

**APROXIMACION A LAS RUTAS DE ACCESO Y DISTRIBUCION DEL HONGO
QUÍTRIDO *Batrachochytrium dendrobatidis* EN ANUROS (AMPHIBIA) EN EL
DEPARTAMENTO DEL CAUCA-COLOMBIA**

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGOS.**

**AMANDA MUÑOZ MENESES
ALEJANDRO ARBOLEDA SIMMONDS**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2009**

**APROXIMACION A LAS RUTAS DE ACCESO Y DISTRIBUCION DEL HONGO
QUÍTRIDO *Batrachochytrium dendrobatidis* EN ANUROS (AMPHIBIA) EN EL
DEPARTAMENTO DEL CAUCA-COLOMBIA**

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGOS.**

**AMANDA MUÑOZ MENESES
ALEJANDRO ARBOLEDA SIMMONDS**

**DIRECTORA
MSc. GISELLE ZAMBRANO G.
PROFESORA DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**ASESOR
PhD. ADOLFO AMÉZQUITA TORRES
PROFESOR ASOCIADO DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
DIRECTOR GRUPO DE ECOLOGÍA DEL COMPORTAMIENTO Y
HERPETOLOGÍA
COORDINADOR ESCUELA DE POSGRADOS
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**

**ASESORA
MSc. SANDRA VICTORIA FLECHAS HERNÁNDEZ
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
GRUPO DE ECOLOGÍA DEL COMPORTAMIENTO Y HERPETOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2009**

Nota de aceptación

Directora: Giselle Zambrano González

Jurado: Gerardo Ignacio Naundorf Sanz

Jurado: Clara Inés Giraldo Aristizábal

Fecha de sustentación:

**POPAYÁN
2009**

DEDICATORIA

A mi querida madre por su confianza y apoyo incondicional, por ser para mí un ejemplo de constancia y disciplina, por su infinito amor y su paciencia, a mi papá por su compañía desde donde se encuentra y por su herencia: mi educación. A mis hermanas Claudia, Paty y Olga por apoyar mis ideales y por su cariño y a mis sobrinitos Nina y Juanes por ser la alegría de mis días. A mi futuro esposo, Philip Pohlman por su comprensión y su amor, por llenar mi vida. A Alejandro, "migocho": gracias por hacer de mi paso por la universidad una etapa feliz.

Amanda.

De manera muy especial a mi mamá por amarme tanto y apoyarme en todas mis decisiones. A mi papá por impulsarme cada día a ser mejor, por su ejemplo de dedicación, amor al trabajo y por su apoyo incondicional. A mi sobrinita Gabriela, mi ranóloga en potencia, por recordarme lo bella que es la naturaleza con cada uno de los bichitos que agarraba para que le dijera qué eran y cual era su nombre científico. A mis hermanos por sus enseñanzas y cariño. Y a Amanda, mi compañera y mi "migocha" por hacer de todos los instantes, por difíciles que fueran, momentos de felicidad.

Alejandro.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo, en primer lugar a nuestra directora de trabajo de grado, Giselle Zambrano González por haber aceptado dirigir nuestro proyecto, por sus valiosísimos aportes y por su apoyo incondicional.

A la Universidad de Los Andes, especialmente al laboratorio de Ecofisiología del Comportamiento y Herpetología que dirige el profesor Adolfo Amézquita por apoyar financieramente este estudio. A Sandra Victoria Flechas y Edgar Medina por guiarnos en la fase de laboratorio y sus valiosísimos aportes, sin los que este trabajo no hubiera podido llevarse a cabo.

A los profesores John D. Lynch y Andrés R. Acosta por colaborarnos con la identificación taxonómica del material colectado, a Francisco José López y Roger Coral por su colaboración en las salidas de campo.

A toda la gente que nos facilitó la estadía en campo, quienes muy amablemente en todas las salidas fueron nuestros guías y hospederos: Maria Fernanda Ceballos y su padre, Lesly Peña, Cristina Calderón y sus familias y amigos en el Patía, y Santander de Quilichao, Doña Rosa en San Juan De Villalobos y todas las demás personas que de alguna forma colaboraron con la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	11
1. INTRODUCCIÓN.	12
2. PROBLEMA DE INVESTIGACION.	14
3. OBJETIVOS.	15
3.1. General.	15
3.2. Específicos.	15
4. JUSTIFICACION.	16
5. MARCO TEORICO.	19
5.1. Los Anfibios.	19
5.2. Situación actual de los anfibios en Colombia.	19
5.3. El Hongo patógeno <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	21
5.4. Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) para detección de <i>B. dendrobatidis</i>	25
6. AREA DE ESTUDIO.	27
6.1 Ecorregión Pacífica.....	27
6.1.1 <u>Municipio de Guapi</u>	29
6.2. Ecorregión Amazónica.	29
6.2.1. <u>Municipio de Santa Rosa</u>	29
6.3. Ecorregión Andina.	29
6.3.1. <u>Municipio de Santander de Quilichao</u>	30
6.3.2. <u>Municipio de Cajibío</u>	31
6.3.3. <u>Municipio de Totoró (Totoró)</u>	31
6.3.4. Municipio de Totoró (Gabriel López).....	31
6.3.5. <u>Municipio de Popayán</u>	31
6.3.6. <u>Municipio de Patía</u>	32
7. METODOLOGIA.....	34

7.1.Fase de campo.	34
7.1.1 <u>Colecta de anuros</u>	34
7.1.2. Variables microambientales.....	34
7.1.3. Colecta del hongo.....	34
7.2. Fase de laboratorio.	35
7.2.1. Identificación de los anuros.....	35
7.2.2. Determinación de la presencia del hongo <i>B. dendrobatidis</i> en los raspados epidérmicos.....	35
7.2.2.1. Extracción de ADN.....	35
7.2.2.2. Detección de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en anfibios con PCR.....	37
7.2.2.3. Electroforesis.....	38
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
10. CONCLUSIONES	54
11. RECOMENDACIONES	56
BIBLIOGRAFIA	58

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Microfotografías de secciones teñidas mediante técnicas de inmunoperoxidasa de un corte transversal de la membrana interdigital de <i>Xenopus gilli</i> , destacando la morfología y tamaño de los esporangios de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> . A) La flecha a indica la respuesta hiperplásica localizada en la epidermis; la flecha b indica una región no infectada de la epidermis. B) Las flechas muestran dos zoosporangios. El óvalo indica la localización de la infección en el estrato córneo. Barra, 10 µm. Tomado de: Weldon <i>et al.</i> 2004.....	22
Figura 2. Mapa de localización del Departamento del Cauca. Fuente: IGAC, 2009.....	28
Figura 3. Mapa de Localización de las Áreas de Estudio 1. Municipio de Guapi. 2. Municipio de Popayán. 3. Municipio de Totoró (Totoró). 4. Municipio de Patía. 5. Municipio de Santa Rosa. 6. Municipio de Totoró (Gabriel López). 7. Municipio de Cajibío. 8. Municipio de Santander de Quilichao. Fuente: IGAC, 2009.....	33
Figura 4. Porcentaje de Muestras Negativas vs. Positivas.....	41
Figura 5. Gel 1. El recuadro resalta la muestra positiva. A: <i>Dendropsophus leucophyllatus</i> MP: Marcador de peso (+) Control positivo (-) Control Negativo (#) Números de muestra.....	44
Figura 6. Gel 2. Los recuadros resaltan las muestras positivas. B: <i>Smilisca phaeota</i> C: <i>Dendropsophus leucophyllatus</i> D: <i>Rhinella marina</i> . MP: Marcador de peso (+) Control positivo (-) Control Negativo (#) Números de muestra.	44
Figura 7. Gel 3. Los recuadros resaltan las muestras positivas. E: <i>Lithobates vaillanti</i> F: <i>Dendropsophus columbianus</i> G: <i>Dendropsophus colombianus</i> . MP: Marcador de peso (+) Control positivo (-) Control Negativo (#) Números de muestra.....	45
Figura 8. Gel 4. La muestra resaltada en el recuadro azul se designa como tentativa puesto que la intensidad de la banda no permite identificar con certeza la presencia de ADN de <i>B. dendrobatidis</i> , sin embargo es considerada debido a que	

la intensidad del control positivo muestra un comportamiento similar. **H:** *Pristimantis myersi*. MP: Marcador de peso (+) Control positivo (-) Control Negativo (#) Números de muestra.....45

Figura 9. Gel 5. Los recuadros resaltan las muestras positivas. **I:** *Colostethus fraterdanieli* **J:** *Pristimantis achatinus* **K:** *Dendropsophus colombianus* **L:** *Pristimantis achatinus*. MP: Marcador de peso (+) Control positivo (-) Control Negativo (#) Números de muestra.....46

Figura 10. Gel 6. Los recuadros resaltan las muestras positivas. **M:** *Colostethus fraterdanieli* **N:** *Scinax ruber*. MP: Marcador de peso (+) Control positivo (-) Control Negativo (#) Números de muestra.....46

Figura 11. Gel 7. El recuadro resalta la muestra positiva. **O:** *Oophaga histrionica*. MP: Marcador de peso (+) Control positivo (-) Control Negativo (#) Números de muestra.....47

Figura 12. Mapa de medios de transporte del Departamento del Cauca. Las flechas indican la dirección que pudo haber tomado *B. dendrobatidis* para ingresar a la región.....53

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1. Cálculos realizados para obtener los volúmenes de reactivos a utilizar para las PCR de 240 muestras.....	37
Tabla 2. Programa de amplificación de PCR específico para <i>B. dendrobatidis</i>	38
Tabla 3. Tabla 3 Número de individuos por especie de anuros evaluados durante el estudio, positivos para <i>B. dendrobatidis</i>	40
Tabla 4. Localidades y especies positivas para <i>B. dendrobatidis</i> . Prevalencia de quitridiomycosis registrada para cada muestra positiva. * Muestra tentativa.....	42
Tabla 5. Cantidades de muestras positivas para <i>B. dendrobatidis</i> registradas de acuerdo al clima según Caldas presentado en las zonas de muestreo. (Los porcentajes de las cantidades de muestras infectadas en cada clima se muestran entre paréntesis).....	44
Tabla 6. Condiciones ambientales observadas en localidades con muestras positivas. * Muestra tentativa.....	49

RESUMEN

Batrachochytrium dendrobatidis es un hongo quítrido que afecta poblaciones de anfibios alrededor del mundo al reducir el tamaño de las mismas, a veces haciéndolas inviables en muy corto tiempo y por causas que no están del todo claras; convirtiéndose así en una de las amenazas más grandes que enfrenta la biodiversidad mundial, haciéndose necesario estudiarlo a fondo para poder encontrar una solución viable al problema que causa. En Colombia, el hongo quítrido se ha detectado en varios departamentos, por lo que es necesario determinar la presencia de *B. dendrobatidis* en el departamento del Cauca, sus rutas de acceso al mismo, las condiciones microambientales que permiten su desarrollo y las especies que se ven involucradas en su ciclo vital. Por medio de muestreos diurnos y nocturnos en los que se utilizó técnica libre se colectaron 240 frotis epidérmicos (swabs) pertenecientes a igual número de anuros de 33 especies en ocho municipios del departamento, desde los 0 hasta los 3300 msnm buscando un amplio rango ecosistémico.

Mediante el método de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), *B. dendrobatidis* se detectó en 14 muestras pertenecientes a 10 especies de anuros de 8 familias presentes en las ecorregiones fisiográficas estudiadas (Andina, Pacífica y Amazónica) del departamento del Cauca.

Nuestros datos muestran las condiciones ambientales que el patógeno necesita para infectar algunas especies de anuros presentes en esta región de Colombia. Asimismo, se discuten aspectos básicos sobre las rutas de acceso que le ha dado la posibilidad al hongo de llegar a las diferentes poblaciones.

1. INTRODUCCIÓN

La aparición de enfermedades y la pérdida de biodiversidad en general están entre los problemas medioambientales más notables que enfrenta el mundo actualmente, donde los anfibios son uno de los grupos de vertebrados en peligro, con casi la mitad de sus especies amenazadas y muchas ya extintas (Angulo *et al.* 2006, Garner *et al.* 2006).

Al Phylum Chitridiomycota pertenecen una serie de especies de hongos que parasitan algunas plantas e invertebrados. Los hongos quitridos generalmente viven en el agua y el suelo. La especie *Batrachochytrium dendrobatidis* es el único hongo de este tipo que afecta grupos de animales vertebrados (Berger *et al.* 1998), se reproduce por medio de zoosporas, llamadas así por la presencia de un flagelo posterior que le da la capacidad de moverse en el agua y de esta manera desplazarse (Woodhams y Alford, 2005).

La sintomatología de la enfermedad que origina llamada quitridiomycosis, es variada y mientras que frecuentemente los individuos infectados mueren sin síntomas externos evidentes, en pocas ocasiones se producen hemorragias locales, úlceras en la piel y, en ocasiones agudas necrosis en órganos internos, apareciendo los síntomas conocidos como hiperemia (enrojecimiento de la piel pálida) en adultos y deformaciones del aparato bucal en renacuajos (Angulo *et al.* 2006).

Aún se desconoce mucho acerca del hongo, la epidemiología, control y tratamiento de la enfermedad, las causas específicas de la muerte de los anfibios afectados, muchos aspectos sobre la manera en que el hongo sobrevive y se extiende en periodos de tiempo en la ausencia de anfibios (Briggs *et al.*, 2005; Angulo *et al.* 2006), así como son desconocidos los mecanismos que utilizan las zoosporas del hongo para entrar a las células hospederas y colonizar la piel de los individuos (Fisher, 2008), haciéndose necesario comprender la relación que pueda existir entre *B. dendrobatidis* y los factores medioambientales. Se tiene certeza de que más de 400 especies de ranas, sapos y salamandras se han registrado como hospederas del hongo, lo que postula a la quitridiomycosis como candidata para ser la enfermedad infecciosa emergente más destructiva alguna vez observada (Fisher, 2008).

Desafortunadamente, a pesar de su importancia, las consecuencias ecológicas de la disminución poblacional de los anfibios no han recibido la atención adecuada por la comunidad científica, que se ha demorado en actuar proporcionándole al hongo la oportunidad de expandir su área de distribución, eliminando cada vez más poblaciones de anfibios (Young *et al.*, 2001; Zippel *com. pers.*, 2007).

Este estudio pretendió dar a conocer la distribución de *B. dendrobatidis* en el departamento del Cauca y discutir las condiciones microambientales requeridas por el hongo y sus posibles rutas de acceso al departamento.

Para esto se realizó la detección del hongo quítrido mediante la identificación de una región específica de ADN, utilizando una técnica biotecnológica conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la cual permitió obtener “in vitro” un gran número de copias de una región del genoma de *B. dendrobatidis* a partir de una preparación de ADN que se obtuvo de una raspado epidérmico de los anuros estudiados. Es importante resaltar que ésta es una técnica muy precisa y confiable debido a que la identificación del microorganismo se realiza con base en la detección de ADN, aun con muy pocas cantidades.

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La disminución a gran escala de las poblaciones de anfibios en el mundo es un acontecimiento que se asocia actualmente con el cambio climático y con la destrucción de su hábitat (Rueda-Almonacid *et al.* 2004). Sin embargo, en muchos casos se producen disminuciones en las poblaciones e incluso desapariciones de las mismas en hábitats bastante conservados o poco intervenidos (Young *et al.*, 2001; La Marca *et al.* 2005), que se definen como enigmáticas ante la ausencia de una causa obvia (Lips *et al.*, 2006). Es ahí cuando se asocia la disminución o desaparición de la poblaciones de anfibios alrededor del mundo con *B. dendrobatidis*, causante de quitridiomycosis (Burgin *et al.* 2005; Kriger y Hero, 2007). Estudios realizados en Australia y Estados Unidos muestran que en el año de 1993, en Queensland (Australia) se empieza a notar un alto nivel de mortandad por una enfermedad infecciosa. Al estudiarla se determinó que está presente en ese país desde 1978, desde donde se derivaron posteriores estudios que se realizaron en varias partes del mundo revelando que este hongo patógeno estaba presente también en Panamá y Nueva Zelanda (Berger *et al.* 1998). Los patógenos rara vez causan la extinción de las especies hospederas y hay pocos ejemplos en los que éstos cambian la riqueza y la diversidad de las comunidades ecológicas por medio de la extinción local de un amplio rango de especies (Lips *et al.*, 2006), sin embargo hoy en día, numerosas poblaciones de anfibios están desapareciendo en los cinco continentes donde se encuentran presentes (Carey *et al.* 2001; Young *et al.*, 2001; Johnson y Speare, 2003; Lips *et al.*, 2006; Fisher, 2008).

Adicionalmente, en Colombia, el país con mayor biodiversidad de anfibios en el mundo (Ron, 2005), todavía es escasa la información sobre la presencia del hongo en las diferentes poblaciones y cuál ha sido su efecto en las mismas. Esto debido a que hay pocos investigadores, algunos lugares son muy remotos o el acceso de los científicos es restringido por problemas de seguridad (Young *et al.*, 2001; La Marca *et al.* 2005; Whiles *et al.*, 2006), por lo que es urgente realizar estudios como este que permitan resolver preguntas, como: ¿En que lugares del departamento del Cauca hay presencia de *B. dendrobatidis*?, ¿Cuáles son algunos de los requerimientos microambientales de *B. dendrobatidis* para infectar poblaciones de anfibios?, ¿Cuáles son las especies de anuros que resultan afectadas por *B. dendrobatidis*?, ¿Cuáles son las rutas de acceso del hongo al departamento del Cauca?, entre otras.

3. OBJETIVOS

3.1. General

Establecer la distribución y las rutas de acceso del hongo quítrido *Batrachochytrium dendrobatidis* en anuros encontrados en las tres regiones fisiográficas continentales (Llanura pacífica, región andina y vertiente amazónica) del Departamento del Cauca.

