

DETECCIÓN DE *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS* (CHYTRIDIOMYCOTA) EN LOCALIDADES DEL VALLE DEL CAUCA POR TÉCNICA DE PCR

DETECTION OF *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS* (CHYTRIDIOMYCOTA) IN LOCALITIES OF VALLE DEL CAUCA BY PCR TECHNIQUE

RONALD ANDRÉS VIÁFARA VEGA^{1,2,*}, FERNANDO CASTRO HERRERA² Y HEIBER CÁRDENAS HENAO^{1,3}

¹Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología, Universidad del Valle, Santiago de Cali 76001, Colombia.

²Grupo de investigación Laboratorio de Herpetología, Escuela de Ciencias Básicas, Universidad del Valle, Santiago de Cali 76001, Colombia.

³Grupo de Estudios Ecogenéticos y de Biología Molecular, Departamento de Biología, Universidad del Valle, Santiago de Cali 76001, Colombia.

*Correspondence: ronaldv2507@hotmail.com

Abstract.— Chytridiomycosis caused by the *Batrachochytrium dendrobatidis* fungus is one of the most important infectious diseases in amphibians in recent times. Since its discovery in 1999, the fungus has been recorded in multiple locations around the world and has been responsible for the decline of global amphibian populations. The objective of this work was to examine the presence of the fungus in seven locations in Valle del Cauca using the PCR technique. We sampled fungal presence in seven locations in Valle del Cauca by taking amphibian epithelium samples via swabbing. Samples were transported to the laboratory where PCR technique and specific primers were used to detect the presence or absence of *Batrachochytrium dendrobatidis* zoospores. Of the 241 samples analyzed, four were positive for the disease, all found in the Chicoral locality in La Cumbre municipality and belonging to the Craugastoridae family: *Pristimantis palmeri*, *P. erythropleura*, *P. orpacobates* and *P. calcaratus*. This work identifies a new locality in the Valle de Cauca department that is infected by chytridiomycosis, as well as two new species reported with the infection; Further studies in other localities within the department are needed to search new sites of infection.

Keywords.— Amphibians, chytridiomycosis, population decline, skin-swabbing.

Resumen.— Actualmente, una de las causas de la declinación de anfibios en el mundo son las enfermedades infecciosas, y entre ellas, la quitridiomycosis producida por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* es una de las más importantes. Desde su descubrimiento, el hongo ha sido registrado en múltiples lugares en todo el mundo, convirtiéndolo en un foco de estudio si se desea conservar las especies de anfibios. Con el fin de examinar la presencia del hongo en el Valle del Cauca mediante la técnica de PCR, en este trabajo se muestrearon siete localidades del Valle del Cauca. A partir de muestras de epitelio de anfibios por raspado con hisopos se detectó la presencia o ausencia de zoosporas de *Batrachochytrium dendrobatidis* por medio de la técnica PCR. De las 241 muestras analizadas (40 especies), cuatro resultaron positivas para la enfermedad, todas ubicadas en la localidad de Chicoral, municipio La Cumbre, y pertenecientes a la familia Craugastoridae: *Pristimantis palmeri*, *P. erythropleura*, *P. orpacobates* y *P. calcaratus*. Se agrega una nueva localidad infectada con quitridiomycosis al departamento de Valle de Cauca y dos nuevas especies reportadas con la infección, por lo que es necesaria la realización de muestreos en otros lugares en la búsqueda de nuevos sitios infectados.

Palabras clave.— Anfibios, declinación poblacional, muestreo de hisopado, quitridiomycosis.

INTRODUCCIÓN

Desde hace varios años se ha observado una rápida y constante disminución en las poblaciones de anfibios en todo el mundo, llegando al grado de que un 40% de las especies descritas se encuentran en algún grado de amenaza (Pechmann & Wilbur, 1994; Houlahan et al., 2000; Alford et al., 2001; IUCN 2019). Las principales causas de este declive son la pérdida de hábitat, la sobreexplotación, las especies introducidas, el cambio climático, la contaminación química y las enfermedades infecciosas (Young et al., 2001; Heatwole, 2013). Dentro de las enfermedades infecciosas, el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Longcore et al., 1999), ha sido reportado como una de las principales causas de pérdida de anfibios en bosques lluviosos de Australia y Centroamérica, y en general, esparciéndose rápidamente a muchos ecosistemas del mundo, afectando a diferentes poblaciones de anfibios (Berger et al., 1998).

Este hongo se dispersa por medio del agua, donde se movilizan sus zoosporas y una vez, al llegar a un huésped, la zoospora se enquistas y penetra en la epidermis empezando a alimentarse de la queratina, lo que inhibe el transporte de electrolitos en el organismo, llevándolo a un desequilibrio osmótico y paros cardiacos hasta su muerte (Berger et al., 2005a). El diagnóstico incluye hiperplasia, hiperqueratinosis y enrojecimiento de las partes afectadas, sobre todo la ingle, las extremidades, las membranas interdigitales y el vientre (Berger et al., 2005a). La detección de la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd.* en adelante) puede realizarse por análisis histológico de los individuos infectados, ya sea recién recolectados o fijados en formol y preservados en alcohol al 70% (Berger et al., 1999), o mediante la técnica de PCR, ya sea convencional o de tiempo real, usando cebadores específicos para las regiones ITS1 y ITS2 del gen 5,8S del ADNr (Annis et al., 2004; Kriger et al., 2006).

