minimizar los efectos de la quitridiomycosis cuando se esté trabajando con anuros en vida libre en la Reserva Siempre Verde.

El protocolo está dirigido a herpetólogos, veterinarios, conservacionistas, biólogos, investigadores, ambientalistas y/o aficionados a la herpetología.



### TRATAMIENTO CON ITRACONAZOL

Una vez diagnosticada la enfermedad, bañar a las ranas contagiadas por cinco minutos cada día, durante 11 días, con una suspensión de itraconazol (antimicótico) al 0.01% en solución salina al 0.6%.

También es recomendable aplicar una pomada cutánea de itraconazol.

Antes de aplicar, considerar que este tratamiento ha resultado ser tóxico para renacuajos y algunas ranas recién metamorfoseadas.