3.2. Específicos

- Identificar las especies de anuros con quítrido en piel y aquellas que puedan ejercer como portadores de la enfermedad mediante la detección del hongo por PCR.
- Determinar las regiones en el Departamento del Cauca donde hay presencia del hongo quítrido *Batrachochytrium dendrobatidis*.
- Definir las condiciones microambientales requeridas por el hongo para desarrollarse en la piel de los anuros.
- Establecer las posibles rutas de acceso del hongo quítrido *Batrachochytrium dendrobatidis* en el departamento del Cauca.

4. JUSTIFICACION

En 2001 *Batrachochytrium dendrobatidis* fue incluido en la lista de la oficina internacional de enfermedades epizooticas de la vida silvestre; fue la primera vez que una enfermedad de anfibios fue incluida (Johnson y Speare, 2003). En el año 2005 se reunieron en Washington D.C. (EEUU) los herpetólogos más reconocidos en el mundo para discutir sobre la situación actual de los anfibios y sus amenazas. De lo discutido se publicó un documento conocido como “Amphibian Conservation Summit”. El documento dice textualmente sobre la quitridiomycosis: “es la peor enfermedad infecciosa reportada para los vertebrados en términos del número de especies afectadas, y su predisposición para llevarlos a la extinción” (ACAP, 2005).

Debido a que la quitridiomycosis es una enfermedad infecciosa emergente (Longcore *et al.* 1999; Whiles *et al.*, 2006) cuyo efecto se ha notado recientemente en las poblaciones de anfibios, es de vital importancia realizar estudios donde se establezca la presencia de *B. dendrobatidis* y su manera de actuar, que permitan generar maniobras para combatir la enfermedad en poblaciones afectadas y desarrollar estrategias de conservación en las poblaciones sanas para impedir su transmisión y establecer maneras de combatir la enfermedad (Marantelli *com. pers.* 2007).

En investigaciones realizadas por Lips *et al.* (2006) se “predice la pérdida de muchas más especies Neotropicales de anfibios, más inmediatamente de las regiones montañosas hacia el oriente de Panamá. La quitridiomycosis es un alarmante modelo del sistema de extinciones producidas por enfermedades de una gran proporción de la riqueza de especies de la fauna regional, incluso de una porción completa de la Clase Vertebrata, por lo que, bajo esas circunstancias no es correcto hablar sobre la disminución global de los anfibios, sino más apropiadamente de la extinción global de los anfibios”.

En el mundo la investigación sobre la enfermedad es liderada por científicos Norteamericanos y Australianos (Young *et al.* 2001). Actualmente, en Colombia es muy poca la información disponible en colecciones, es restringida y sólo unas pocas especies han sido estudiadas (La Marca *et al.*, 2005). Los estudios científicos sobre presencia de *B. dendrobatidis* en el país son escasos, la mayoría aun se encuentra en ejecución (Fisher y Garner, 2007; Amézquita, *com. pers.* 2008). Frecuentemente en los estudios sobre las disminuciones poblacionales se incluyen pocos sitios de muestreo y pueden desestimar o menospreciar la seriedad de la situación (Young *et al.*, 2001).

Colombia está dividida en cinco regiones naturales continentales y una insular: Andina, Caribe, Pacífica, Orinoquía, Amazonia e Insular. De estas, el territorio del Cauca cuenta con las siguientes subregiones naturales:

- Pacífica, con la llanura del pacífico.
- Andina, con seis subregiones: a) el sector sur de la estribaciones occidentales de la cordillera occidental, b) valle del río Cauca, c) altiplano de Popayán, d) fosa del Patía, e) vertiente Magdalenense de la cordillera Occidental y f) Macizo Colombiano.
- Amazonia, con el piedemonte amazónico (Baja bota Caucana).
- Insular, con las islas Gorgona y Gorgonilla.

En consecuencia, el departamento posee una amplia riqueza ecosistémica proporcionada por las subregiones mencionadas anteriormente, que brindan condiciones para la formación de multitud de nichos y hábitats a gran cantidad de especies de anfibios que podrían estar potencialmente en peligro debido a la presencia del hongo quítrido.

En términos de fauna anfibia el Departamento del Cauca cuenta con 111 especies de anfibios (Ruiz-C y Ardila-R, 1994), que corresponde aproximadamente al 15% del total nacional (733 especies de anfibios reportados para Colombia) (Rueda-Almonacid, 2004), aunque para Suramérica se estima que existe aún una gran cantidad de anfibios por describir (Young *et al*, 2001).

Actualmente en el departamento del Cauca no existen estudios sobre la presencia de *B. dendrobatidis* aunque existen evidencias sobre la disminución esporádica de al menos dos especies de la Familia Bufonidae: *Atelopus eusebianus* y *Atelopus ebenoides ebenoides* (López-López *et al*, datos sin publicar), por lo que es urgente conocer si las poblaciones de estas especies están siendo afectadas por *B. dendrobatidis*, así como la presencia detallada del hongo en esta región del país, y lo que es igualmente importante, empezar a comprender cómo se transmite el patógeno entre los anfibios (Young *et al*, 2001), ya que aunque pequeñas poblaciones de cada especie de anfibios afectados generalmente sobreviven sanas, estos grupos nunca vuelven a recuperar su distribución geográfica original (Carey *et al*, 2001; Young *et al*, 2001). Una vez que se tenga una base de datos de distribución del hongo quítrido consolidada, se puede empezar a trabajar sobre la manera como puede hacerse frente a la enfermedad (Young *et al*, 2001).

La bibliografía registra, para el Neotrópico, que *B. dendrobatidis* afecta poblaciones a grandes altitudes (La Marca *et al*, 2005; Seimon, 2007). Sin embargo, Woodhams y Alford (2005) registran la presencia del hongo en altitudes comprendidas entre 600 y 800 msnm en Australia. Aunque Briggs *et al* (2005) sugieren que en algunas especies de anfibios, las altas temperaturas ambientales (28 °C o superiores) reducen el crecimiento del hongo, y aunque éste no se

inactiva, la mortalidad de las poblaciones disminuye. De acuerdo con esto, Amézquita (*pers. com.* 2008) asevera que el estudio de la presencia del quítrido en el Parque Nacional Natural Gorgona muestra que por lo menos el 60% de los anfibios evaluados resultó positivo para el hongo, por lo que el presente trabajo tratará de determinar si en el departamento del Cauca el hongo sigue el mismo comportamiento, examinando varias poblaciones presentes desde el nivel del mar hasta los páramos del Cauca.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Los Anfibios

La clase Anfibia ha persistido, con extinciones de algunos grupos y la emergencia de otros por al menos 250 millones de años (Carey, 2000). Los anfibios modernos están agrupados dentro de la subclase Lissamphibia; el prefijo *less* significa suave y se refiere a la piel sin escamas, tienen en su ciclo de vida dos etapas, una en el agua y la otra en la tierra. Los anfibios respiran principalmente por pulmones pero también por la piel y dado que el agua se evapora rápidamente a través de su piel, estos animales pueden morir por desecación. Esta subclase se separa en tres órdenes: Gymnophiona: cecilias (con apariencia de gusanos), Anura: ranas y sapos (carecen de cola cuando son adultos) y Urodela: tritones y salamandras (tienen cola durante todo su ciclo vital) (Pough *et al*, 2001).

Los anuros (ranas y sapos), con más de 5400 especies en el mundo, son el grupo más grande de anfibios (Frost, 2009). La mayoría de estos organismos tienen cuerpos pequeños, cabezas grandes y cuatro patas bien desarrolladas, los dos pares de patas son muy diferentes entre sí, adquiriendo un mayor desarrollo y robustez el par posterior, que en algunas especies se encuentra adaptado al salto. Las patas anteriores terminan en cuatro dedos, mientras que las posteriores lo hacen en cinco. La boca es muy ancha, con dientes diminutos o sin ellos, dependiendo de la especie, y con una lengua protractil. Los ojos van provistos de membranas nictitantes y los oídos no llevan pabellones externos, diferenciándose únicamente una membrana timpánica superficial. Los renacuajos (fase larvaria de los anuros) llevan una vida acuática, mientras que los adultos son por lo general terrestres y algunos únicamente vuelven al agua en el momento de la reproducción (Pough *et al*, 2001).

Aunque generalmente no son muy conspicuos, los anfibios pueden abarcar una gran proporción de la abundancia de vertebrados en biomasa de algunos sistemas boscosos y pantanosos de latitudes intermedias y son los vertebrados terrestres más abundantes en los trópicos húmedos, por lo que pueden ser consumidores importantes en sistemas acuáticos y terrestres, pudiendo representar un vínculo energético entre los dos, lo que puede brindarles el rótulo de piezas clave por su impacto en la estructura del ecosistema (Whiles *et al*, 2006).

5.2. Situación Actual de los Anfibios en Colombia

La amplia superficie de Suramérica y sus rasgos topográficos le dan cabida a una amplia serie de climas y patrones de vegetación que ofrecen una gran variedad de hábitats explotados por 1742 especies de anfibios (39% de la riqueza global)

convirtiendo a la batracofauna suramericana en la más rica del mundo. (Duellman 1999).

Los anuros colombianos se clasifican en 15 familias: Aromobatidae, Bufonidae, Centrolenidae, Ceratophryidae, Craugastoridae, Dendrobatidae, Eleutherodactylidae, Hemiphractidae, Hylidae, Leiuperidae, Leptodactylidae, Microhylidae, Pipidae, Ranidae, Strabomantidae, (Frost, 2009). Estas 15 familias se encuentran representadas por 733 especies (Rueda-Almonacid, 2004), de las cuales los mismos autores (2004) registran 45 especies en el Libro Rojo de los Anfibios de Colombia en las siguientes categorías propuestas por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) “En peligro crítico (CR)”, “En peligro (EN)” y “Vulnerable (VU)”. Sin embargo existen especies de anuros Colombianos que se encuentran dentro de otras categorías propuestas por UICN y no se tienen en cuenta dentro del Libro Rojo de los Anfibios de Colombia (Rueda-Almonacid *et al*, 2004). Estas categorías son: “Extinto (EX)”, “Extinto en Estado Silvestre (EW)”, “Casi Amenazado (NT)”, “Preocupación Menor (LC)”, “Datos Insuficientes (DD)” y una bastante común en nuestro país: “No Evaluado (NE)”.

Las principales causas para que una especie de anuro, y en general cualquier anfibio, se incluya en una de estas categorías son: efectos de fragmentación, introducción de especies exóticas, contaminación, cambio climático e incremento de la radiación UV, sobreexplotación de especies y la declinación reciente de las poblaciones de anfibios relacionada con la quitridiomycosis (Rueda-Almonacid *et al*, 2004; Lips *et al*, 2006).

Desde finales de la década de 1970, se han registrado drásticas disminuciones en las poblaciones de anfibios en varios sitios de Norteamérica, Australia y Europa, tanto en zonas intervenidas como en áreas prístinas. Alrededor del mundo se registra que el 43% de las especies están experimentando algún tipo de disminución en sus poblaciones, 32% se encuentran amenazadas, y 122 especies posiblemente se extinguieron (Whiles *et al*, 2006). En al menos 6 países de Suramérica se reportó la extinción o la disminución abrupta de varias poblaciones en los últimos 20 años, y se sabe que éstas ocurren con mayor frecuencia sobre las regiones montañosas ubicadas por encima de los 1000 msnm, y afectan principalmente las poblaciones de especies asociadas a quebradas y cursos de agua, y dentro de éstas a las que tienen renacuajos acuáticos, mientras que las especies sintópicas (con desarrollo directo fuera del agua) son más abundantes (Rueda-Almonacid *et al*, 2004; Ron, 2005).

Uno de los registros indicó que la totalidad de poblaciones de ranas arlequines (Bufonidae: *Atelopus*) experimentaron extinciones y disminuciones en sus poblaciones desde la década de 1980 (La Marca *et al*. 2005), igualmente, otras poblaciones de géneros como *Leptodactylus*, *Telmatobius*, *Eleutherodactylus*, *Cochranella* y *Bufo* (Berger *et al*. 1998; Herrera *et al*. 2005; Seimon *et al*. 2007),

entre otros, presentaron dichas disminuciones. Algunas características previas a este tipo de eventos son encontrar ranas muertas o moribundas a lo largo de las quebradas de alta montaña y deformaciones en el aparato bucal de sus renacuajos (Rueda-Almonacid *et al*, 2004). Alrededor de seis meses después de estos sucesos se encontró solo la mitad de las especies de las poblaciones originales (Lips *et al*, 2006). Casi todas de estas disminuciones sin causa aparente están asociadas a una pandemia provocada por el hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (Lips *et al*, 2006). Esta enfermedad causa en estos vertebrados algunos síntomas como engrosamiento en la piel de ciertas partes del cuerpo, lo que aparentemente dificulta el intercambio gaseoso sofocándolos, al mismo tiempo que libera toxinas que matan a los individuos infectados. Se piensa entonces que un conjunto de factores mencionados anteriormente está debilitando el sistema inmune de los anuros, llevando a muchas de sus especies a la extinción (Berger *et al*, 1998; Morgan *et al*, 2007).

La desaparición de las especies de anfibios puede traer muchos efectos adyacentes sobre los ecosistemas al alterar las cadenas tróficas (ciclos de transferencia de nutrientes y energía e interacciones predador – presa), aumentando algunas enfermedades mortales para los seres humanos tales como la fiebre amarilla, la malaria, el dengue hemorrágico entre otras, debido al aumento de sus vectores y otros insectos, perturbando también el agro en general (Hopkins, 2007). De la misma manera, podrían estar desapareciendo algunas oportunidades para desarrollar la cura de ciertas enfermedades y dolencias tratadas con medicamentos producidos con base en los alcaloides y toxinas extraídos de la piel de algunas especies de anuros, como por ejemplo la epibatidina que es un anestésico aislado de la piel de *Epipedobates tricolor* (Dendrobatidae) (Traynor, 1998).

5.3. El hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis*

Batrachochytrium dendrobatidis, uno de los mayores agentes causales de las disminuciones poblacionales de anfibios (Berger *et al*, 1998; Carey, 2000; Retallick *et al*, 2004; Briggs *et al*, 2005; Lips *et al*, 2006; Fisher y Garner, 2007) fue aislado por primera vez de un individuo muerto de *Dendrobates azureus* (Sin. *Dendrobates tinctorius*). Este hongo se ubica taxonómicamente en el Phylum Chytridiomycota, la Clase Chytridiomycetes y el Orden Chytridiales (Longcore *et al*, 1999).

Los Chytridiomicetos son un grupo muy diverso, han sido encontrados en la mayoría de ambientes que van desde las selvas lluviosas hasta la tundra (Powell, 1993). Frecuentemente son hallados en el suelo y el agua, donde juegan un papel clave en el ecosistema al digerir quitina de cadáveres de insectos, celulosa, polen y queratina de piel y pelo. También han sido encontrados parasitando insectos, otros hongos, algas, plantas y nemátodos (Berger *et al*, 1998; Carey, 2000).

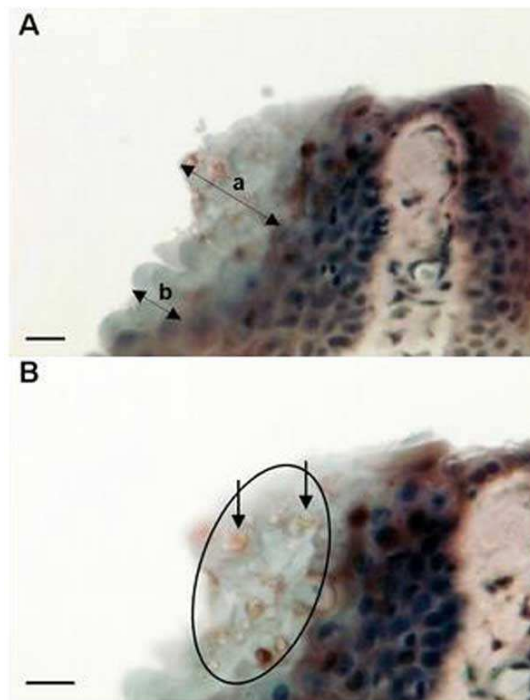


Figura 1. Microfotografías de secciones teñidas mediante técnica de inmunoperoxidasa de un corte transversal de la membrana interdigital de *Xenopus gilli*, destacando la morfología y tamaño de los esporangios de *Batrachochytrium dendrobatidis*. A) La flecha a indica la respuesta hiperplásica localizada en la epidermis; la flecha b indica una región no infectada de la epidermis. B) Las flechas muestran dos zoosporangios. El óvalo indica la localización de la infección en el estrato córneo. Barra, 10 μ m. Tomado de: Weldon *et al.* 2004.

Sin embargo, *B. dendrobatidis*, es el primer integrante de su Phylum en ser reconocido como un parásito de vertebrados. A pesar de que las diferentes hipótesis sobre los efectos de la quitridiomycosis en los anfibios han avanzado, el mecanismo por el cual éste organismo produce la muerte en su huésped aún no es claro (Herrera *et al.* 2005). Algunos anfibios completamente terrestres resultan infectados y declinan, aunque en menor cantidad (Lips *et al.*, 2006). No obstante, se sabe que no todos los anfibios desarrollan quitridiomycosis cuando se infectan con el hongo. También se sabe que factores medioambientales como la temperatura ambiental y el pH del agua pueden afectar la tasa de mortalidad de los anfibios (Piotrowsky, *et al.*, 2004).

B. dendrobatidis ataca preferiblemente anfibios posmetamórficos o adultos debido a su afinidad por la queratina, una proteína epidérmica producida después de la metamorfosis, lo que puede alterar la regulación osmótica de la piel o liberar

enzimas proteolíticas o compuestos tóxicos que son absorbidos por la piel (Carey, 2000). En las larvas, el hongo sobrevive en las partes orales ricas en queratina y luego infecta el estrato córneo queratinizado de los adultos que se forma en la metamorfosis (Fisher, 2008), afectando en primer lugar los dedos y las membranas interdigitales y el parche ventral, que son las partes del cuerpo que tiene mayor contacto con el agua (Angulo *et al.* 2006). Sin embargo los renacuajos de algunas especies no se ven afectados, aunque presenten la enfermedad, hasta que terminan su metamorfosis, etapa en la cual tiene lugar la mayoría de las desapariciones de las poblaciones (Briggs *et al.*, 2005). En condiciones de laboratorio se demostró que ranas y salamandras pueden vivir infectadas entre 24 y 220 días antes de morir, lo que le permite al patógeno cubrir grandes distancias e infectar abundantes poblaciones (Lips, *et al.*, 2006).