Para el neotrópico se ha encontrado la presencia del hongo en gran parte de Centroamérica, en zonas donde las poblaciones de anfibios han ido disminuyendo drásticamente desde 1980 como: Panamá (Lips et al., 2006), México (Lips et al., 2004) y Costa Rica (La Marca et al., 2005). Para Colombia el primer reporte de *Bd.* se dio para los departamentos de Santander y Cundinamarca, donde Ruiz & Rueda-Almonacid (2008) encontraron individuos de *Atelopus mittermeieri*, *Pristimantis elegans* y *Hyloscirtus bogotensis* infectados por quitridiomycosis (el primero de ellos recolectado en 1981 y los otros dos en el 2005), mediante análisis histológico de organismos preservados en colecciones desde 1968 hasta el 2006. Por otro lado, Urbina & Galeano (2011) reportaron el hongo en la Cordillera Central para el departamento de Antioquia, en individuos de *P. piceus*, *P. uranobates* y *H. larinopygion*.

Adicionalmente, Vásquez-Ochoa et al. (2012) reportaron individuos infectados de *Leptodactylus colombiensis*, *Dendropsophus labialis* y *D. mathiassoni* para localidades de la Cordillera Oriental. Flechas et al. (2012) ampliaron la distribución de *Bd.* para la Isla De Gorgona, siendo uno de los primeros registros para tierras bajas tropicales. Finalmente, Acevedo et al. (2016) reportaron su presencia en localidades del Parque Nacional Natural Tamá entre los 2000-3200 msnm, infectando 12 de las 14 especies que se encuentran en la zona.

Para el departamento del Valle del Cauca los primeros reportes de este hongo se hicieron mediante el estudio histológico de Velásquez et al. (2008) en individuos de la colección de anfibios y reptiles de la Universidad del Valle (UV-C), donde se identificaron cuatro localidades con el hongo: Reserva Natural Cerro El Ingles, Municipio El Cairo; Reserva Natural Bosque de Yotoco, Municipio Yotoco; Hacienda San Pedro (El Queremal), Municipio Dagua y Bosque del cerro de San Antonio, Municipio de Cali. Por otro lado, al examinar más localidades del departamento mediante la técnica de PCR, Mojica (2010) logró confirmar la presencia del hongo en las localidades de El Queremal y Yotoco, previamente analizadas por Velásquez et al. (2008).

El departamento del Valle del Cauca posee una alta variabilidad paisajística y geográfica que le permite albergar cerca de 187 especies de anfibios en su territorio (Castro-H & Vargas-S, 2008; Cardona et al., 2013), lo que corresponde al 23% de las especies del país (AmphibiaWeb, 2019). Sin embargo, la diversidad de la región ha sufrido una disminución gradual de sus poblaciones similar a la ocurrida en otras partes del mundo, sobre todo para las zonas ubicadas en los bosques andinos de las Cordilleras Occidental y Central, registrándose un empobrecimiento en el número de especies e individuos encontrados en cada visita y la desaparición de especies antes comunes, principalmente de los géneros *Gastrotheca*, *Pristimantis* y *Atelopus* (Lynch & Grant, 1998; Herrera-Montes, 2006; Castro-Herrera et al., 2007; Velásquez et al., 2008; Mojica, 2010; Kuri, 2015).

Debido a la gran diversidad de anfibios presente en el Valle del Cauca y al especial interés que la quitridiomycosis representa por su rápida dispersión, amplio rango de huéspedes y su capacidad de infectar en zonas destinadas a la conservación, donde otros factores como la contaminación y la deforestación se encuentran reducidos o ausentes (Lips et al., 2004), es importante localizar sitios infectados o monitorear la propagación de la enfermedad, para la conservación de los anfibios. Por lo tanto, el presente trabajo examinó la presencia del hongo en siete localidades del Valle del Cauca mediante la técnica de PCR.

Table 1. Sampled localities.**Tabla 1.** Localidades muestreadas.

Localidad	Municipio	Coordenadas	Altura (m)
Bosque río Bitaco	La Cumbre, corregimiento Bitaco, vereda Chicoral	03°33.940' N 76°35.570' W	1900-2000
Reserva Amor y Paz	Cali, corregimiento de Pance, vereda El Pato	03°19.780' N 76°39.717' W	2300-2600
Reserva Natural Cerro El Inglés	El Cairo, corregimiento El Boquerón, vereda El Brillante	04°44'29.4" N 76°17'46.0" W	2000-2400
Finca Bellavista	Trujillo, corregimiento de Andinópolis, vereda Arauca	04°10'28" N 76°15'45" W	1900-2000
Reserva Forestal Protectora Nacional	Yotoco	03°52'72" N 76°25'87" W	1000-1700
Bosque del Cerro de San Antonio	Cali, corregimiento El Saladito	03°38' N 76°38' W	1800-2100
Centro de educación ambiental La Sirena	Palmira, corregimiento Tienda Nueva	03°31'31.9" N 76°06'27.5" W	2300-2550

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Se tomaron muestras de poblaciones de anfibios de seis localidades de la Cordillera Occidental y una de la Cordillera Central del Valle del Cauca (Tabla 1 y Figura 1).