B. dendrobatidis es un organismo acuático que tiene dos etapas en su ciclo de vida: un zoosporangio reproductivo sésil y una zoospora (única etapa infecciosa conocida) flagelada que se libera de los zoosporangios presentes en el tejido infectado (Longcore *et al.*, 1999; Johnson y Speare, 2003). Las zoosporas aparentemente son quimiotácticas y pueden sobrevivir en el agua por más de 7 semanas y 12 semanas en arena húmeda de río. Aunque también persistir como saprófitos mientras no hay anfibios para infectar, lo que representa una terrible amenaza, pues el huésped puede permanecer viable aunque no haya un hospedero presente (Longcore *et al.*, 1999; Briggs *et al.*, 2005). Pero incrementan abruptamente su prevalencia en presencia de anfibios, causando mortalidad en grandes masas, generalmente en la estación lluviosa (en países Neotropicales) (Lips *et al.*, 2006). Aunque su capacidad de desplazamiento es bastante limitada (inferior a 2 cm/24 horas en agua estática), pueden ser transportadas a grandes distancias por corrientes de agua (Piotrowsky *et al.* 2004).

Experimentos en condiciones controladas realizados por Piotrowsky *et al.* (2004) demuestran que a temperaturas entre 10 y 25 °C se genera un crecimiento constante de los cultivos de *B. dendrobatidis*. A Temperaturas menores de 4 °C se genera un crecimiento lento (que permitiría su supervivencia en los hospederos durante estaciones invernales en latitudes intermedias y su alto impacto en especies de grandes altitudes en el Neotrópico), mientras que a temperaturas superiores a 30 °C, el 50% de las muestras murió.

Se sugieren dos hipótesis sobre el origen y del hongo. La primera es llamada *Hipótesis de patógeno endémico* y dice que *B. dendrobatidis* es un organismo que siempre ha estado presente en los ecosistemas del mundo, es decir, es cosmopolita; pero un cambio desconocido en su biología terminó por involucrar a los anfibios en su ciclo de vida, Otra posibilidad dentro de esta hipótesis es que por alguna razón el sistema inmune de los huéspedes anfibios se volvió más susceptible a infecciones preexistentes como consecuencia de un cambio medioambiental (Fisher y Garner, 2007). Si bien, la interacción entre el sistema inmune de los anfibios y la defensa contra virus e infecciones fúngicas no ha sido

estudiada en detalle, exámenes histológicos de la epidermis de anfibios con infección por el hongo quítrido muestran poca respuesta inmune. Este fenómeno puede deberse a varias causas: 1) El hongo produce compuestos que inhiben la respuesta inflamatoria, 2) es posible que los macrófagos y los neutrófilos no reconozcan al hongo como un patógeno y 3) el hongo causa tan poca necrosis tisular que no estimula la respuesta inflamatoria (Carey, 2000).

La segunda hipótesis es llamada *Hipótesis del patógeno reciente*, establece que el hongo quítrido se ha esparcido recientemente en nuevas áreas geográficas y nuevos huéspedes de manera antropogénica. Esta hipótesis es la más aceptada, puesto que estudios realizados a muestras de *B. dendrobatidis* de todo el mundo revelan que estas son morfológicamente indistinguibles (Piotrowski, *et al*, 2004) y revelan muy poca diversidad genética entre ellas, lo que sugiere una reciente expansión desde el punto de origen. (Fisher y Garner, 2007).

Una de las formas como se supone que la quitridiomycosis ha ampliado su rango de distribución es a través del comercio y la importación de especies exóticas (Young *et al*, 2001) como algunos anuros venenosos de la familia Dendrobatidae, que por su vistosa coloración son utilizados como animales ornamentales y mascotas. *Rhinella marina* (Anura: Bufonidae) es una especie introducida en muchos países con motivos de biocontrol de plagas, aunque también de manera accidental. La rana toro americana *Lithobates catesbeianus* (Anura: Ranidae) ha sido introducida en muchos países para utilizar su carne, pero desafortunadamente es una rana que se adapta muy bien a diferentes condiciones climáticas, por lo que ha podido establecer poblaciones silvestres (mas no nativas) persistentes que se han diseminado dentro de los países donde se ha introducido. *L. catesbeianus* y *R. marina*, entre otras, son especies en las que se ha demostrado que aunque resultan infectadas por *B. dendrobatidis*, la enfermedad en ellas no es letal (no presentan efectos patogénicos), por lo que le sirven al hongo como reservorio y elemento diseminador de zoosporas (Briggs *et al*, 2005; Lips *et al*, 2006; Fisher y Garner, 2007). Por lo que se sugiere que la quitridiomycosis emerge en un lugar y se transmite de manera rana – rana y ambiente – rana (Lips *et al*, 2006)

Algunos animales que salieron de África central pudieron haberse transportado de manera accidental en medio de cargamentos comerciales de frutas y vegetales (Marantelli *com. Pers*, 2007). Aunque en la década de 1960, la exportación de *Xenopus* spp. (Anura: Pipidae) se realizó a gran escala para utilizar estas ranas en pruebas de embarazo. Un ejemplar de *Xenopus leavis* colectado en 1938 es el animal más antiguo que ha resultado positivo en un análisis histológico para comprobar la presencia de *B. dendrobatidis* (Weldon *et al*, 2004), por lo que se sugiere que es endémica del África.

Muchos anfibios Neotropicales se reproducen durante la estación o época lluviosa, donde los individuos probablemente se encuentran cercanos a cuerpos de agua,

facilitando la rápida proliferación y transmisión de las zoosporas acuáticas del hongo quítrido. La época de reproducción, debido al comportamiento reproductivo (contacto rana – rana) también facilita la infección (Lips *et al*, 2006).

El impacto que *B. dendrobatidis* está generando al causar extinción de poblaciones no sólo afecta a los anfibios, pues al ser piezas clave en el flujo de energía dentro del ecosistema, produce impactos negativos que alteran el libre flujo de energía de la red trófica; ya que los anuros ocupan varios hábitats en el ecosistemas (las larvas se encuentran en el agua, y los huevos y adultos pueden encontrarse en el agua, suelo, y árboles). Por ejemplo, la disminución de las poblaciones de anfibios ha demostrado tener un efecto en la abundancia de serpientes especialistas consumidoras de una o más etapas de los ciclos de vida de los anfibios. También se está incrementando el número de invertebrados que son consumidos por los anfibios, por lo que la inherente tragedia de la pérdida de estos traerá consigo inevitables cambios en los ecosistemas acuáticos y riparios en las regiones donde son o fueron abundantes. (Whiles *et al*, 2006).

En Colombia, *B. dendrobatidis* puede haber llegado desde Panamá a la Costa Atlántica ubicada al norte del País, pero pudo haber llegado al pacífico por vía marítima desde el mismo país centroamericano hasta el puerto de Buenaventura en el departamento del Valle del cauca y desde ahí pudo llegar a diferentes partes de la costa pacífica colombiana. La ubicación geográfica le otorga al departamento del Cauca un lugar privilegiado en la geopolítica colombiana con la República del Ecuador y el resto de América del Sur, siendo la vía panamericana un eje estructural de integración (IGAC, 2008). Precisamente, debido a esta circunstancia es muy posible que el hongo haya llegado a la región andina caucana través de la red nacional de carreteras, particularmente a través de la vía panamericana (Marantelli *com. Pers*, 2007; Amézquita *com Pers*, 2008).

5.4. Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) para detección de *B. dendrobatidis*.

Los primeros estudios sobre *B. dendrobatidis* (Berger *et al*, 1998; Longcore *et al*, 1999) utilizaron técnicas histológicas para detección del hongo. Aunque la técnica era sencilla, no era muy precisa puesto que dependía de la pericia visual de los investigadores (Marantelli *com pers*, 2008). Posteriormente se desarrollaron técnicas de inmunohistoquímica que, por medio de anticuerpos policlonales facilitaba la visualización de las esporas y esporangios de *B. dendrobatidis* (Berger *et al*, 2002). Sin embargo se demostró que estos anticuerpos podían reaccionar con otros quítridiomicetos y al menos un género de hongos ascomicetos, por lo que se necesitaba de manera urgente una técnica ideal: que fuera sencilla, específica y confiable (Annis *et al*, 2004).

La Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR por sus siglas en Inglés) es un método rápido, barato y simple de copiar fragmentos específicos de ADN desde

cantidades mínimas de una fuente mediante una propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar las hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas (Cornell University y IPGRI, 2003)

6. ÁREA DE ESTUDIO

El departamento del Cauca - Colombia está localizado al suroccidente del país, entre las coordenadas 0°58'54" y 3°19'04" de latitud norte y los 75°47'36" y 77°57'05" de longitud al oeste de Greenwich, limita al norte con el departamentos del Valle del Cauca, cuyos límites son los ríos Naya, Cauca y su afluente el río Desbaratado y el Tolima, por el Páramo de Santo Domingo; al oriente con el Huila (franja de territorio en litigio) por la serranía de los Coconucos y Caquetá, por el río Fragua; al sur con Nariño, en donde la serranía de Pinche es el lindero natural, y Putumayo, el río Caquetá; y al occidente con el océano Pacífico donde se ubican las islas de Gorgona y Gorrónilla en jurisdicción del municipio de Guapi (Ver figura 1). Con una extensión de 29.308 kilómetros cuadrados, que corresponde al 2,6% del territorio nacional (IGAC, 2008), el departamento posee una geografía muy variada, aspecto que le permite poseer todas las variantes climáticas, desde las más frías en el nevado del Huila (5.700 msnm) y los volcanes de Puracé y Sotará, hasta las tierras bajas de la costa. Atravesado por las cordilleras Occidental y Central (la cual nace en este territorio), posee también el Macizo Colombiano, donde nacen las principales arterias fluviales del país como son los ríos Magdalena, Cauca, Caquetá y Patía. La parte sur del departamento, conocida como la 'Bota Caucana', forma parte del piedemonte Amazónico colombiano.

La colecta de material se realizó en 8 localidades incluidas en tres regiones fisiográficas del departamento del Cauca – Colombia: Pacífica, Amazónica y Andina, de las seis en total existentes en el país (Pacífica, Amazónica, Andina, Orinoquía, Caribe e Insular).

Marantelli (*com. pers*, 2007) sugiere que se realicen estudios desde el nivel del mar hasta las tierras más altas, puesto que en Australia el hongo fue hallado desde los 600 msnm, enfatizando en realizar muestreos en la regiones fisiográficas Pacífica y Amazónica para descartar la presencia de *B. dendrobatidis* en estos lugares. Sin embargo, Ron (2005) predice la distribución de *B. dendrobatidis* para el Neotrópico, donde Colombia presenta gran vulnerabilidad a este patógeno sólo en la Región Andina por encima de los 1000 msnm. Por esta razón se determinaron seis lugares de muestreo en esta Región.

6.1. Ecorregión Pacífica.

Pertenece según Holdridge (1979) a bosque muy húmedo tropical (BmH-T). Cuatrecasas (1958) la clasifica como selva neotropical inferior y se ubica en promedio entre los 0 y 150 msnm con una temperatura media anual de 28 °C. La precipitación media anual es de 4000 mm.

LOCALIZACIÓN DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA

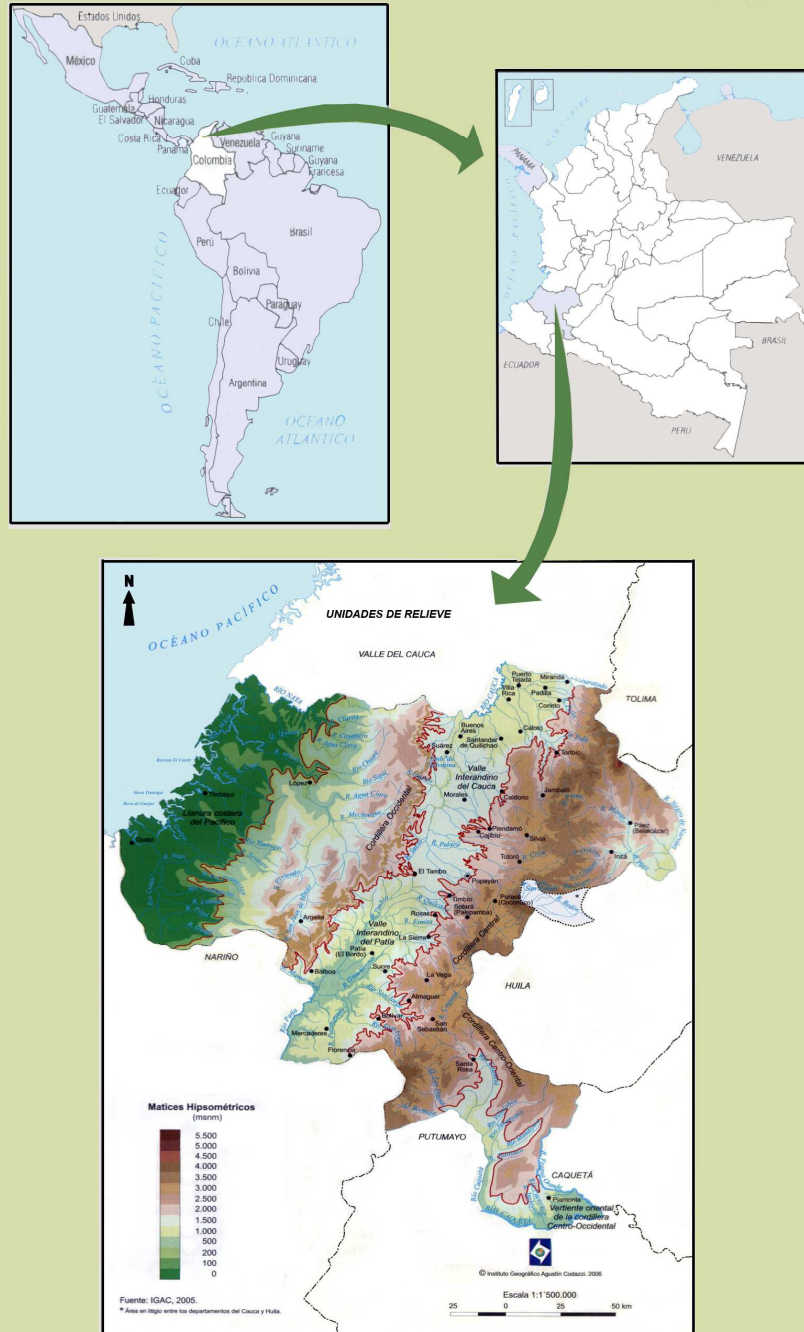


Figura 2. Mapa de localización del Departamento del Cauca. Fuente: IGAC, 2009

donde la cuchilla del río Tambo actúa como divisoria de aguas entre las cuencas de los ríos Cauca y Patía.

6.1.1. Municipio de Guapi. Se encuentra ubicado al suroccidente del departamento del Cauca, y se encuentra bordeando pacífico colombiano. Es un municipio costero sobre el río Guapi, la cabecera municipal está ubicada a 02°33.111'N 077°51.805'W; posee una superficie 90% plana y se caracteriza por abundante vegetación. Su extensión total comprende un área de 2.681 Km². Las jornadas de campo se realizaron en la Hacienda Bonanza, ubicada a 3 km hacia el este de la cabecera municipal (Figura 2).

6.2. Ecorregión Amazónica.

La vertiente amazónica al oriente presenta terrenos abruptos poco aprovechables y está cubierta por bosques húmedos, en ella se encuentran los municipios de Santa Rosa, San Sebastián y Piamonte. Esta es la unidad más pequeña del departamento, se extiende entre el piedemonte de la cordillera Centro-Oriental y los ríos Caquetá y Fragua Grande. Esta unidad está conformada por diferentes niveles de depósitos aluviales y terrazas compuestos principalmente por gravas, arenas y arcillas a las cuales se asocian depósitos de oro.

6.2.1. Municipio de Santa Rosa. Corregimiento de San Juan de Villalobos. El Municipio de Santa Rosa posee una extensión de 3197 Km² y su altitud media es de aproximadamente 1.697 msnm. El Municipio se halla situado en el suroccidente del departamento, siendo uno de los tres municipios que hacen parte de la cuenca del Río Caquetá, lo cual involucra a los municipios que conforman la denominada Bota Caucana en el Macizo Colombiano y el inicio occidental de la Cuenca Amazónica. La temperatura media anual es de 24 °C y la precipitación media de 2900 mm. Según Holdridge (1979) corresponde a bosque muy húmedo premontano (BmH-pM) (Figura 2).

6.3. Ecorregión Andina.

La región andina en el departamento del Cauca se caracteriza por tener una gran variabilidad paisajística que cuenta con una gran abundancia de pisos térmicos y formaciones ecosistémicas correspondientes a la cordillera Occidental, la Cordillera Central, el valle interandino del Patía, el valle interandino del Cauca y el Macizo Colombiano

La Cordillera Occidental se caracteriza por tener un relieve bastante escarpados, especialmente en la vertiente occidental a la cual se asciende en promedio unos 2.500 metros desde la planicie del Pacífico. La intensa meteorización y disección causada por la escorrentía ha formado profundos valles con escarpes altos en la vertiente occidental de la cordillera. Hacia el valle interandino Cauca-Patía las

pendientes son menores en la cuenca del río Cauca, y desde la divisoria hacia el valle del río Cauca la diferencia de altura es menor, entre 1.750 y 2.000 msnm.

Después de la bifurcación de cordillera de Los Andes en el nudo de los Pastos, departamento de Nariño, la cordillera Central atraviesa el departamento del Cauca por el oriente. Esta se caracteriza por tener las mayores alturas promedio del departamento y el país, entre sus alturas más destacadas se encuentran el Volcán Nevado del Huila (5.700 msnm), la cadena volcánica de los Coconucos, los volcanes Paletará (4.400 msnm) y Petacas (3.100 msnm).

El valle interandino del Patía está compuesto por tres sectores claramente diferenciados, el Macizo de Almaguer, la vertiente oriental de la cordillera Occidental, y la planicie propiamente dicha. La planicie del Patía es un lugar de depósito de detritos cordilleranos y materiales volcánicos arrastrados por sus afluentes; la meseta de Almaguer es otro lugar de depósito de materiales provenientes de los volcanes Petacas y Doña Juana.

En el valle interandino del Cauca se diferencian dos áreas, la primera corresponde a la planicie de Popayán, formada por el levantamiento de Los Andes y por la acumulación de material proveniente de los numerosos volcanes de la cordillera Central y posteriormente por el material de rocas cristalinas de esa cordillera y la cordillera occidental. La otra área se encuentra hacia el norte y pertenece a la planicie del valle del río Cauca, tierras planas formadas por los sedimentos aportados durante el Cuaternario por los tributarios del río Cauca.

En el sur del Departamento se encuentra el Macizo Colombiano, que es un nudo orográfico donde se originan las cordilleras Central y Oriental, y es de gran importancia hidrográfica, pues es la principal “estrella fluvial de Colombia”; allí se encuentran los nacimientos de los ríos Cauca, Patía, Magdalena y Caquetá, además de muchos de sus afluentes de la cuenca y una apreciable cantidad de pequeños cuerpos de agua.

Esta región, según Acosta (*com. Pers*, 2007) es la más biodiversa del país, pero asimismo es la más intervenida y la que más destrucción de hábitats de flora y fauna presenta en el territorio nacional.

6.3.1. Municipio de Santander de Quilichao: Se ubica al norte del departamento del Cauca, A 64 Km. de Popayán. Su posición geográfica es de 02°57'08,2"N 076°31'15,6"W, y su altitud es de 1.071 msnm. Con base a la información del IDEAM, se tiene que la temperatura promedio mensual es de 23.5°C; el promedio mensual máximo asciende a 25°C, y el mínimo es 21.8°C. El promedio de precipitación anual es 1.362 mm, el promedio anual máximo es 3.435 mm, y el mínimo es 279 mm (Figura 2).

En el territorio se presenta una distribución del régimen de lluvias bimodal, con dos períodos secos y dos de lluvia. Su oscila entre el 60 y 70%, dentro del territorio municipal. Según Holdridge (1979) Santander de Quilichao corresponde a un bosque húmedo premontano (Bh-pM), y según Cuatrecasas (1958) es una selva neotropical inferior.

6.3.2. Municipio de Cajibío: Vereda Guayabal, Finca Villa Rosario. El municipio de Cajibío posee una Superficie de 747 Km². Se encuentra en el Altiplano de Popayán, sobre las coordenadas 02°37'45,3"N 076°36 '23,1"W, a 29 Km. al norte de la capital caucana. La cabecera municipal se ubica a una altitud de 1.756 metros sobre el nivel del mar, la temperatura media en su cabecera es de 19°C y la precipitación media anual es de 2346 mm. Según Holdridge (1979), Cajibío corresponde a bosque húmedo premontano (Bh-pM), mientras que Cuatrecasas (1958) lo clasifica como Selva Neotropical Inferior. Sus actividades fundamentales son la agricultura, la ganadería y la industria panelera. Sus principales productos agrícolas son: el café, la caña de azúcar el fique, el plátano, las flores. En la minería son importantes el oro y la plata (Figura 2).

6.3.3. Municipio de Totoró. Corregimiento de Totoró. Existen abundantes relictos de bosque, en los que observa una gran diversidad en epifitas, de las familias Orchidiaceae y Bromeliaceae. El lugar se ubica a 2950 msnm y su temperatura media es de 12 °C y su precipitación es de 2500 mm, por lo que Holdridge (1979) lo clasifica como bosque pluvial montano (Bp-M) y Cuatrecasas (1958) como selva andina. Se encuentra entre las coordenadas 02°51,56' N 076°20,77'W (Figura 2).

6.3.4. Municipio de Totoró. Corregimiento Gabriel López. Existen abundantes relictos de bosque enano, así como planicies donde se destacan los frailejones (*Espeletia* spp.) y abundancia de hierbas de la familia Poaceae y Asteraceae. El lugar se ubica a 3300 msnm y su temperatura media es de 10,3 °C y su precipitación es de 1111 mm, por lo que Holdridge (1979) lo clasifica como Húmedo montano (Bh-M) y Cuatrecasas (1958) como selva andina. Se encuentra entre las coordenadas 02°51,56' N 076°20,77'W (Figura 2).

6.3.5. Municipio de Popayán. Vereda La Rejoya. Jardín Botánico Álvaro José Negret. Popayán es la capital del departamento del Cauca. Está situada a una altitud de 1.737 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura promedio de 19°C. se ubica entre las coordenadas 02°31'13,6"N 076°35'44,1"W, con una humedad promedio de 85% y una precipitación media anual de 2000 mm, lo que según Holdridge (1979) corresponde a un Bosque húmedo premontano (Bh-pM) y Cuatrecasas (1958) lo denomina Selva neotropical inferior (Figura 2).

6.3.6. Municipio de Patía. Corregimiento de El Bordo. Hacienda Guayabal: El área pertenece según Holdridge (1979) a un bosque seco tropical (Bs-T) y se ubica a 932 msnm Temperatura media: 23°C. Precipitación media anual: 1.781 mm, entre

las coordenadas 02°04'36,8"N 076°59'07,2"W. Se caracteriza por ser una zona de montañas bajas, ganadera con abundantes relictos de bosque entre las colinas. En éstos relictos de bosque es usual encontrar pequeños riachuelos intermitentes que se forman con la estación de lluvias y desembocan en el río Guachicono (que proviene de las zonas altas de la Cordillera Central) que pasa por los predios de la finca, que se ubica en el Km. 2 de la vía El Bordo - Guachicono. La vegetación del lugar es típica de bajas altitudes intermedias y clima seco (Figura 2).

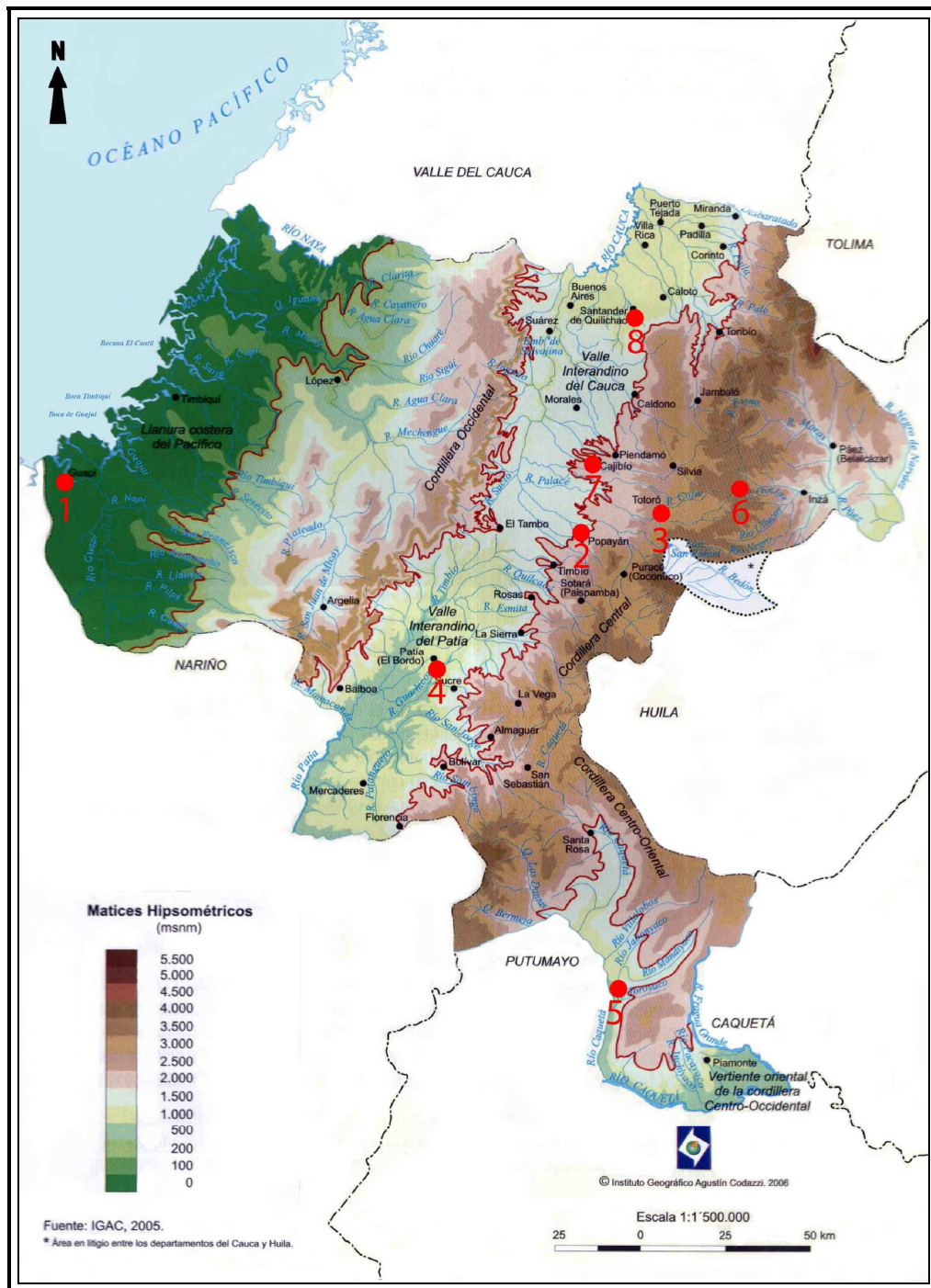


Figura 3. Mapa de Localización de las Áreas de Estudio 1. Municipio de Guapi. 2. Municipio de Popayán. 3. Municipio de Totoró (Totoró). 4. Municipio de Patía. 5. Municipio de Santa Rosa. 6. Municipio de Totoró (Gabriel López). 7. Municipio de Cajibío. 8. Municipio de Santander de Quilichao. Fuente IGAC, 2009

7. METODOLOGÍA

7.1 Fase de campo.

7.1.1. Colecta de anuros: Las jornadas de campo se llevaron a cabo durante 4 días con jornadas diurnas y nocturnas. Para realizar la colecta del material se empleó la técnica libre, que consiste en buscar individuos permitiendo realizar cualquier tipo de movimiento sin tener cuidado de violar límites impuestos en lo que podría ser un transecto y/o parcela para medir abundancia o riqueza. Los individuos fueron capturados con bolsas plásticas cubriendo la mano para evitar posible contagio de *B. dendrobatidis* a los demás individuos colectados por parte de los investigadores. El punto de captura de cada individuo fue georreferenciado.

En el sitio de captura los individuos encontrados se mantuvieron separadamente en las bolsas plásticas que se utilizaron en la captura para evitar el contacto y posible contagio del hongo entre los anfibios capturados. Cuando cada jornada de captura terminó se realizó la colecta del hongo, registro fotográfico, medidas anatómicas y descripción detallada del individuo.

7.1.2. Variables microambientales. Los datos sobre las variables que se tomaron fueron: temperatura y humedad relativa ambiental, altitud sobre el nivel del mar, y tipo de sustrato (hojas, hojarasca, suelo, rocas, agua y briófitas).

7.1.3. Colecta del hongo. El material a colectar fue obtenido por frotis o swab de piel del dorso, vientre y extremidades de los anuros (una muestra por cada rana) con hisopos de algodón estériles, cuyas cabezas fueron depositadas, cada una por separado, en tubos crioviales de tapa O-ring con alcohol etílico al 70%, y luego almacenadas a menos de 4°C como lo indican Brem *et al* (2007). Posteriormente estos hisopos fueron analizados mediante PCR para detectar la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Con el fin de no generar falsos positivos en nuestros resultados, se optó por utilizar guantes de nitrilo en lugar de los de látex puesto que este material puede llegar a ser atravesado por las zoosporas, además, los guantes de nitrilo impiden también la supervivencia de las zoosporas (Mendez *et al*, 2008) evitando el contacto del investigador. Dado que los frotis se realizan sobre la piel de los anuros extrayendo las esporas de los zoosporangios, las características de los guantes de nitrilo no afectan el procedimiento de la toma de las muestras.

Los individuos fueron manipulados con guantes de nitrilo y no de látex (pues las zoosporas pueden atravesar este material) para impedir que los investigadores entren en contacto con el hongo, además, el material del que están hechos los

guantes impide la supervivencia de las zoosporas, lo que podría, en un caso dado generar falsos-positivos (Mendez *et al*, 2008).

Posterior a este procedimiento se sacrificó máximo dos individuos por especie (con motivos de identificación) introduciéndolos, según lo sugerido por Angulo *et al.* (2006), en un preparado de 100 mL de solución concentrada de éter etílico al 96% y etanol al 96% en proporción 1:2, que luego se diluyen en 500 mL de agua y se le adicionan 10 mL de lidocaina con epinefrina al 2%. Se escogió esta solución puesto que es altamente efectiva y deja los ejemplares completamente relajados. Después de sacrificar los individuos, se realizó el montaje de los dos ejemplares según lo sugerido por los mismos autores, fijándolos en formalina tamponada con fosfato de sodio monobásico monohidratado y fosfato de sodio dibásico anhidrado en toallas de papel absorbente dispuestas dentro de una bandeja hermética, colocando los anuros de tal forma que el cuerpo esté flexionado de manera natural, las extremidades derechas y los dedos separados para estirar las membranas. En seguida se cubrieron con otra toalla de papel absorbente humedecida en la solución de formalina tamponada. Después de esperar a que estuvieran rígidos, los ejemplares se etiquetaron en la rodilla derecha y se preservaron en etanol al 70%.

7.2. Fase de Laboratorio

7.2.1. Identificación de los anuros. Se realizó a nivel de especie mediante claves taxonómicas, textos, visitas a museos y a especialistas. Luego de identificado, el material fue depositado en la colección herpetológica de Museo de Historia Natural de la Universidad del Cauca (MHNUC).

7.2.2. Determinación de la presencia del hongo *B. dendrobatidis* en los raspados epidérmicos: Se empleó una modificación de la metodología planteada por Annis *et al* (2004), sugerida por el asesor del estudio.

7.2.2.1. Extracción de ADN.

Antes de empezar la extracción se organizó todo el material utilizado durante esta fase. Puntas, pipetas, tubos, y demás material se expuso a luz UV por 5 minutos. Las puntas utilizadas fueron nuevas y recién esterilizadas. Los tubos se marcaron con el número de colecta de las muestras que se extrajeron. Todo el proceso de extracción se realizó en una cámara de flujo laminar.

Las muestras se mezclaron por 30 segundos cambiando de posición el tubo. Con la ayuda de unas pinzas se escurrió el hisopo muy bien contra la pared del tubo y se retiró, para transferir 300ul de la muestra a un tubo de PCR de 0.5 mL. El hisopo se puso de nuevo en el tubo de colecta. Las pinzas fueron esterilizadas entre muestra y muestra para evitar contaminación.

Posteriormente los tubos de PCR de 0,5 mL se centrifugaron a 12000 rpm x 5 min. hasta que se formó un botón en el fondo del tubo. Después de centrifugar la muestra el sobrenadante fue descartado. Todo el líquido del tubo se vertió en un beaker y se desechó. Posteriormente, el tubo se puso boca abajo sobre un papel toalla para que se absorbiera el etanol restante. Para terminar de evaporar completamente el etanol y evitar que hubiese inhibición se centrifugó con vacío Speed Vac[®] hasta que se evaporara todo el etanol.

Luego de evaporado el etanol, se le agregó a cada tubo 10 µL de PCR buffer 5x y se resuspendió el botón. Inmediatamente, los 10 µL fueron transferidos a un nuevo tubo de 0.2 mL marcado con el mismo número del tubo anterior.

Con el fin de reconocer y diferenciar las muestras positivas de las negativas en los geles de agarosa, se realizaron dos controles (uno positivo y uno negativo). Para el CONTROL POSITIVO se agregaron 5 µL de buffer y 5 µL de cultivo de *B. dendrobatidis* en un tubo de 0.2 mL. Para el CONTROL NEGATIVO se agregaron 10 µL del buffer en un tubo de 0.2 mL.

Después se le agregó 12 µL de GeneReleaser[®] a las muestras incluyendo positivo y negativo. Luego las muestras se llevaron al termociclador y se utilizó el protocolo general que sugieren las instrucciones del GeneReleaser[®] en un solo ciclo, así:

- 65°C x 30 segundos
- 8°C x 30 segundos
- 65°C x 90 segundos
- 97°C x 180 segundos
- 8°C x 60 segundos
- 65°C x 180 segundos
- 97°C x 60 segundos
- 65°C x 60 segundos
- mantener a 80°C.

Posterior a la termociclación, los tubos se centrifugaron a 12000 rpm x 3 min y el sobrenadante (la fase transparente, que contiene el ADN) se transfirió a un nuevo tubo marcado de la siguiente manera: # de colecta + ExtBd. Para retirar el sobrenadante se utilizó una pipeta y se sacó con mucho cuidado de no succionar el GeneReleaser[®] (la fase blanca precipitada que se descarta), esta extracción se almacenó a -20°C hasta que se realizó la PCR.