Toma de muestras

Entre octubre del 2012 y julio del 2013, se realizaron salidas de campo a las diferentes localidades en los meses de temporada de lluvias. Los muestreos se realizaron tanto en el día como en la noche dependiendo de la actividad de las especies, implementando el método de relevamiento por encuentros visuales (RES) (Heyer et al., 1994). Cada uno de los individuos fue capturado con bolsas plásticas individuales, con el fin de evitar contaminación, tomando muestras según el método por hisopado descrito por Boyle et al. (2004), deslizando un hisopo estéril unas 30 veces sobre la superficie ventral, la ingle, las piernas y las membranas interdigitales del anfibio, aplicando cierta presión sin lastimar al animal. El hisopo fue almacenado en un tubo eppendorf de 1.5mL con 600µL de etanol al 70% rotulado con un código único (Mojica, 2010) y los individuos fueron liberados luego de la toma de la muestra. Las muestras fueron conservadas a 4°C hasta su llegada al laboratorio, donde fueron guardadas en el congelador a -20 °C hasta su análisis.

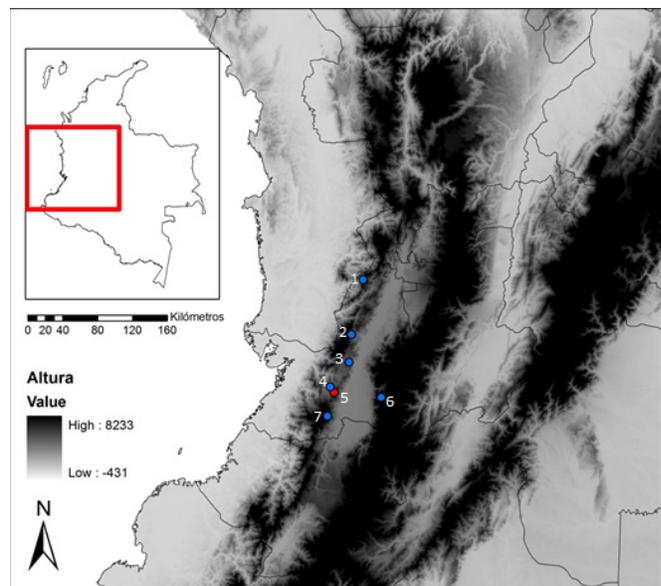


Figure 1. Map with sampling locations in the Valle del Cauca: (1) Reserva Natural Cerro El Inglés, (2) Finca Bellavista-Trujillo, (3) National Protective Forest Reserve Bosque de Yotoco, (4) Forest Cerro de San Antonio-Cali (5) Forest río Bitaco-La Cumbre, (6) Environmental education center La Sirena-Palmira and (7) Forest reserve Amor y Paz-Cali. Red circle marks the location of individuals affected by *Bd* in this research.

Figura 1. Mapa con las localidades muestreadas en el Valle del Cauca: (1) Reserva Natural Cerro El Inglés, (2) Finca Bellavista-Trujillo, (3) Reserva Forestal Protectora Nacional Bosque de Yotoco, (4) Bosque del Cerro de San Antonio-Cali (5) Bosque río Bitaco-La Cumbre, (6) Centro de educación ambiental La Sirena-Palmira, (7) Reserva forestal Amor y Paz-Cali. El punto rojo indica la localidad en donde se encontraron individuos afectados por *Bd* en este estudio.

Localidad	Género	especie	Total	Bd. positivo
Bosque Chicoral	<i>Caecilia</i>	<i>subdermalis</i>	1	0
	<i>Pristimantis</i>	<i>erythropleura</i>	10	1
	<i>Pristimantis</i>	<i>palmeri</i>	22	1
	<i>Pristimantis</i>	<i>orpacobates</i>	4	1
	<i>Centralene</i>	<i>savagei</i>	2	0
	<i>Nymphargus</i>	<i>ignotus</i>	1	0
	<i>Colostethus</i>	sp.	3	0
	<i>Pristimantis</i>	<i>brevifrons</i>	3	0
	<i>Hypodactylus</i>	<i>mantipus</i>	3	0
	<i>Pristimantis</i>	<i>calcaratus</i>	2	1
	<i>Pristimantis</i>	sp.	2	0
	<i>Pristimantis</i>	<i>viridicans</i>	2	0
	<i>Bolitoglossa</i>	<i>walkeri</i>	8	0
Reserva Bosque de Yotoco	<i>Pristimantis</i>	<i>palmeri</i>	7	0
	<i>Pristimantis</i>	<i>erythropleura</i>	1	0
	<i>Strabomantis</i>	<i>ruizi</i>	1	0
	<i>Andinobates</i>	<i>bombetes</i>	5	0
Reserva amor y paz, Pance	<i>Pristimantis</i>	<i>palmeri</i>	7	0
	<i>Pristimantis</i>	<i>brevifrons</i>	1	0
	<i>Pristimantis</i>	<i>orpacobates</i>	3	0
	<i>Pristimantis</i>	<i>calcaratus</i>	1	0
	<i>Pristimantis</i>	sp. 1	4	0
	<i>Pristimantis</i>	sp. 2	2	0
	<i>Pristimantis</i>	sp. 3	1	0
	<i>Pristimantis</i>	sp. 4	1	0
	<i>Pristimantis</i>	sp. 5	5	0
	<i>Pristimantis</i>	sp. 6	1	0
Finca Bellavista, Trujillo	<i>Strabomantis</i>	<i>ruizi</i>	3	0
	<i>Pristimantis</i>	<i>palmeri</i>	7	0
	<i>Pristimantis</i>	<i>erythropleura</i>	6	0
	<i>Pristimantis</i>	<i>w-nigrum</i>	1	0
	<i>Dendropsophus</i>	<i>columbianus</i>	2	0
Reserva Natural Cerro El Ingles	<i>Rhinella</i>	<i>paraguas</i>	12	0
	<i>Pristimantis</i>	<i>silverstonei</i>	17	0
	<i>Pristimantis</i>	<i>palmeri</i>	5	0
	<i>Pristimantis</i>	<i>restrepoi</i>	11	0
	<i>Pristimantis</i>	<i>quantus</i>	2	0
	<i>Pristimantis</i>	<i>phalarus</i>	6	0
	<i>Pristimantis</i>	<i>achatinus</i>	1	0
	<i>Pristimantis</i>	<i>kelephus</i>	2	0
	<i>Pristimantis</i>	sp. 1	1	0
	<i>Pristimantis</i>	sp. 2	1	0
	<i>Bolitoglossa</i>	sp.	2	0
Bosque de San Antonio	<i>Pristimantis</i>	<i>palmeri</i>	5	0
	<i>Hypodactylus</i>	<i>mantipus</i>	1	0
Reserva La Sirena	<i>Pristimantis</i>	<i>buckleyi</i>	4	0
	<i>Pristimantis</i>	<i>piceus</i>	7	0
	<i>Pristimantis</i>	<i>thectopternus</i>	2	0
	<i>Pristimantis</i>	<i>alalocophus</i>	3	0
	<i>Pristimantis</i>	sp.	31	0
	<i>Hyloscirtus</i>	<i>larinopygion</i>	2	0
	<i>Bolitoglossa</i>	sp.	4	0