7.2.2.2. Detección de *B. dendrobatidis* en anfibios con PCR.

1. Se utilizaron reacciones de 12 μL .
2. Se preparó la mezcla utilizando las cantidades calculadas a partir de los valores de la Tabla 1 (abajo). Lo último que se agregó a este mix fue la Taq. Los reactivos siempre se mantuvieron en hielo mientras se hizo la preparación.
3. Se marcaron los tubos de PCR con el número de colecta, además se marcó uno para el control positivo y otro para el control negativo.
4. Los primers específicos para *B. dendrobatidis* que se utilizaron para amplificar la region 5.8S del ADNr nuclear entre los espaciadores internos ITS1 e ITS2 fueron:

Bd1a: 5' - CAGTGTGCCATATGTCACG - 3'

Bd2a: 5' - CATGGTTCATATCTGTCCAG - 3'

Componente	Volumen inicial (μL)	[inicial]	[final]	Volumen final*
GoTaq Green Master Mix (Promega)	6	2x	1x	6 x 240 muestras = 1440 μL
Primer Bd1a	1.2	10uM	1uM	1.2 x 240 muestras = 288 μL
Primer Bd2a	1.2	10uM	1uM	1.2 x 240 muestras = 288 μL
H₂Odd	1.6			1.6 x 240 muestras = 384 μL
ADN	2			
TOTAL	12			2400 μL

Tabla 1. Cálculos realizados para obtener los volúmenes de reactivos a utilizar para las PCR de 240 muestras

5. A cada tubo se le agregó 10 μL de la mezcla y 2 μL de cada individuo. Se hizo mezcla de la muestra antes de poner los 2 μL . Después de servir todas las muestras se hizo vórtex nuevamente a la mezcla con el fin de homogeneizarla y se centrifugaron todos los tubos a baja velocidad durante

* Ejemplo de volumen final de la mezcla calculado para las 240 muestras. Este cálculo debe hacerse dependiendo del número de muestras que se van a amplificar. Se adiciona "una muestra extra" por cada diez que se preparen. El total de la columna de **Volumen final** debe rectificarse dividiéndose por el número de muestras, el resultado debe ser 10 (cantidad de la mezcla que va a cada tubo de PCR)

unos segundos para enviar al fondo los posibles residuos que hubieren podido quedar adheridos a las paredes del tubo.

6. Una vez terminado el proceso anterior, todos los tubos se llevaron al termociclador y se utilizó el programa de amplificación específico para *B. dendrobatidis* establecido por Annis *et al* (2004) (Ver Tabla 2).
7. Para visualizar la presencia de ADN de *B. dendrobatidis* en las muestras, estas deben correrse en un gel de agarosa al 1% inmediatamente después de la amplificación o guardarse en una nevera a -4°C.

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Número de Ciclos
1. Denaturación inicial	95	2 minutos	1
2. Denaturación	95	45 segundos	
3. Anillaje	55	45 segundos	35
4. Extensión	72	1 minuto	
* Los pasos 2 a 4 se repiten 35 ciclos			
5. Extensión final	72	10 minutos	1
Temperatura final de mantenimiento	4	indefinido	1

Tabla 2. Programa de amplificación de PCR específico para *B. dendrobatidis*

7.2.2.3. Electroforesis.

Se preparó el gel de agarosa al 1% mezclando 0,4g de Agarosa con 40ml de TBE** a 0,5X en un beaker y se calentó en el microondas durante 1 minuto. La mezcla debe quedar transparente y con pocas burbujas, en caso contrario, debe calentarse durante más tiempo. Se Agregó 1 µL de Bromuro de Etidio (10 mg/mL). Después de mezclar se vertió sobre el molde. Las burbujas fueron eliminadas con una punta y se dejó solidificar.

** Preparación del TBE:

TBE = Tris + Borate + EDTA

Marca Amresco (Distribuidor GENTECH) (4)5731576 - gentechcolombia.com

Ultra Pure Grade, Code 0478-40L

Almacenar entre 18°C -26°C

Preparación: Solución 1X (0.089M Tris, 0.089M Borate, 0.003M EDTA)

170g del polvo + 1Lt ddH₂O

1. Después de retirar las peinillas y las bandas elásticas, se puso el molde dentro de la cámara de electroforesis y vertió TBE a 0,5X hasta la marca que tiene la cámara.
2. En cada pozo se sembraron 2 μ L del producto del PCR; se sirvió el marcador de peso (1Kb plus DNA ladder de Invitrogen®), luego se sembraron los controles negativo, positivo y posteriormente las muestras.
3. Se encendió la fuente de energía a 70 voltios, 110mA y 60 minutos.
4. Después de terminado el tiempo se observó el gel un transiluminador de luz ultravioleta, esperando una banda cercana a los 300 pares de bases de longitud correspondiente al fragmento de ADN del hongo en muestras positivas para su presencia.

Se recomienda siempre hacer alícuotas de cada reactivo usado para el PCR. Estas deben prepararse en la cámara de flujo laminar para evitar contaminación. Los tubos se deben marcar con fecha y marca: p. Ej.: MasterMix + Promega + Ago/09, estas se almacenan a 4°C.

Igualmente se debe tener una caja para almacenaje donde se guardan los tubos originales de los reactivos y otra caja donde se almacenan las alícuotas.

Este procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio de ecología del comportamiento a cargo del Profesor Adolfo Amézquita Torres de la Universidad de Los Andes (el uso de éste equipo y el acceso a los reactivos correspondientes se autorizó mediante oficio anexo del 15 de Abril de 2008) puesto que la Universidad del Cauca no cuenta con estos equipos.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En la presente investigación se colectaron 240 muestras de frotis epidérmicos de igual cantidad de anuros, pertenecientes a 34 especies incluidas en 8 familias. 14 de las muestras (pertenecientes a 9 especies) resultaron positivas para *B. dendrobatidis* (Ver tabla 3). Lo que corresponde al 5.8% del total de muestras colectadas (Ver figura 3)

FAMILIA	SUBFAMILIA	GÉNERO	ESPECIES	# INDIVIDUOS	#POSITIVOS		
Bufonidae		<i>Rhinella</i>	<i>Rinella gr margaritifer</i>	1	0		
			<i>Rhinella marina</i>	6	1		
Dendrobatidae	Colostethinae	<i>Colostehus</i>	<i>Colostethus fraterdanieli</i>	21	2		
	Dendrobatinae	<i>Oophaga</i>	<i>Oophaga histrionica</i>	5	1		
		<i>Ranitomeya</i>	<i>Ranitomeya minuta</i>	1	0		
Craugastoridae		<i>Craugastor</i>	<i>Craugastor longirostris</i>	1	0		
			<i>Craugastor sp1</i>	1	0		
Eleutherodactylidae	Eleutherodactylinae	<i>Diasporus</i>	<i>Diasporus gularis</i>	2	0		
			<i>Hypsiboas</i>	<i>Hypsiboas boans</i>	2	0	
			<i>Hypsiboas cinerascens</i>	9	0		
			<i>Hypsiboas geographicus</i>	1	0		
			<i>Hypsiboas lanciformis</i>	4	0		
			<i>Hypsiboas punctatus</i>	7	0		
			<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	5	0		
		Hylidae	Hylinae	<i>Dendropsophus</i>	<i>Dendropsophus columbianus</i>	25	3
					<i>Dendropsophus leucophyllatus</i>	15	2
				<i>Scinax</i>	<i>Scinax elaeochrus</i>	5	0
<i>Scinax ruber</i>	6				1		
	<i>Smilisca</i>	<i>Smilisca phaeota</i>	24	1			
Leptodactylidae		<i>Leptodactylus</i>	<i>Leptodactylus colombiensis</i>	30	0		
			<i>Leptodactylus gr fuscus</i>	1	0		
			<i>Leptodactylus hylaedactylus</i>	1	0		
Strabomantidae	Strabomantinae	<i>Pristimantis</i>	<i>Pristimantis achatinus</i>	17	2		
			<i>Pristimantis gaigae</i>	6	0		
			<i>Pristimantis myersi</i>	3	1 Tentativo		
			<i>Pristimantis obmutescens</i>	2	0		
			<i>Pristimantis supernatis</i>	11	0		
			<i>Pristimantis sp1</i>	1	0		
			<i>Pristimantis sp2</i>	1	0		
			<i>Pristimantis sp 3</i>	1	0		
			<i>Phrynophus sp</i>	1	0		
			<i>Pristimantis sp 4</i>	1	0		
			<i>Pristimantis sp 5</i>	1	0		
Ranidae		<i>Lithobates</i>	<i>Lithobates vaillanti</i>	22	1		
TOTAL				240	14		

Tabla 3 Número de individuos por especie de anuros evaluados durante el estudio, positivos para *B. dendrobatidis*.

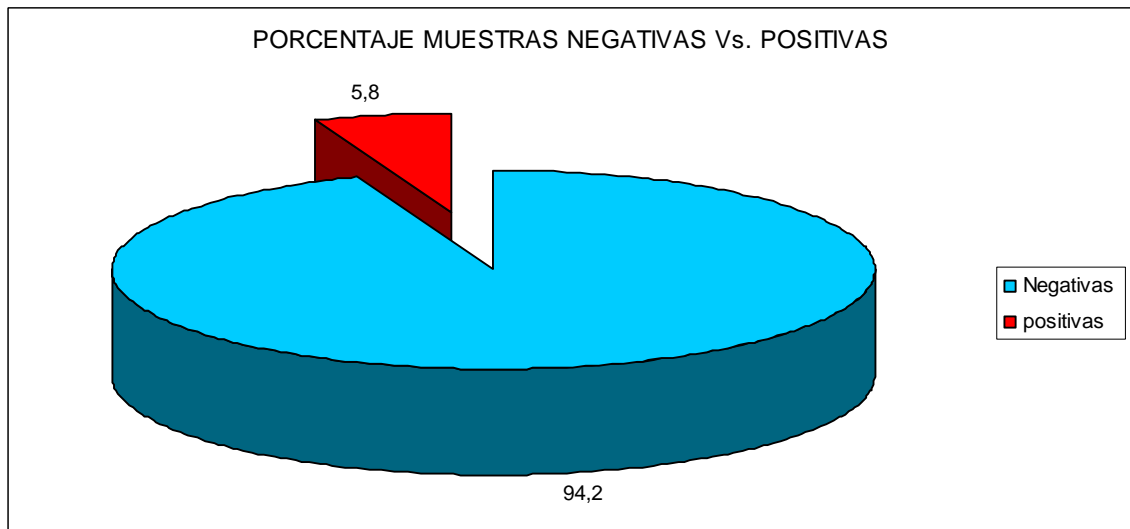


Figura 4. Porcentaje de Muestras Negativas vs. Positivas

Los resultados de nuestro estudio posicionan al Cauca como una localidad con presencia del hongo quítrido en varios de los lugares evaluados, lo que constituiría nuevos registros de distribución de *B. dendrobatidis* para Colombia y el mundo. Aunque en la bibliografía revisada no se conoce algún registro previo de quitridiomycosis en 8 de las 9 especies registradas como positivas para *B. dendrobatidis* en este estudio (Tabla 4), no se puede determinar si estas han sido registradas en algún otro estudio en Colombia, pues en la única base electrónica de datos sobre especies afectadas por el hongo quítrido existente en el mundo (Speare & Berger, 2000) se encuentran datos hasta el año 2004. Esta base de datos no registra entradas para Colombia, pero registra especies infectadas en Venezuela y Ecuador. Sin embargo, para Colombia se registra, mediante técnicas histológicas hechas a más de 1130 ejemplares depositados en museos de diferentes partes del país la presencia de *B. dendrobatidis* en *Atelopus mittermeieri*, *Hyloscirtus bogotensis*, *Pristimantis elegans*, *Hyloscirtus alytolilax*, *Gastrotheca dendronastes*, *Pristimantis thectopternus*, *Pristimantis gracilis*, *Pristimantis palmeri*, *Pristimantis erythropleura*, *Hyloxalus abditauratus*, *Hyloxalus fascianigrus*, *Colostethus fraterdanieli*, *Pristimantis chrysops*, *Pristimantis silverstonei*, *Hyloxalus lehmanni*, *Centrolene buckleyi*, *Nymphargus griffithsy*, *Strabomantis ruizi* y *Pristimantis w-nigrum* (Ruiz & Rueda-Almonacid, 2008 y Velásquez-E *et al*, 2008). Nuestro estudio añadiría 8 de las 9 especies registradas como positivas a la lista de especies afectadas por *B. dendrobatidis* en Colombia (*Colostethus fraterdanieli* ya se encuentra registrada como positiva por Velásquez *et al*, 2000).

LOCALIDAD	ESPECIE	PREVALENCIA DE QUITRIDOMICOSIS
Cajibío	<i>Dendropsophus colombianus</i>	Baja
	<i>Dendropsophus colombianus</i>	Alta
Patía	<i>Colostethus fraterdanieli</i>	Baja
	<i>Rhinella marina</i>	Alta
	<i>Colostethus fraterdanieli</i>	Alta
Guapi	<i>Smilisca phaeota</i>	Alta
	<i>Lithobates vaillanti</i>	Alta
	<i>Oophaga histrionica</i>	Alta
Santa Rosa	<i>Scinax ruber</i>	Media
	<i>Dendropsophus leucophyllatus</i>	Baja
	<i>Dendropsophus leucophyllatus</i>	Alta
Santander	<i>Dendropsophus columbianus</i>	Media
	<i>Pristimantis achatinus</i>	Media
	<i>Pristimantis achatinus</i>	Baja
Tototó – Inzá*	<i>Pristimantis myersi</i>	Baja - Tentativa

Tabla 4. Localidades y especies positivas para *B. dendrobatidis*. Prevalencia de quitridiomycosis registrada para cada muestra positiva. * Muestra tentativa

Si se tiene en cuenta la única lista de fauna anfibia del departamento del Cauca publicada (Ruiz-C y Ardila-R, 1994), que registra 111 especies, la cantidad de especies positivas para *B. dendrobatidis* registradas en este estudio (10) correspondería al 9,9% de la fauna anfibia del Cauca y aproximadamente el 1,5% de la fauna anfibia de Colombia. Sin embargo dicha lista, al ser del año 1994 es bastante antigua y se encuentra muy desactualizada. Consecuentemente, de las 34 especies evaluadas en este estudio, 14 no aparecen registradas y de las 9 especies positivas para el hongo quítrido 5 no se encuentran registradas en el documento publicado por Ruiz-C y Ardila-R (1994), por lo que no es posible establecer la cantidad exacta de especies caucanas que resultaron afectadas por *B. dendrobatidis* en el presente estudio.

Los resultados muestran que *B. dendrobatidis* se encuentra presente en 5 de las 8 zonas de muestreo (más una con presencia tentativa) e indican que este hongo se encuentra ampliamente distribuido en el departamento, ya que estas 5 zonas corresponden a ecosistemas cuyas características son bastante disímiles debido a que están ubicados en las 3 regiones ecofisiográficas del Cauca, comprendiendo además de altitudes aproximadas entre los 0 y los 3000 metros sobre el nivel del mar, ecosistemas con diferentes grados de intervención que van desde bosques con muy poca o ningún tipo de intervención hasta zonas urbanas (Ver Tabla 4).

Aunque la mayoría de la teoría registra, para los países ubicados dentro de la franja intertropical, una serie de patrones de distribución y requisitos medioambientales que sigue *B. dendrobatidis* para infectar poblaciones y generar disminución o extinción de las mismas, en nuestro estudio se halló que *B. dendrobatidis* no siempre cumple con los requerimientos o patrones tenidos en cuenta en este estudio los cuales fueron: distribución, variables microambientales y nivel de prevalencia.

Algunos autores concuerdan con que los anfibios moribundos o muertos a los que se les realiza pruebas para determinar presencia de *B. dendrobatidis* (bien sea por medio de pruebas de histología, histología con marcadores inmunofluorescentes, PCR convencional o PCR en tiempo real) presentan una infección de tipo severo o prevalencia alta de quitridiomycosis (Lips *et al*, 2006; Woodhams & Alford, 2005) (Ver tabla 4).

En este estudio la determinación de la prevalencia de quitridiomycosis como baja, media o alta se realizó de manera subjetiva, teniendo como criterio una comparación visual, es decir, confrontando el grosor y la fluorescencia de las bandas de ADN de las muestras con las de los controles positivos en los geles de agarosa. Aunque es evidente que hay una mayor cantidad de productos de PCR en algunas bandas, la técnica realizada no permite cuantificar la cantidad de fragmentos con exactitud. Por comodidad y porque la cantidad de muestras a termociclar simultáneamente es restringida, las reacciones de PCR se realizaron en series de diferentes cantidades de muestras. Para cada serie se realizó extracción y amplificación de un control positivo y un control negativo. El control positivo, como reza la metodología, fue realizado a partir de un cultivo puro del hongo quitrido con un alto contenido de esporas, lo que supone obtener una alta concentración de moléculas de ADN del mismo, lo cual se refleja en un producto de PCR como una banda ancha y muy fluorescente.

Posterior a la PCR, las muestras se corrieron en geles de Agarosa (1%), donde los resultados arrojaron que la mitad de las muestras positivas presentaron un grosor de banda y una fluorescencia mayores, lo cual indica una cantidad de fragmentos de ADN que visualmente fue igual o superior al control positivo. Las muestras con este comportamiento fueron designadas como “prevalencia alta” (Fig. 4 A, Fig. 5 B-D, Fig. 6 E-G, Fig. 10 O, Fig. 8 I). Las muestras cuyo grosor y fluorescencia fueron un poco menor a la del positivo se denominaron como “prevalencia media” (Fig. 6 F, Fig. 8 J, Fig. 9 N). Y las muestras cuyo grosor y fluorescencia fueron muy inferior a la del positivo se denominaron como “prevalencia baja” (Fig. 5 C, Fig. 8 K-L, Fig. 9 M).

Aunque en el presente estudio 50% de los anfibios infectados presentaron una prevalencia alta y el 21.4% prevalencia media, ningún individuo fue encontrado moribundo o muerto, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Seimon *et al* (2007) (Tabla 5).

PREVALENCIA	CLIMA			
	Cálido	Templado	Frío	TOTAL
Baja	2 (14,3%)	2 (14,3%)	0 (0%)	4 (28,6%)
Media	1 (7,1%)	2 (14,3%)	0 (0%)	3 (21,4%)
Alta	6 (42,9%)	1 (7,1%)	0 (0%)	7 (50%)
TOTAL	9 (64,3%)	5 (35,7%)	0 (0%)	14 (100%)

Tabla 5. Cantidades de muestras positivas para *B. dendrobatidis* registradas de acuerdo al clima según Caldas presentado en las zonas de muestreo. (Los porcentajes de las cantidades de muestras infectadas en cada clima se muestran entre paréntesis).

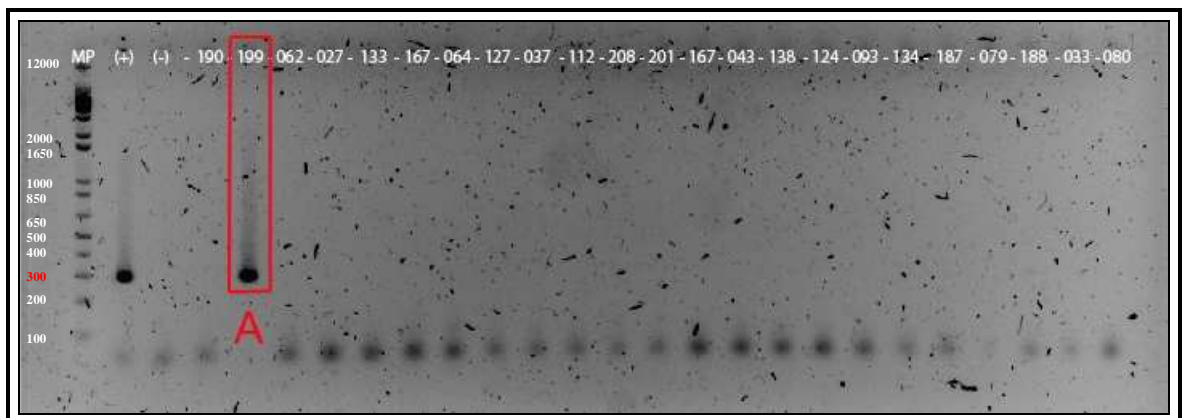


Figura 5. Gel 1. El recuadro resalta la muestra positiva. **A:** *Dendropsophus leucophyllatus*. MP: Marcador de peso (+) Control positivo (-) Control Negativo (#) Números de muestra.

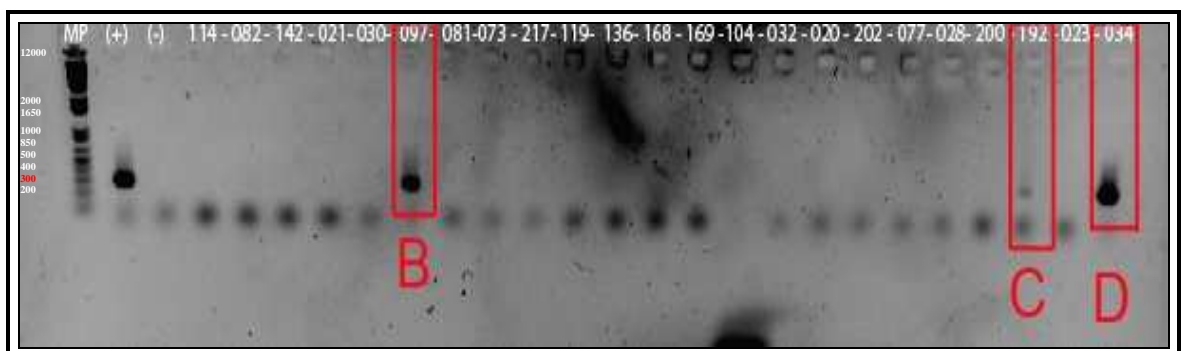


Figura 6. Gel 2. Los recuadros resaltan las muestras positivas. **B:** *Smilisca phaeota* **C:** *Dendropsophus leucophyllatus* **D:** *Rhinella marina* MP: Marcador de peso (+) Control positivo (-) Control Negativo (#) Números de muestra.

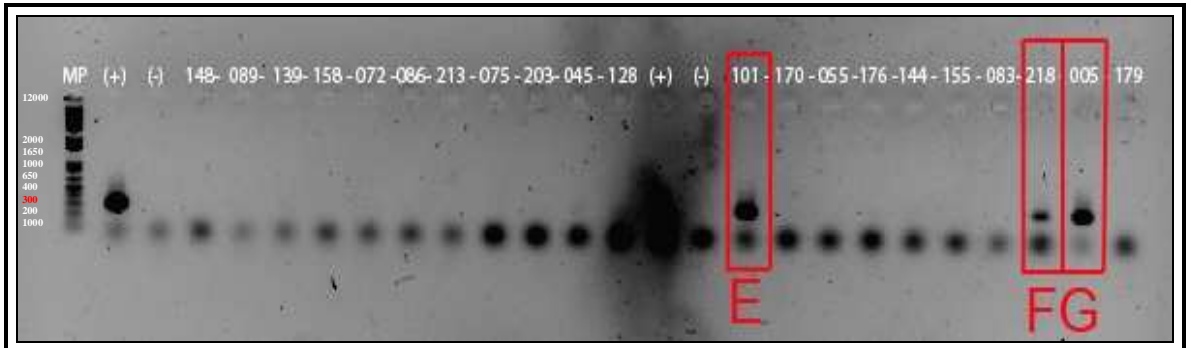


Figura 7. Gel 3. Los recuadros resaltan las muestras positivas. **E:** *Lithobates vaillanti* **F:** *Dendropsophus columbianus* **G:** *Dendropsophus colombianus*. MP: Marcador de peso (+) Control positivo (-) Control Negativo (#) Números de muestra.

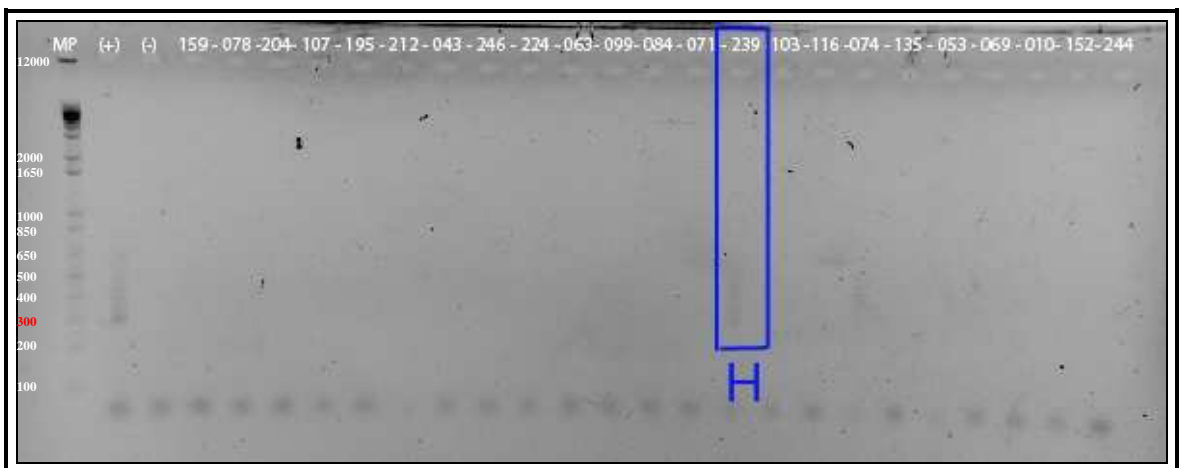


Figura 8. Gel 4. La muestra resaltada en el recuadro azul se designa como tentativa puesto que la intensidad de la banda no permite identificar con certeza la presencia de ADN de *B. dendrobatidis*, sin embargo es considerada debido a que la intensidad del control positivo muestra un comportamiento similar. **H:** *Pristimantis myersi*. MP: Marcador de peso (+) Control positivo (-) Control Negativo (#) Números de muestra.

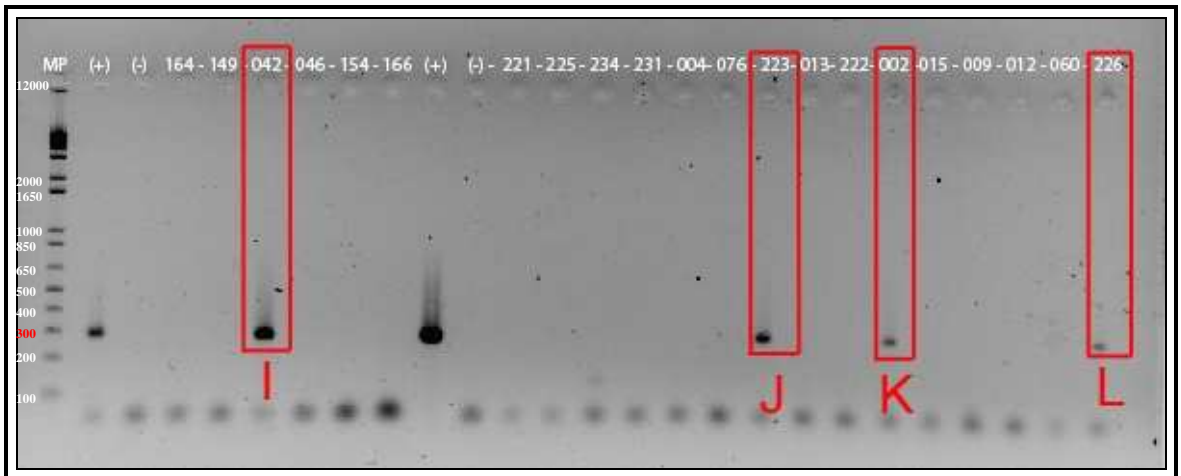


Figura 9. Gel 5. Los recuadros resaltan las muestras positivas. **I:** *Colostethus fraterdanieli* **J:** *Pristimantis achatinus* **K:** *Dendropsophus colombianus* **L:** *Pristimantis achatinus*. MP: Marcador de peso (+) Control positivo (-) Control Negativo (#) Números de muestra.

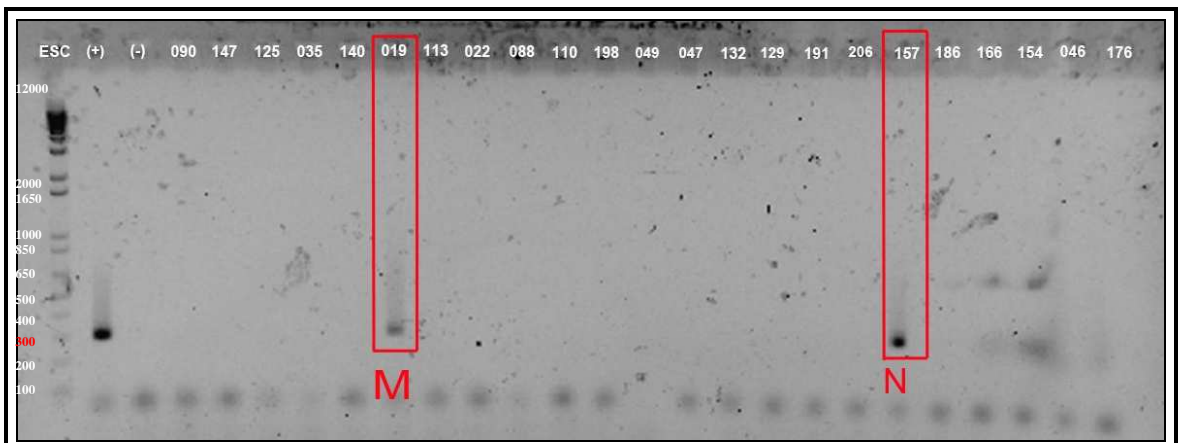


Figura 10. Gel 6. Los recuadros resaltan las muestras positivas. **M:** *Colostethus fraterdanieli* **N:** *Scinax ruber*. MP: Marcador de peso (+) Control positivo (-) Control Negativo (#) Números de muestra.

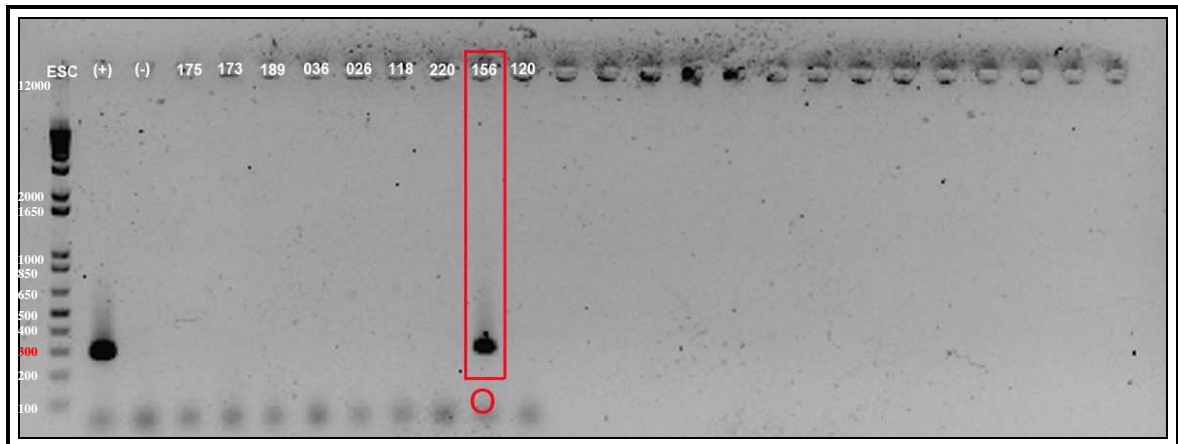


Figura 11. Gel 7. El recuadro resalta la muestra positiva. **O:** *Oophaga histrionica*. MP: Marcador de peso (+) Control positivo (-) Control Negativo (#) Números de muestra.

En todas las zonas de muestreo, las personas del área fueron interrogadas sobre si habían notado la disminución de alguna especie de rana, o habían visto mortalidad de las mismas; a lo que en todos los casos respondieron de forma negativa. Aunque esto no es una información concluyente, si hubiera habido mortalidades en masa en alguna de las zonas evaluadas con población estable o transeúntes, es posible que las personas lo notaran. Sin embargo, en localidades como los bosques de Guapi, Santa Rosa o el Páramo de las Delicias en los límites entre Totoró e Inzá, si hubiere ocurrido disminución o exterminación de las poblaciones de anfibios no se habría podido tener información, puesto que son zonas prístinas o con muy bajo grado de intervención antrópica.

Una posibilidad que podría explicar este tipo de comportamiento es que existan especies en las que a pesar de que presentan una alta prevalencia de quitridiomycosis no se registra disminución en las poblaciones (Lips, *et al*, 2006). Dado que estos individuos infectados no mueren, tienen la capacidad de transportar el patógeno en su piel a otras ranas de otros lugares en procesos normales de interacción entre poblaciones. *Smilisca phaeota*, una de las seis especies reportadas por Lips *et al* (2006) que presentaba estas características se encontró presente en la localidad de Guapi, con un individuo infectado (Ver Figura 5). Por esta razón, Garner *et al* (2005) concluyen que los anfibios asintomáticos siempre deben estar incluidos en estudios epidemiológicos sobre el hongo quitrido. Inclusive, Johnson (2006) concluye que la identificación de posibles vectores es una prioridad de investigación para detener el avance de *B. dendrobatidis*.

Además de no coincidir con la reportes de otros autores sobre el registro de animales muertos o moribundos, otro de los aspectos en los que no coincidimos

del todo con la bibliografía revisada es que algunos como (Young *et al*, 2001, Lips *et al*, 2003, entre otros) registran la presencia de *B. dendrobatidis* en el Neotrópico en especies que se encuentran en rangos de temperaturas bajas. Nuestros resultados revelan que las especies que resultaron positivas para *B. dendrobatidis* fueron evaluadas en localidades con temperatura registrada de 16 °C a 28°C. Incluso, el 64,3% de la totalidad de las muestras positivas y el 50% de las muestras positivas con prevalencia alta de quitridiomycosis fueron halladas en clima cálido (según clasificación climática de Caldas) (Ver Tabla 5). Pero Piotrowski *et al* (2004) y Woodhams *et al*. (2003) concluye que cultivos de *B. dendrobatidis* puede sobrevivir *in Vitro* entre los 4 °C y 28 °C, y su desarrollo óptimo se registra entre los 17 °C y 25 °C, lo que concuerda totalmente con nuestro estudio, pues todas las muestras positivas para el hongo quítrido fueron colectadas entre 16 °C y 28,1 °C. Lips *et al* (2006) también registró individuos con quitridiomycosis a temperaturas que oscilan entre 19 °C y 26 °C (Ver tabla 5).

Consecuentemente, la bibliografía registra para la zona intertropical, la presencia de *B. dendrobatidis* en zonas de altitudes superiores a 1000 msnm (Seimon *et al*, 2006, La marca *et al*, 2004). De hecho, Ron (2005) predice con modelamiento de nichos ecológicos, la presencia de *B. dendrobatidis* en Colombia la Región Andina por encima de los 1000 msnm, que dentro de su análisis figuró como el sitio de mayor predisposición a la presencia del quítrido. Los registros publicados para Colombia han detectado la presencia de éste patógeno ente los 1500 y los 2200 msnm (Ruiz & Rueda-Almonacid, 2008; Velásquez *et al*, 2008). Nuestros resultados en parte coinciden con esta hipótesis, pues 3 de las 14 muestras positivas fueron colectadas por encima de los 1000 msnm en la región Andina y el piedemonte Amazónico (Tabla 6). Pero el mismo autor concluye que la región del Chocó Biogeográfico y el Amazonas colombiano presentan una baja predisposición a la presencia del hongo quítrido y en estas zonas se encontraron 6 muestras positivas, de las cuales 4 presentaron prevalencia alta. Aunque Amézquita *et al* (com. Pers. 2008) registran individuos positivos para el hongo quítrido en la isla Gorgona.