Table 2. Species analyzed in the seven sampling locations.

Tabla 2. Especies analizadas para la detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* en siete localidades del Valle del Cauca.

Extracción de ADN

Todos los procedimientos de extracción y amplificación de ADN fueron realizados en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Sección Genética, Universidad del Valle. En el laboratorio, el hisopo fue exprimido con pinzas estériles, tomando 300µL del contenido y colocándolos en un tubo eppendorf de 0.6mL. Estos tubos se centrifugaron (IEC Centra-MP4R) a 12 000 rpm por 3 minutos, después de lo cual fue posible observar un pellet en la mayoría de los tubos, posteriormente se vaciaron por inversión sobre una toalla de papel y se llevaron al Speedvac Concentrator (Savant: SVC 100H) por 25 minutos; al terminar se adicionó 10µL de agua purificada MiliQ y se llevó al vortex. Por último, se transfirió el contenido a un tubo de PCR donde se adicionó 20µL del reactivo Genereleaser (Bioventures, Inc.) y se llevó al ciclo de extracción recomendado por la casa comercial en el termociclador AmpliTron II serie 1091 (Banstead International).

Amplificación por PCR

El ADN extraído fue procesado mediante PCR utilizando los cebadores Bd1a y Bd2a descritos por Annis et al, (2004), que amplifican entre la región ITS1 y ITS2 del ADNr 5.8S. Se implementó las condiciones de PCR y el programa de amplificación utilizado por Mojica (2010), el cual consiste en una desnaturalización inicial a 95 °C por dos minutos, seguido de 35 ciclos que incluyen una desnaturalización a 95 °C por 45seg, un anillaje a 55 °C por 45seg y una extensión a 72 °C por un minuto; por último termina con una extensión final a 72 °C por 10 minutos. Los fragmentos de ADN amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa (1%) durante 40 minutos a 90 voltios, y se visualizaron en el trasiluminador UV por medio del colorante EZ-vision.

RESULTADOS

En total se analizaron 241 muestras pertenecientes a 40 especies distribuidas en los tres órdenes de anfibios: Gymnophiona (1), Caudata (2) y Anura (37) (Tabla 2). La mayoría de los individuos (199) pertenecían a la familia Craugastoridae. Se detectó el hongo en cuatro muestras correspondientes a la localidad de Chicoral, municipio de La Cumbre. Las especies infectadas pertenecen a la familia Craugastoridae: *Pristimantis palmeri* (Boulenger, 1912), *P. erythropleura* (Boulenger, 1896), *P. orpacobates* (Lynch, Ruíz-Carranza & Ardila-Robayo, 1994) y *P. calcaratus* (Boulenger, 1908). Ninguno de los individuos infectados mostró signos de

quitridiomycosis, tales como hiperqueratinosis, letargo, pérdida de reflejos, anorexia, entre otras (Berger et al., 1998).

DISCUSIÓN

Todas las especies infectadas en este estudio pertenecen al género *Pristimantis* y se ubicaron en un bosque de niebla de la Cordillera Occidental. Este tipo de bosque corresponde al bosque húmedo premontano según las zonas de vida de Holdridge (1967) y fue categorizada como un sitio de alta idoneidad para *Bd.* por Ron (2005), pues presenta condiciones óptimas para el establecimiento y sobrevivencia del hongo (temperatura ambiental entre los 15-25°C y alta humedad relativa) (Piotrowski et al., 2004), aunque no se excluye los bosques de tierras bajas como sitios para el hallazgo del mismo. En los anteriores trabajos de detección de *Bd.* en el Valle del Cauca las localidades infectadas también correspondieron a bosques húmedos premontanos y la mayoría de los individuos afectados pertenecían a la familia Craugastoridae, por ejemplo para Velásquez et al. (2008) la mitad de las especies con *Bd.* pertenecían a esta familia, de igual manera para Mojica (2010) todos los individuos afectados eran del género *Pristimantis*. Teniendo en cuenta que para el Valle del Cauca las comunidades de anuros de las Cordilleras Occidental y Central, están compuestas por un 50% o más de especies del género *Pristimantis* (Kattan, 1987; Cardona et al., 2013) por lo que no es de extrañar que los individuos de este género se encuentren entre los más afectados por la enfermedad. Y abré la discusión sobre si gran parte de la diversidad de anuros del departamento podría encontrarse amenazada por *Bd.*