LOCALIDAD	ESPECIE	ALTITUD (msnm)	%HR	T°Amb (°C)	SUSTRATO
Cajibío	<i>Dendropsophus colombianus</i>	1792	75	16	Hoja
	<i>Dendropsophus colombianus</i>	1792	76	16	Rama
Patía	<i>Colostethus fraterdanieli</i>	787	69	23	Suelo
	<i>Rhinella marina</i>	787	50	24	Suelo
	<i>Colostethus fraterdanieli</i>	782	71	22	Hojarasca
Guapi	<i>Smilisca phaeota</i>	21	92	25,4	Agua
	<i>Lithobates vaillanti</i>	6	90	25,7	Agua
	<i>Oophaga histrionica</i>	66	96	30,2	Hojarasca
Santa Rosa	<i>Scinax ruber</i>	1738	76	21,8	Agua
	<i>Dendropsophus leucophyllatus</i>	711	92	20,1	Hoja
	<i>Dendropsophus leucophyllatus</i>	711	92	20,1	Hoja
Santander de Quilichao	<i>Dendropsophus columbianus</i>	1094	72	22,5	Hoja
	<i>Pristimantis achatinus</i>	1095	57	27,4	Hojarasca
	<i>Pristimantis achatinus</i>	1095	53	28,1	Hojarasca
Totoró	<i>Pristimantis myersi</i> *	3247*	80*	7*	Pasto*
	MÁXIMO	5	50	16	Hojarasca
	MÍNIMO	1738	96	28,1	Rama

Tabla 6. Condiciones ambientales observadas para las muestras positivas. * Muestra tentativa

Otro de los parámetros ambientales evaluados fue el porcentaje de humedad relativa (%HR). Nuestros resultados revelaron que las especies de anfibios positivos para *B. dendrobatidis* se ubicaron en un rango de humedad que varió entre el 50% (Patía) y 96% (Santa Rosa) (Tabla 6). La bibliografía registra que el hongo quítrido sólo sobrevive en condiciones húmedas y que la desecación es letal. De hecho, La Marca *et al*, 2004 registra que uno de los posibles tratamientos contra el patógeno consiste en exponer a los anfibios infectados a condiciones de baja humedad relativa ambiental. A pesar de esto, la bibliografía revisada no registra valores específicos de humedad a los que la enfermedad se desarrolla, por lo que no existen puntos de comparación, pero el hecho de que uno de nuestros registros positivos se haya encontrado en el municipio de Patía, que de acuerdo a la clasificación de zonas de vida de Holdridge (1979) corresponde a un bosque seco tropical, típicamente caracterizado por bajos valores de humedad relativa y altas temperaturas, constituye un registro valioso, pues no existen datos publicados sobre presencia de *B. dendrobatidis* en bosques secos tropicales.

No obstante, diferentes estudios (Kriger & Hero, 2007; Lips *et al*. 2006; Woodhams & Alford, 2005; Briggs *et al*, 2005; Parris & Beaudoin, 2004) reportan que muchos de los anfibios encontrados positivos para *B. dendrobatidis* se encontraron asociados a estanques o quebradas, lo que concuerda con nuestros resultados, pues, todos los anfibios positivos para el hongo se encontraron sobre hojas o

ramas, dentro, encima, o cerca de quebradas o estanques. Esta información, exceptuando los registros del municipio de Patía, podría hacer irrelevantes los registros de la humedad relativa ambiental, pues estos anfibios, en caso de empezar a sufrir desecación inmediatamente se sumergirían en el cuerpo de agua asociado.

El departamento del Cauca cubre parte del territorio ocupado por 4 de las cuencas hidrográficas del país; la cuenca del Río Cauca (desembocadura mar Caribe), la del Río Magdalena (desembocadura mar Caribe), la del Río Caquetá (desembocadura Río Amazonas) y la del Río Patía (desembocadura Océano Pacífico). Los resultados de nuestro estudio registraron positivos en las 3 de las 4 cuencas existentes en el departamento (cuencas Cauca, Patía y Caquetá). Estas cuencas cuentan con incalculables cantidades de pequeños afluentes por los que las esporas de *B. dendrobatidis* podrían estar movilizándose entre poblaciones por medio de la corriente y su habilidad para nadar por medio de su flagelo.

Otra de las posibles formas de movilización, como se mencionó anteriormente, es que las esporas viajen dentro de las células epidérmicas de los anfibios y se transporten de una población a otra (Marantelli *com. pers.* 2006) o incluso se ha sugerido que los zoosporangios y las zoosporas de *B. dendrobatidis* pueden sobrevivir sobre plumas por 3 a 4 días, tiempo en el que podrían ser transportados de manera aérea cuando las aves acuáticas se movilizan de un cuerpo de agua a otro. Esto posicionaría a las aves como uno de los agentes dispersores más peligrosos (Johnson & Speare, 2005). En el mismo estudio se determinó que *B. dendrobatidis* es capaz de sobrevivir en tierra húmeda por 4 semanas, por lo que en teoría, cualquier animal que transite por los lugares donde las esporas pueden estar presentes en el suelo puede también convertirse en dispersor potencial. Consecuentemente, no solo los animales serían un dispersor potencial; Marantelli (*pers. com.*), Amézquita (*pers. com.*) y Zippel (*pers. com.*), entre otros, mencionan que los seres humanos pueden transportar las esporas del hongo en el calzado, al transitar por las zonas donde hay presencia de *B. dendrobatidis*.

La población total del departamento del Cauca es 1.268.937 personas y contrariamente a la tendencia que se presenta actualmente en Colombia, la mayor parte de la población caucana (62%) tiene su residencia ubicada en la zona rural (alejada de las cabeceras municipales) (DANE, 2008). Estas cifras indican que las 786.516 personas que viven en el campo son potenciales dispersores de *B. dendrobatidis* y no conocen la existencia del organismo. Estas personas, al ser campesinas, generalmente utilizan botas pantaneras de caucho para no mojarse los pies. Muchas de estas personas (si no son todas) no tienen conocimiento de la existencia del hongo quítrido ni de la importancia de los anfibios en el ecosistema, por lo que es importante pensar en la posibilidad que la dispersión del hongo en el Cauca (de manera inconsciente) tiene un origen antrópico.

También es posible que, como la dispersión de *B. dendrobatidis* en el Cauca, las rutas de acceso del hongo a la zona se hayan dado por medio de animales que cruzan las fronteras (no consideramos que el hongo haya ingresado al departamento por medios propios, puesto que los ríos que recorren el departamento, nacen en el mismo territorio y fluyen hacia el océano pacífico o hacia los departamentos circunvecinos, por lo que las esporas, al ser microscópicas no podrían nadar en contra de la corriente, por muy débil que esta fuere) o antrópicos.

Los medios antrópicos por los que *B. dendrobatidis* puede haber tenido sus rutas de acceso al Cauca son varios y contemplan diversos aspectos, a continuación se describen todas las posibles rutas de acceso al Departamento del Cauca:

- 1) Las tres regiones ecofisiográficas tienen accesos independientes, es decir, las personas no pueden seguir una misma vía para llegar a la Región Pacífica, andina y Amazónica (Figura 11).
- 2) Para acceder a la Región Amazónica caucana hay una única vía que va desde el Departamento del Huila, atravesando la región de piedemonte amazónico caucano hasta el departamento del Putumayo, además de las trochas utilizadas por los habitantes del área, de las cuales la más importante es la trocha Santa Rosa – Descanse – Yunguillo, que comunica la cabecera municipal con la vía Pitalito Mocoa, por lo que sería lógico esperar que (si la presencia de *B. dendrobatidis* en esta región es antropogénica) el hongo haya entrado desde uno de esos 2 departamentos. Aunque no se conocen reportes de quítrido en ninguno de los 2, el departamento del Huila limita al norte con Cundinamarca, donde si existen casos positivos (Flechas-Hernández, *pers com.*) y por carreteras pudo haber ingresado al Huila y subsecuentemente a la Región Amazónica caucana. Por otra parte, el departamento del Putumayo limita al sur con el Ecuador, lugar donde se han presentado casos positivos para el hongo (Speare, 2000) y por ahí pudo haber ingresado al Putumayo y de ahí al Cauca (Figura 11: flechas A y B).
- 3) El municipio de Guapi tiene 3 posibles rutas de acceso. La primera es por vía marítima desde el puerto de Buenaventura en el departamento del Valle (Figura 11: flecha C). El departamento del valle cuenta con varios registros de individuos positivos, por lo que resulta factible que *B. dendrobatidis* haya ingresado a este municipio por esa vía. El segundo punto de acceso es por vía aérea desde Popayán (Cauca) o Cali (Valle) (Figura 11: flechas D); Es factible, que el hongo quítrido haya ingresado desde Cali debido a que, como se mencionó anteriormente, Valle cuenta con registros positivos. El hongo patógeno también puede haber ingresado desde Popayán. Aunque en nuestro estudio no se encontró evidencia de *B. dendrobatidis* en esta localidad, el municipio de Cajibío (dista sólo 25 km de Popayán) resultó positivo para el mismo y es posible que el patógeno esté presente en Popayán pero no lo hayamos detectado debido a que el muestreo en esta

localidad sólo se efectuó en un punto registrado a las afueras de la ciudad y tan solo se muestrearon 1 individuo de *Dendropsophus columbianus* y 4 individuos de *Colostethus fraterdanieli*, especie que resultó positiva en el municipio de Patía, y por último, la movilización de las poblaciones es muy elevada en esta zona, pues existen diferentes factores tales como la minería de oro aluvial, los cultivos ilícitos y por el orden público, el desplazamiento, que hacen que la distribución del hongo se amplíe constantemente en esta zona. Algunas de las trochas más utilizadas son El Plateado – Lopez de Micay, El Plateado – Pinche – Timbiquí, El Plateado – Huisitó y 20 de Julio – Huisitó – Micay.

- 4) La región Andina en cambio, tiene 3 accesos principales (Carreteras nacionales) y varias trochas que no están registradas pero son utilizadas por la población de las zonas limítrofes para comunicarse con poblaciones de departamentos vecinos acortando distancias. Es posible que el quítrido haya ingresado al Cauca desde el departamento del Valle por la Vía Panamericana al norte (Figura 11: flecha E), el departamento del Huila al oriente por la vía interdepartamental (Figura 11: flecha F) y el departamento de Nariño por la Vía Panamericana al sur (Figura 11: flecha G). No existen registros publicados sobre presencia de *B. dendrobatidis* en Nariño o Huila, (aunque hipotéticamente podría haber entrado por esos departamentos). Pero el punto registrado por Velásquez *et al* (2008) más cercano a uno de nuestro estudio corresponde a la Hacienda San Pedro (3°29'N 76°42'W) dista aproximadamente 60 kilómetros del punto más septentrional de nuestro estudio (Santander de Quilichao). La aproximación a las rutas de acceso de *B. dendrobatidis* a la región Andina es más complicada debido a la cantidad de posibles accesos, pero la única evidencia con la que cuenta el presente estudio para plantear una posibilidad de acceso al Cauca es el departamento del Valle, por dos motivos: el primero es que es el único punto cercano con estudios realizados y positivos registrados. El segundo es que Lips *et al* (2006) confirma que *B. dendrobatidis* se está moviendo hacia el oriente desde Panamá, y si se sigue el patrón lo más acertado sería inferir que el quítrido está siguiendo una ruta desde Panamá a través de los Andes colombianos hacia el sur pudiendo haber llegado al Cauca a través de Vía Panamericana, que es la ruta más transitada existente en el Departamento.

Dentro de la región Andina es bastante complicado inferir la manera como *B. dendrobatidis* pudo haberse transmitido entre poblaciones, debido a que no se tienen registros de colecciones que muestren el avance cronológico del hongo quítrido. Sin embargo, Marantelli (*com. pers.*) infiere que, debido a que en esta región la economía se cimienta en la producción de leche y café, los vehículos que transportan dichos productos, al estar en contacto con diferentes zonas rurales en cortos periodos de tiempo pudo haber transportado al hongo quítrido como polizone en los vehículos (p. Ej. La empresa lechera INDUCOLSA S. A. tiene camiones que entran a las fincas

lecheras a recoger el producto de los municipios de Popayán, Totoró y Cajibío en un solo día, llevándola luego a Santander de Quilichao)

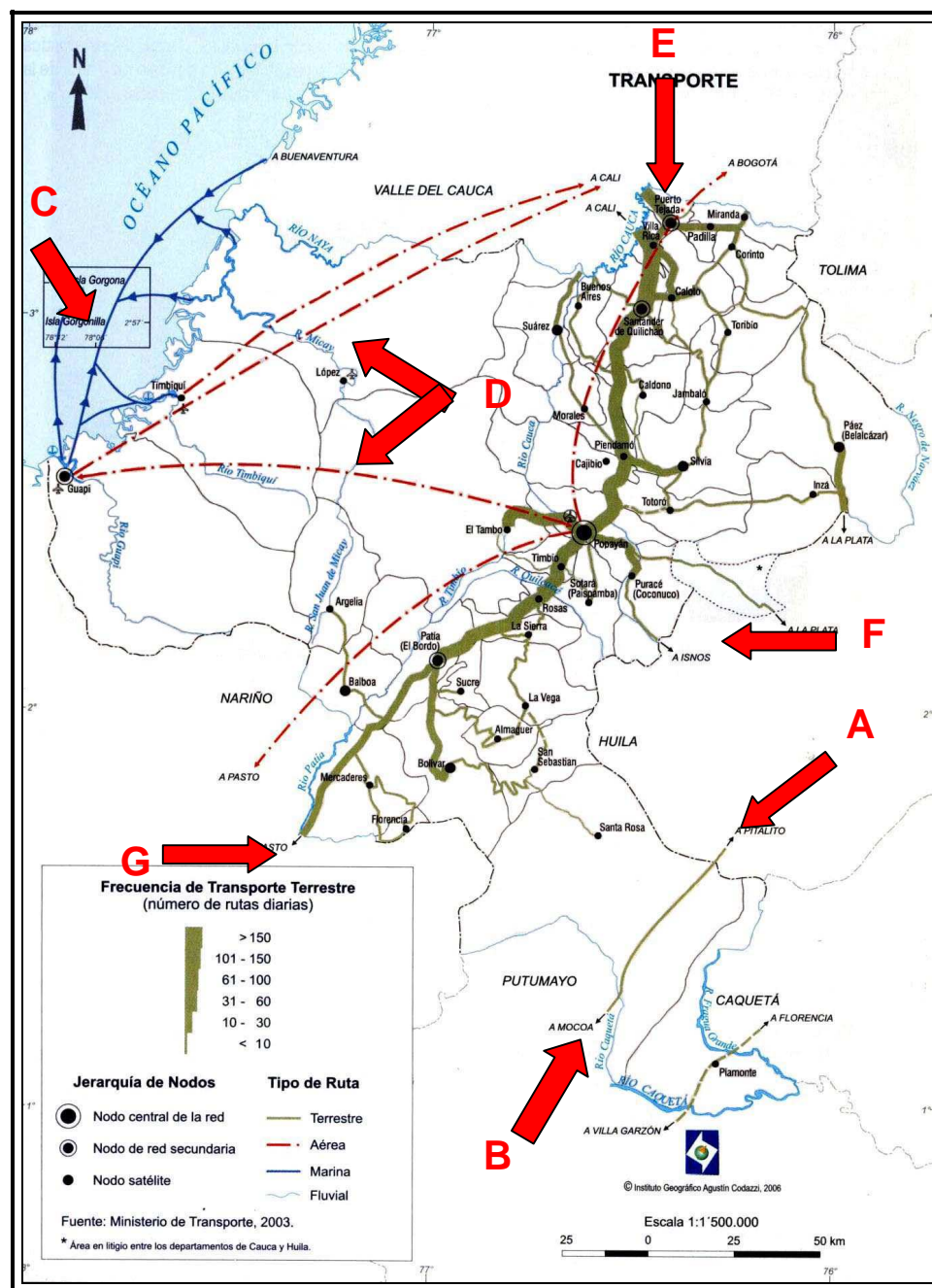


Figura 12. Mapa de los diferentes medios de transporte del Departamento del Cauca. Las flechas indican la dirección que pudo haber tomado *B. dendrobatidis* para ingresar a la región.

10. CONCLUSIONES

El Presente trabajo de investigación es el primero realizado sobre la distribución y rutas de acceso del hongo quítrido *Batrachochytrium dendrobatidis* en el Departamento del Cauca. Los datos obtenidos describen las condiciones ambientales que necesita el patógeno para desarrollarse en algunas especies de anuros presentes esta región del sur-occidente Colombiano. Además, discutimos aspectos básicos sobre las rutas de de acceso que ha seguido el hongo para llegar a las poblaciones infectadas.

La distribución del hongo quítrido en el Departamento del Cauca es considerada como amplia, puesto que se encuentra presente en 5 de las 8 localidades evaluadas (Guapi, Santander de Quilichao, Cajibío, Patía y Santa Rosa), las cuales, además de localizarse en 3 regiones ecofisiográficas del Departamento, representan (cada una) ecosistemas con diferentes características abióticas y bióticas.

Las características del microhábitat que ocupa *B. dendrobatidis* en el departamento del Cauca corresponden en nuestro estudio, a diferentes zonas de vida que se ubican altitudinalmente entre 12 y 1790 msnm, presentan una temperatura registrada que va desde los 16 a los 30.2 °C y un porcentaje de humedad relativa ambiental que varió desde 50% a 96%, lo que no se ajusta plenamente a los hallazgos de diferentes autores que han realizado estudios en Colombia y América Latina y han encontrado individuos infectados por el hongo quítrido en condiciones diferentes a las registradas por la presente investigación.

La presencia de *Smilisca phaeota* y su registro positivo revela que en Departamento del Cauca existe al menos una especie que no contrae quitridiomycosis aunque porte las esporas de *B. dendrobatidis*, lo que implica que está ampliando el rango de distribución del mismo al acarrearlas a otras localidades, poniendo en peligro a las especies vulnerables de las poblaciones de anfibios sanos de la Región Pacífica, puesto que, a pesar de los resultados positivos en esta especie, se observó una alta densidad de individuos de *S. phaeota* en la localidad.

El registro de 10 nuevas especies infectadas solo en el Departamento del Cauca implica que en Colombia, dado que es el país con mayor diversidad de fauna anfibia del mundo, puede llegarse a reportar un alto número de especies portadoras que de manera exponencial podrían afectar muchas mas especies vulnerables en localidades en las que aun no se realizan estudios ni monitoreos, lo cual puede implicar la disminución drástica de poblaciones de anfibios que puede incluir anuros endémicos, poblaciones de gran importancia ecosistémica y la

pérdida de información sobre especies que podrían aportar grandes beneficios para la humanidad a nivel farmacológico.

Aunque los anfibios infectados generalmente desarrollan síntomas rápidamente, ninguno de los individuos evaluados fue hallado moribundo o muerto, ni siquiera en los que resultaron positivos fue observado algún síntoma de los descritos en los anuros enfermos por *B. dendrobatidis*.

Debido al alto número de rutas de acceso al departamento, podemos inferir (según los estudios publicados que registran positivos para *B. dendrobatidis* en Colombia) que el hongo ha ingresado antrópicamente por las rutas de mayor tránsito entre los departamentos (carreteras interdepartamentales y puertos fluviales y marítimos), y una vez en el Cauca pudo movilizarse de diferentes maneras y establecerse en otras zonas por medio de vías y caminos de menor importancia.

La población rural, que corresponde a más del 60% de los habitantes del departamento, puede, sin percatarse de las normas de bioseguridad trasladar esporas de *B. dendrobatidis* hacia poblaciones de anuros sanos y a los cuerpos de agua, lo que permite al hongo quítrido ampliar su distribución de manera constante.

11. RECOMENDACIONES

Se recomienda desarrollar proyectos de monitoreos de anfibios en el departamento, observar el comportamiento de las poblaciones

Con el fin de mostrar los efectos ecológicos que el hongo quítrido pueda acarrear en las localidades objeto de estudio, es recomendable realizar jornadas de trabajo de campo de mayor duración, así como estudios experimentales en laboratorio que puedan recrear las condiciones de ciertas especies in situ para observar los efectos del quítrido y reconocer las especies hospederas portadoras que no desarrollan la enfermedad, así como las que sucumben rápidamente para crear estrategias de conservación efectivas en el Departamento.

Con el propósito de conocer con mayor precisión la localización de *B. dendrobatidis* es preciso obtener en los muestreos un elevado número de especies por zona, para lo que es necesario un esfuerzo de muestreo mayor por localidad.

La mayoría de estudios sobre la disminución y extinción de poblaciones de anfibios se han enfocado en identificar casos y documentar cambios en la abundancia de adultos. Sin pensar en las consecuencias ecológicas de las disminuciones, por lo que se recomienda realizar este tipo de estudios en poblaciones pre y post disminución.

Se recomienda realizar estudios histológicos sobre la presencia de *B. dendrobatidis* en los anfibios caucanos presentes en las diferentes colecciones herpetológicas de los diferentes museos de Colombia, especialmente la del Museo de Historia Natural de la Universidad del Cauca (MHNUC) para poder determinar la localización de las primeras poblaciones infectadas y establecer con exactitud las rutas de acceso del hongo quítrido al departamento del Cauca

Consideramos indispensable realizar investigaciones futuras que proporcionen evidencias sobre la forma como este hongo impacta a las comunidades de ranas silvestres, de manera que arroje información acerca de los medios y las tasas de transmisión en campo, y el efecto del mismo en poblaciones silvestres de ranas. Estas investigaciones también deben arrojar urgentemente información sobre si existen cepas del hongo con diferente patogenicidad para determinadas especies de ranas y si está ocurriendo coevolución huésped – patógeno.

Es indispensable que las corporaciones autónomas realicen capacitaciones o charlas informativas a la población rural sobre la crisis mundial de los anfibios, indicándole a los campesinos sobre su papel como posibles dispersores de *B.*

dendrobatidis, lo que serviría para que desinfecten su calzado con métodos económicos y fáciles de realizar (como sumergir sus botas de caucho en una solución generada con 2 tapitas de Clorox[®] o yodo en 5 litros de agua). Al mismo tiempo, estas charlas podrían servir para vincular a la comunidad, de tal manera que avise a las autoridades ambientales (ICA, UMATA, corporaciones autónomas) sobre mortalidad en masa de anfibios o disminución esporádica de las poblaciones, pues son ellos quienes saben realmente donde están ubicadas.

BIBLIOGRAFÍA

ACAP. 2005. *Amphibian Conservation Summit*, 17 – 19 September 2005, Washington DC. USA.

ANGULO, A., RUEDA-ALMONACID, J.V., RODRIGUEZ-MAHECHA, J.V. y LA MARCA, E., (Eds). 2006. Técnicas de inventario y monitoreo para los anfibios de la región tropical andina. Conservación Internacional. Serie Manuales de Campo N° 2. Panamericana Formas e Impresos S.A. Bogotá D.C. 298 pp.

ANNIS, S.L., DASTOOR, F.P., ZIEL, H., DASZAK, P. y LONGCORE, J.E. 2004. A Rapid Technique to Detect Chytrid Infection in Adult Frogs. En: *Journal of Wildlife Diseases*, Vol. 40. No. 3. pp. 420–428.

BERGER, L., SPEARE, R., DASZAK, P., GREEN, D. E., CUNNINGHAM^F, A. A., GOGGIN C. L., SLOCOMBE, R., RAGAN M. A., HYATT, A. D., MCDONALD K. R., HINES H, ., LIPS K. R., MARANTELLI, G. y PARKES, H. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality, associated with population declines in the rainforest of Australia and Central America. En: *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 95. pp. 9031-9036. 1998.

BERGER, L., HYATT, A. D., OLSEN, V., HENGSTBERGER, S. G., BOYLE, D., MARANTELLI, G., HUMPHREYS, K., LONGCORE, J.E. 2002. Production of polyclonal antibodies to *Batrachochytrium dendrobatidis* and their use in an immunoperoxidase test for chytridiomycosis in amphibians. En: *Dis Aquat Org.* Vol 48. pp 213–220.

BOSCH, J., CARRASCAL, L. M., DURÁN, L., WALKER, S. y FISHER, M., 2006. Climate change and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of Central Spain; is there a link? En: *Proc. R. Soc. B.* Vol. 274. pp.253–260.

BREM, F., MENDELSON, J. R. y LIPS, K. R. 2007. Field-Sampling Protocol for *Batrachochytrium dendrobatidis* from Living Amphibians, using Alcohol Preserved Swabs. Version 1.0 (18 July 2007). Electronic document accessible at <http://www.amphibians.org>. Conservation International, Arlington Virginia, USA.

BRIGGS, C. J., VREDENBURG, V. T., KNAPP, R. A. y RACHOWICS, L. J. 2005. Investigating the population-level of chytridiomycosis: an emerging infectious disease of amphibians. En: *Ecology*. Vol. 86. No. 12. pp. 3149 – 3159.

BURGIN, S., SCHELL, C. B. y BRIGGS, C. 2005. Is *Batrachochytrium dendrobatidis* really the proximate cause of frog decline? En: *Acta Zoologica Sinica*. Vol. 51. No. 2. pp. 344-348.

BURROWES, P. A., JOGLAR, R. y GREEN, D. 2004 Potential causes for amphibian declines in Puerto Rico. En: *Herpetologica*. Vol 60. No. 2. pp. 141 – 154.

CAREY, C. 2000. Infectious Disease Worldwide Declines Amphibian Populations, with Comments on Emerging Diseases in Coral Reefs Organisms and in Humans. En: *Environmental Health Perspectives*. Vol. 108. Suplemento 1. pp. 143 – 149.

CAREY, C., HEYER, R., WILKINSON, J., ALFORD, R. A., ARNTZEN, J. W., ALLIDAY, T., HUNGERFORD, L., LIPS, K. R., MIDDLETON, K., ORCHARD, S. A. y RAND, A. S. 2001. Amphibian Declines and Environmental Change: Use of Remote-Sensing Data to Identify Environmental Correlates. En: *Conservation Biology*. Vol. 15. No. 4. pp. 903 – 913.

CORNELL UNIVERSITY y IPGRY. 2003. PCR-based Technologies – PCR basis. Disponible online en: <http://irc.igd.cornell.edu/MolecularMarkers/PCR%20basics.pdf>

CUATRECASAS J. 1958. Aspectos de la vegetación natural de Colombia. En: *Revista Colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales*. Vol. 10. No. 40. pp. 221-269.

DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO NACIONAL DE ESTADISTICA – DANE., REPÚBLICA DE COLOMBIA. 2008. Censo general 2005, nivel nacional. ISBN: 978-958-624-072-7. pp 481. Disponible on-line en: <http://www.dane.gov.co/censo/files/libroCenso2005nacional.pdf>

DUELLMAN, W. E. 1999. Patterns of Distribution of Amphibians. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, USA. Pp. 1-30

FISHER, M. C. y GARNER, T. W. J., 2007. The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. En: *Fungal Biology Reviews*. Vol. 21. pp. 2 – 9.

FISHER, M. C. 2008. Molecular toolkit unlocks life cycle of the panzootic amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. En: *PNAS*. Vol. 105. No. 45. pp. 17209 – 17210.

FROST, D. R. 2009. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.3 (12 february, 2009). Electronic Database accesible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/>. American Museum of Natural History, New York, USA

GARNER, T. W. J., PERKINS, M. W., GOVINDARAJULU, P., SEGLIE, D., WALKER, S., CUNNINGHAM, A. A. y FISHER M. C., 2006. The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. En: *Biol Lett*. Vol. 2. No. 3. pp. 455–459.

HERRERA, R. A., STECIOW, M.M. y NATALE, G.S., 2005. Chytrid fungus parasiting the wild amphibian *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae) in Argentina. En: *Diseases of Aquatic Organisms*. Vol. 64. No. 3. pp. 247 – 257.

HOLDRIDGE, L. E. 1979. Ecología basada en las zonas de vida. Editorial IICA. San José de Costa Rica.

HOPKINS, W.A., 2007. Amphibians as Models for Studying Environmental Change. En: *ILAR Journal*. Vol. 48, No. 3.

INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTIN CODAZZI. Cauca: Características geográficas. Editorial Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Bogotá D.C. 2006. 344 p.

JOHNSON, M. L. y SPERARE, R. 2003. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Water: Quarantine and Disease Control Implications. En: *Emerging infectious diseases*. Vol. 9. No. 8. pp. 922 – 925.

JOHNSON, M. L. Y SPEARE, R. 2003. Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. En: *Dis Aquat Org*. Vol 65. pp. 181 – 186.

JOHNSON, P. T. J. 2006. Amphibian diversity: Declimation by disease. EN *PNAS*. Vol 13. No. 9. pp. 3011 – 3012.

KRIGER, K. M. y HERO, J.M. 2007. The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is non-randomly distributed across amphibian breeding habitats. En: *Diversity Distrib*. Vol. 13. pp. 781 – 788.

LA MARCA, E., LIPS, K. R., LOTTERS, S., PUSCHENDORF, R., IBANEZ D. R., RUEDA-ALMONACID, J. V., SCHULTE, R., MARY, C., CASTRO, F., MANZANILLA-PUPPO, J., GARCIA-PEREZ, J. E., BOLAÑOS, F., CHAVES, G., POUNDS, J. A. y YOUNG, B., 2005. Catastrophic Population Declines and Extinctions in Neotropical Harlequin Frogs (Bufonidae: Atelopus). En: *Biotropica*. Vol. 37 No. 2. pp. 190–201.

LIPS, K. R., GREEN, D. E. y PAPENDICK, R. 2003. Chytridiomycosis in Wild Frogs from Southern Costa Rica. En: *Journal of Herpetology*. Vol. 37. No. 1. pp. 215 – 218.

LIPS, K. R., BREM, F., BRENES, R., REEVE, J. D., ROSS, A. A., VOYLES, J., KAREY, C., LIVO, L., PESSIER, A. P. y COLLINS, J. P. 2006. Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. En: *PNAS*. Vol. 103. No. 9. pp. 3165 – 3170.

LONGCORE, J., PESSIER, A. y NICHOLS, D. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. ET sp. Nov., a chytrid pathogenic to amphibians. En : *Micology*. Vol 91. pp. 219 - 227

LOPEZ-LOPEZ, F. J., DORADO-SANTA, E. A., ARBOLEDA-SIMMONDS, A. y LEMOS-OLAVE C. X., 2005. Evaluación del estatus poblacional de *Atelopus eusebianus* y *Atelopus ebenoides* en el sector San Rafael, Parque Nacional Natural Puracé, departamento del Cauca y Evaluación del estatus poblacional de *Atelopus eusebianus* y *Atelopus ebenoides* en la región de Malvazá, Municipio de Totoró Cauca-Colombia. Datos sin publicar.

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. En: *Dis Aquat Org*. Vol. 97. pp. 97 – 104.

MORGAN, J.A.T., VREDENBURG, V. T., RACHOWICZ, L. J., KNAPP, R. A., STICE, M. J., TUNSTALL, T., BINGHAM, R. E., PARKER, J. M., LONGCORE, J. E., MORITZ, C., BRIGGS, C. J. y TAYLOR, J. W. 2007. Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. En: *PNAS*. Vol. 104. No. 34. pp. 13845-13850.

PARRIS, M. J. y BEAUDOIN, J. G. 2004. Chytridiomycosis impacts predator – prey interactions in larval amphibian communities. En: *Oecologia*. Vol 140. pp. 626 – 632.

PIOTROWSKY, J. S., ANNIS, S. L. y LONGCORE, J. E. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. En: *Mycologia*. Vol. 96. No, 1. pp. 9 – 15.

POUGH, F. H., ANDREWS, R. M., CADLE, J. E., CRUMP, M. L., SAVITZKY, A. H. y WELLS, K. D., 2001. Herpetology. Second edition. Prentice Hall. New Jersey – USA.

POWELL, M. J., 1993. Looking at mycology with a Janus face: A glimpse of chytridiomycetes active in the environment. En: *Mycology*, Vol. 85. No. 1. pp. 1-20.

- RETALLICK, R.W.R., MCCALLUM, H. y SPEARE, R. 2004. Endemic Infection of the Amphibian Chytrid Fungus in a Frog Community Post-Decline. En: *Plos Biology*. Vol. 2. No. 11. pp. 1965-1971.
- RON, R.S., 2005. Predicting the Distribution of the Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. En: *Biotropica*. Vol. 37 No. 2.
- RUEDA – ALMONACID, J. V., LYNCH, J. D. y AMÉZQUITA, A., (Eds). 2004. Libro Rojo de los Anfibios de Colombia. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Conservación Internacional Colombia, Instituto de Ciencias Naturales – Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente. Bogotá.
- RUIZ-C, P.M., ARDILA-R, M.C., 1994. Fauna Amphibia del departamento del Cauca. En: Novedades Colombianas. En: *Publicación del Museo de Historia Natural de la Universidad del Cauca. Nueva época*. No. 6. pp. 46 – 68
- RUIZ, A. y RUEDA-ALMONACID, J. V. 2008. *Batrachochytrium dendrobatidis* and Chytridiomycosis in Anuran Amphibians of Colombia. En: *Ecohealth*. DOI: 10.1007/s10393-008-0159-z.
- SEIMON, T.A., SEIMON, A., DASZAK, P., HALLOY, S. R. P., SCHLOEGEL, L. M., AGUILAR, C. A., SOWELL, P., HYATT, A. D., KONECKY, B. y SIMMONS, J. E., 2007. Upward range extension of Andean anurans and chytridiomycosis to extreme elevations in response to tropical deglaciation. En: *Global Change Biology* Vol.13. pp. 288–299.
- SPEARE, R., BERGER, L. Global Distribution of Chytridiomycosis in Amphibians. Word Wide Web – <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs.chyglob.htm> .2000.
- TRAYNOR, J. R. 1998. Epibatidine and pain. En: *British Journal of Anesthesia*. Vol. 81. pp. 69-76.
- VELÁSQUEZ, B. E., CASTRO, F., BOLIVAR-G, W., HERRERA, M. I. 2008. Infección por el hongo quitrido *Batrachochytrium dendrobatidis* en anuros de la cordillera occidental de Colombia. En: *Herpetotropicos*. Vol. 4. No. 2. pp. 65 -70.
- WELDON, C., DU PREEZ, L. H., HYATT, A. D., MULLER, R. y SPEARE, R. 2004. Origin of the Amphibian Chytrid Fungus. En: *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 10. No. 12. pp. 2100-2105.
- WHILES, M. R., LIPS, K. R., PRINGLE, C. M., KILHAM, S. S., BIXBY, R. J., BRENES, R., CONNELLY, S., COLON-GAUD, J. C., HUNTE-BROWN, M., HURRYN, A. D., MONTGOMERY, C. y PETERSON, S. 2006. The effects of

amphibian population declines on the structure and function of Neotropical stream ecosystems. En: *Front Ecol Environ* Vol. 4. No. 1. pp. 27 – 34.

WOODHAMS, D.C. y ALFORD, R.A. 2005. Ecology of Chytridiomycosis in Rainforest Stream Frog Assemblages of Tropical Queensland. En: *Conservation Biology*. Vol. 19. No. 5. pp. 1449-1459.

YOUNG, B. E., LIPS, K. R., BREASER, J. K., IBÁÑEZ, R., SALAS A. W., CEDEÑO, J. R., COLOMA, L. A., RON, S., LA MARCA, E. MEYER, J. R., MUÑOZ, A., BOLAÑOS, F., CHAVES, G. y ROMO, D. 2001 Population Declines and Priorities for Amphibian Conservation in Latin America. En: *Conservation Biology*. Vol. 15. No. 5. pp. 1213 – 1223.