De las cuatro especies infectadas, solo *P. orpacobates* y *P. calcaratus* no se habían reportado antes con presencia de *Bd.* Adicionalmente, ninguno de los individuos afectados mostraron signos de quitridiomycosis, algo muy común en los casos de infección por quitridiomycosis en Colombia (Velásquez et al., 2008; Mojica, 2010; Urbina & Galeano, 2011; Vázquez-Ochoa et al., 2012). Esta aparente falta de diagnóstico puede deberse a que algunos individuos son resistentes a la infección y pueden sobrellevarla sin efectos negativos o a que el individuo se encuentra en las primeras etapas de la infección. Se han reportado múltiples casos de resistencia por parte de diferentes anfibios en el mundo: la rana toro *Lithobates catesbeianus* (Hanselmann, 2004; Daszak, 2004), *Xenopus laevis* (Weldon et al., 2004), *Litoria wilcoxii*, (Kriger & Hero, 2006), *Rana cascadae*, *Hyla regilla* (Blaustein et al., 2005) entre otros. Gran parte de esta resistencia se debe a la presencia de péptidos antimicrobianos en el sistema inmune de los anfibios, que tienen una amplia capacidad antimicrobiana de bacterias, virus y hongos, incluyendo *B. dendrobatidis* (Carey et al., 1999, Rollins-Smith et al., 2002a, b; Gibble et al., 2007;

Woodhams et al., 2007) y también a la asociación simbiótica con bacterias que reducen o inhiben el crecimiento del patógeno (Harris et al., 2006; Woodhams et al., 2007; Flechas et al., 2012). Esta resistencia permite a los individuos sobrevivir a la infección pero también crea reservorios del hongo y permite su establecimiento en una localidad (Blaustein et al., 2005; Kriger & Hero, 2006).

La poca prevalencia del hongo en la localidad infectada (4 de un total de 13 especies muestreadas) y en los individuos (solo 1 individuo infectado de cada especie) puede ser explicada por la baja sensibilidad de la técnica empleada (PCR punto final) para la cual se necesita una mayor cantidad de zoosporas si se quiere declarar una muestra como positiva, esto al compararla con la técnica de PCR en tiempo real (Kriger et al., 2006). Sin embargo, otros estudios en el país han mostrado también bajas prevalencias de *Bd.* con técnicas de PCR en tiempo real: Urbina et al. (2011) detectó un total de 32 individuos infectados de 111, mientras que Vázquez et al. (2012) encontró 3 individuos con *Bd.* entre 336 muestras. Incluso con métodos histológicos Velásquez et al. (2008) halló 22 individuos infectados de un total de 466.

Parte de la disminución global en las poblaciones de anfibios ha sido atribuida a la quitridiomycosis. En el presente trabajo fue posible observar una disminución en el número de especies observadas en las localidades de bosque de niebla visitadas en comparación con las reportadas en la literatura y colecciones. Por ejemplo, para el área del bosque de Yotoco solo se capturaron 4 de las 19 especies registradas en la zona (Castro-Herrera et al., 2007), mientras que para la Reserva Cerro El Inglés solo se registraron 11 de las 55 especies reportadas en la zona. De igual manera para el bosque de Chicoral donde se hace el reporte de *Bd.* por primera vez, la riqueza de especies disminuyó de 24 (Herrera-Montes, 2006; Cardona et al., 2013) a 13 especies encontradas en este trabajo y a 11 en el trabajo de Kuri (2015). Esta disminución ha afectado indistintamente a las especies con relación a su dependencia de cuerpos de agua, tanto especies con hábitos acuáticos de las familias Centrolenidae (*Centrolene geckoideum*, *C. buckleyi*, *Nymphargus griffithsi*) y Dendrobatidae (*Hyloxalus abditaurantis* y *H. lehmani*); como con desarrollo directo Hemiphractidae (Género *Gastrotheca*) y Craugastoridae (Algunas especies de los géneros *Craugastor* y *Pristimantis*) se han dejado de registrar desde hace varios años en las anteriores localidades donde antes eran muy comunes (Castro-Herrera et al., 2007; Velásquez et al., 2008; Cardona et al., 2013; Kuri, 2015). Debido a que estos bosques se encuentran en buen estado de conservación y se han disminuido los efectos de la contaminación y la deforestación, además de que se ha reportado *Bd.* en todas estas

zonas se propone como causa de disminución en la riqueza de anfibios a la quitridiomycosis.

El hallazgo del hongo en la localidad de Chicoral ofrece una posible solución al entendimiento de la disminución de anfibios en esta zona, sin embargo, no significa que la enfermedad sea la única causa de esta disminución, pues como se ha propuesto anteriormente, pudo haber sido una combinación de efectos del clima y el patógeno (Hipótesis del “clima ligado a la epidemia”) (Burrowes et al., 2004). Por ejemplo, las especies del género *Pristimantis* se caracterizan por presentar desarrollo directo, por lo que no son dependientes de hábitats acuáticos, no obstante requieren de humedad para la rehidratación y evitar la desecación de sus posturas. Durante las temporadas secas, muchos *Pristimantis* dependen de la absorción de agua a través del parche pélvico para sobrevivir, de esta manera las especies infectadas con *B. dendrobatidis* en la parte pélvica podrían ser más vulnerables (por no poder obtener agua por esta vía) durante los periodos secos (Burrowes et al., 2004). Los cambios ambientales también pueden “estresar” a los anfibios y aumentar la producción de hormonas de estrés que incrementan la virulencia del patógeno (Carey et al., 1999) o deprimen el sistema inmune (Crawshaw et al., 1992, Carey et al., 1993, Blaustein et al., 1994).

Se hallaron tres de las especies positivas para la infección cerca del río Bitaco, mientras que uno de los individuos (*P. calcaratus*) se encontró en el interior de bosque lejos de fuentes de agua (más o menos 500m de la fuente de agua más cercana), aparentemente el modo de dispersión principalmente acuático de la enfermedad no concuerda con el modo de reproducción y los hábitats de muchas especies del género *Pristimantis*, pero el comportamiento de los anuros está influenciado por parámetros ambientales como la temperatura y la humedad disponible, y pueden haber efectos directos sobre la migración a diferentes hábitats (Donnelly & Crump, 1998). Durante la estación seca muchas especies pueden converger en los sitios más húmedos, las ranas arbóreas pueden ser forzadas a buscar áreas más húmedas, donde son más vulnerables a parásitos y depredadores (Donnelly & Crump, 1998). Esto sumado a la persistencia del hongo en las aguas como saprófito al infectar algas y artrópodos, así como en suelos húmedos, hojarasca e incluso hojas; y a su dispersión por plumas y patas de aves acuáticas y reptiles (Johnson & Speare, 2003; Johnson & Speare, 2005; Kilburn et al., 2011; Kolby et al., 2015; Burrowes & De la Riva, 2017), explica la infección de especies que no están relacionadas con cuerpos de agua permanentes (ríos, lagos, etc.).

CONCLUSIÓN

El hallazgo de una nueva localidad con la presencia de *Bd.*, se suma a las reportadas por Velásquez et al. (2008) para el departamento Valle del Cauca, lo que hace una llamado a la conservación de la fauna anfibia colombiana. La ausencia de signos de la enfermedad en individuos positivos, concuerda con lo encontrado en otros trabajos en localidades colombianas, por lo que se hace necesario estudios adicionales acerca de la patogenicidad y/o virulencia del hongo, o del sistema inmune de los organismos que puedan explicar la diferencia en las prevalencias y sintomatología de infección. Por otro lado, el hallazgo de un individuo positivo lejos de fuentes de agua, confirma el establecimiento y transporte del patógeno por medios diferentes al acuático tal como lo reportan otros estudios, que le facilitan la infección de especies de anfibios que no están ligadas directamente con los cuerpos de agua.

Agradecimientos.— Agradecemos a Steven Alejandro Valencia y a Andrés Felipe Jaramillo por su valiosa colaboración en la toma de muestra de campo y en la identificación de los especímenes; a Andrea Echeverri, Victoria Cardona y Oscar Hernández por su colaboración en campo; a Rony Orobio por su ayuda en la capacitación de técnicas moleculares, al Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad del Valle por permitirnos el uso de las instalaciones durante la fase de laboratorio y finalmente, a la corporación SERRANIAGUAS por permitirnos la entrada y el hospedaje en la reserva natural Cerro El Inglés.

LITERATURA CITADA

- Acevedo, A.A., R. Franco & D.A. Carrero. 2016. Diversity of Andean amphibians of the Tamá National Natural Park in Colombia: a survey for the presence of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Animal biodiversity and conservation* 39(1):1-10.
- Alford, R. A., P. M. Dixon, & J. H. Pechmann. 2001. Ecology: Global amphibian population declines. *Nature*, 412(6846), 499.
- AmphibiaWeb. 2019. <<https://amphibiaweb.org>> University of California, Berkeley, CA, USA. Accessed 1 Nov 2019.
- Annis, S.L., F.P. Dastor, H. Ziel, P. Daseak, J.E. & Longcore. 2004. A DNA based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife diseases* 40:420-428.
- Berger, L., R. Speare, P. Daszak, D.E. Green, A.A. Cunningham, C.L. Goggin, R. Slocombe, M.A. Ragan, A.D. Hyatt, K.R. McDonald, H.B. Hines, K.R. Lips, G. Marantelli & H. Parkes. 1998.

- Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Population Biology* 95:9031-9036.
- Berger, L., R. Speare, & A. Kent. 1999. Diagnosis of chytridiomycosis in amphibians by histologic examination, in: <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/histo/chhisto.htm>. [Consultado en mayo 20, 2013].
- Berger, L., A.D. Hyatt, R. Speare, & J.E. Longcore. 2005a. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of aquatic organisms* 68:51-63.
- Berger, L., G. Marantelli, L.F. Skerratt, & R. Speare. 2005b. Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. *Diseases of aquatic organisms* 68:47-50.
- Blaustein, A.R., P.D. Hoffman, D.G. Hokit, J.M. Keisecker, S.C. Walls & J.B. Hays. 1994. UV repair and resistance to solar UV-B in amphibian eggs: a link to population declines. *Proceedings of the National Academy of Science* 91:1791-1795.
- Blaustein, A.R., J.M. Romansic, E.A. Scheesele, B.A. Han, A.P. Pessier & J.E. Longcore. 2005. Interspecific variation in susceptibility of frog tadpoles to the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology* 19(5):1460-1468.
- Boyle, D.G., D.B. Boyle, V. Olsen, J.A.T. Morgan & A.D. Hyatt. 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of aquatic organisms* 60:141-148.
- Burrowes, P.A., R.L. Joglar & D.E. Green. 2004. Potential causes for amphibian declines in Puerto Rico. *Journal Information* 60(2):141-154.
- Burrowes, P. A., & I. De la Riva. 2017. Detection of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in museum specimens of Andean aquatic birds: implications for pathogen dispersal. *Journal of wildlife diseases*, 53(2):349-355.
- Cardona-Botero, V.E., R.A. Viáfara-Vega, A. Valencia-Zuleta, A. Echeverry-Bocanegra, O.D. Hernández-Córdoba, A.F. Jaramillo-Martinez, R. Galvis-Cruz, J.A. Gutiérrez & Castro-Herrera, F. 2013. Diversidad de la herpetofauna en el Valle del Cauca (Colombia): un enfoque basado en la distribución por ecorregiones, altura y zonas de vida. *Biota Colombiana*: 14(2).
- Carey, C. 1993. Hypothesis concerning the causes of the disappearance of boreal toads from the mountains of Colorado. *Conservation Biology* 7(2):355-362.
- Carey, C., N. Cohen & L. Rollins-Smith. 1999. Amphibian declines: an immunological perspective. *Developmental y Comparative Immunology* 23(6):459-472.
- Castro-Herrera, F., W. Bolívar-García & M. I. Herrera-Montes. 2007. Guía de los anfibios y reptiles del bosque de Yotoco, Valle del Cauca, Colombia. Grupo de Investigación Laboratorio de Herpetología, Universidad del Valle. Cali, Colombia.
- Castro-Herrera, F. & F. Vargas-Salinas. 2008. Anfibios y reptiles en el departamento del Valle del Cauca, Colombia. *Biota Colombiana*: 9(2).
- Crawshaw, G.J. 1992. The role of disease in amphibian decline. Pp. 60-62. En: Bishop, C.A. & Pettit, K.E. (Eds.), *Declines in Canadian amphibian populations: designing a national monitoring strategy*. Occasional Paper Canadian Wildlife Service. Ontario.
- Daszak, P., A. Strieby, A.A. Cunningham, J.E. Longcore, C.C. Brown & D. Porter. 2004. Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetological Journal* 14(4):201-207.
- Donnelly, M.A. & M.L. Crump. 1998. Potential effects of climate change on two neotropical amphibian assemblages. *Climatic change* 39(2-3):541-561.
- Duellman, W.E. 1979. The herpetofauna of the Andes: Patterns of distribution, origin, differentiation and present communities. Pp. 371-459. En: Duellman, W.E. (Ed.). *The South American Herpetofauna: Its origin, Evolution and Dipersal*. Museum of Natural History Monograph 7. The University of Kansas.
- Flechas, S.V., C. Sarmiento, M.E. Cárdenas, E.M. Medina, S. Restrepo, & A. Amézquita. 2012. Surviving Chytridiomycosis: Differential Anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* Activity in Bacterial Isolates from Three Lowland Species of *Atelopus*. *PloS one* 7(9):1-7.
- Gibble, R.E., L. Rollins-Smith & K.N. Baer. 2008. Development of an assay for testing the antimicrobial activity of skin peptides against the amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) using *Xenopus laevis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71(2):506-513.

- Hanselmann, R., A. Rodríguez, M. Lampo, L. Fajardo-Ramos, A. Alonso Aguirre, A. Marm Kilpatrick, J.P. Rodríguez, & P. Daszak. 2004. Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in Venezuela. *Biological Conservation* 120(1):115-119.
- Harris, R.N., T.Y. James, A. Lauer, M.A. Simon & A. Patel. 2006. Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. *EcoHealth* 3(1):53-56.
- Heatwole, H. 2013. Worldwide decline and extinction of amphibians. Pp. 413. En: Rohde, K. *The balance of nature and human impact*. Cambridge University Press.
- Heyer, W.R., M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, L.C. Hayek & M.S. Foster. 1994. *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians*. Eds Washington, Smithsonian Institution Press.
- Herrera-Montes, A. 2006. Análisis Multitemporal de la Riqueza de Herpetofauna en un Transecto de Bosque de Niebla, en el Departamento del Valle del Cauca, Suroccidente Colombiano. Tesis de pregrado. Universidad del Valle. Cali-Colombia.
- Holdridge, L. R. 1967. *Life zone ecology*. Tropical Science Center. San José, Costa Rica.
- Houlahan, J. E., C. S. Findlay, B. R., Schmidt, A. H., Meyer & S. L. Kuzmin. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404(6779):752.
- IUCN 2019. *The IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2019-2. <https://www.iucnredlist.org> [Consultado en Noviembre 2019]
- Johnson, M.L. & R. Speare. 2003. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and disease control implications. *Emerging infectious diseases* 8(8):922-925.
- Johnson, M.L. & R. Speare, 2005. Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Diseases of aquatic organisms* 65(3): 181–186.
- Kattan, G.H. 1987. Patrones de composición taxonómica y de modos reproductivos en comunidades de ranas en el Valle del Cauca. *Cespedesia* 16(51-56):75-83.
- Kilburn, V.L., R. Ibáñez & D.M. Green. 2011. Reptiles as potential vectors and hosts of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Panama. *Diseases of aquatic organisms* 97(2):127-134.
- Kolby, J.E., S.D. Ramirez, L. Berger, K.L. Richards-Hrdlicka, M. Jocque & L.F. Skerratt. 2015. Terrestrial Dispersal and Potential Environmental Transmission of the Amphibian Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *PLoS one* 10(4), e0125386. doi:10.1371/journal.pone.0125386
- Kruger, K.M. & J.M. Hero. 2006. Survivorship in wild frogs infected with chytridiomycosis. *EcoHealth* 3:171-177.
- Kruger, K.M., J.M. Hero & K.J. Ashton. 2006. Cost efficiency in the detection of chytridiomycosis using PCR assay. *Diseases of aquatic organisms* 71(2):149-154.
- Kuri J.D. 2015. Ensamblaje de anuros en hábitats modificados en un bosque andino (vereda Chicoral, Valle del Cauca). Tesis de pregrado. Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- La Marca, E., K.R. Lips, S. Lotters, R. Puschendorf, R. Ibáñez, J.V. Rueda-Almonacid, R. Schulte, C. Marty, F. Castro, J. Manzanilla-Puppo, J.E. Garcia-Perez, F. Bolaños, G. Chaves, J.A. Pounds, E. Toral & B.E. Young. 2005. Catastrophic Population Declines and Extinctions in Neotropical Harlequin Frogs (Bufonidae: *Atelopus*). *Biotropica* 37(2):190-201.
- Lips, K.R., J.R. Mendelson III, A. Muñoz-Alonso, L. Canseco-Márquez & D.G. Mulcahy. 2004. Amphibian population declines in montane southern Mexico: resurveys of historical localities. *Biological Conservation* 119(4):555-564.
- Lips, K.R., F. Brem, R. Brenes, J.D. Reeve, R.A. Alford, J. Voyles, C. Carey, L. Livo, A.P. Pessier & J.P. Collins. 2006. Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 103(9):3165-3170.
- Longcore, J.E., A.P. Pessier & D.K. Nichols. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov. a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91:219-227.
- Lynch, J.D. 1986. New species of *Eleutherodactylus* of Colombia (Amphibia: Leptodactylidae) II: Four species from the cloud forest of the western cordilleras. *Caldasia* 15:629-647.
- Lynch, J.D. & T. Grant. 1998. Dying frogs in western Colombia: catastrophe or trivial observation. *Revista de la Academia*

- Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 22(82):149-152.
- Lynch, J.D. 1999. Ranas pequeñas, la geometría de evolución, y la especiación en los Andes Colombianos. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 23(86):143-159.
- Mojica, C. 2010. Detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* (CHYTRIDIALES: CHYTRIDIOMICETES) en nueve localidades de valle del cauca mediante el uso de PCR. Tesis de pregrado. Universidad del Valle. Cali-Colombia.
- Parris, M.J. & J.G. Beaudoin. 2004. Chytridiomycosis impacts predator-prey interactions in larval amphibian communities. *Oecologia* 140(4):626-632.
- Pechmann, J.H.K. & H.M. Wilbur. 1994. Putting declining amphibian populations in perspective: natural fluctuations and human impacts. *Herpetologica* 50:65-84.
- Piotrowski, J.S., S.L. Annis & J.E. Longcore. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96(1):9-15.
- Rollins-Smith, L.A., J.K. Doersam, J.E. Longcore, S.K. Taylor, J.C. Shamblin, C. Carey, & M.A. Zasloff. 2002a. Antimicrobial peptide defenses against pathogens associated with global amphibian declines. *Developmental and Comparative Immunology* 26(1):63-72.
- Rollins-Smith, L.A., C. Carey, J. Longcore, J.K. Doersam, A. Boutte, J.E. Bruzgal & J.M. Conlon. 2002b. Activity of antimicrobial skin peptides from ranid frogs against *Batrachochytrium dendrobatidis*, the chytrid fungus associated with global amphibian declines. *Developmental and Comparative Immunology* 26(5):471-479.
- Ron, S.R. 2005. Predicting the Distribution of the Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica* 37(2):209-221.
- Ruiz, A. & J.V. Rueda-Almonacid. 2008. *Batrachochytrium dendrobatidis* and chytridiomycosis in anuran amphibians of Colombia. *Ecohealth* 5(1):27-33.
- Urbina, J.C. & S.P. Galeano. 2011. *Batrachochytrium dendrobatidis* detected in Amphibians of the Central Andres Cordillera of Colombia. *Herpetological Review* 42(4):558-560.
- Vásquez-Ochoa, A., P. Bahamón-Carmona, L.D. Prada-Salcedo & M. Franco-Correa. 2012. Detección y cuantificación de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios de las regiones andina central, oriental, Orinoquia y amazonia de Colombia. *Herpetotropicos* 8(1-2):3-21.
- Velásquez, B.E., F. Castro-Herrera, W. Bolívar & M.I. Herrera. 2008. Infección por el hongo quitrido *Batrachochytrium dendrobatidis* en anuros de la Cordillera Occidental de Colombia. *Herpetotropicos* 4(2):65-70.
- Young, B.E., K.R. Lips, J.K. Reaser, R. Ibáñez, A.W. Salas, J.R. Cedeño, L.A. Coloma, S. Ron, E. La Marca, J.R. Meyer, A. Muñoz, F. Bolaños, G. Chaves & D. Romo. 2001. Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conservation Biology* 15(5):1213-1223.
- Weldon, C., L.H. du Preez, A.D. Hyatt, R. Muller & R. Speare. 2004. Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging infectious diseases* 10(12):2100-2105.
- Woodhams, D.C., K. Ardipradja, R.A. Alford, G. Marantelli, L.K. Reinert, & L.A. Rollins-Smith. 2007. Resistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and is correlated with skin peptide defenses. *Animal Conservation* 10(4):409-417.
- Woodhams, D.C., V.T. Vredenburg, M.A. Simon, D. Billherimer, B. Shakhtour, Y. Shyr, C. Briggs, L.A. Rollins-Smith & R.N. Harris. 2007. Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*. *Biological Conservation* 138:390-398.

