



Facultad de Ingeniería y Ciencias

Acta de Correcciones al Proyecto de Grado Biología

Fecha: Abril 29 de 2021

Autores: ANDRÉS FELIPE RODRÍGUEZ BETANCOURT

Nombre del Proyecto de Grado: VALORACIÓN DEL POTENCIAL DE LA RANA INVASORA *Eleutherodactylus johnstonei* COMO VECTOR DEL HONGO PATÓGENO (*Batrachochytrium dendrobatidis*)

Director: SANDRA VICTORIA FLECHAS

Como indica el artículo 2.27 de las Directrices de Trabajo de Grado, he verificado que los estudiantes indicados arriba han implementado todas las correcciones que los Jurados del Proyecto de Grado definieron que se efectuaran, como consta en el Acta de Calificación correspondiente.

A handwritten signature in black ink, reading "Sandra V. Flechas H.", written over a horizontal line.

Firma del Director del Proyecto de Grado

Nota de Aceptación

Aprobado por el Comité de Trabajo de Grado
en cumplimiento de los requisitos exigidos por la
Pontificia Universidad Javeriana para optar el
título de Biólogo.

Dr. HERNAN CAMILO ROCHA NIÑO
Decano Facultad de Ingeniería

DR. MATEO LOPEZ VICTORIA
Director Carrera Biología

Sandra Victoria Flechas
Director Trabajo de Grado

Nestor David Correa Ortiz
Jurado 1

Wilmar Bolívar
Jurado 2

VALORACIÓN DEL POTENCIAL DE LA RANA INVASORA *Eleutherodactylus johnstonei* COMO VECTOR DEL HONGO PATÓGENO *Batrachochytrium dendrobatidis*

ANDRÉS FELIPE RODRÍGUEZ BETANCOURT

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA CALI
FACULTAD DE INGENIERIA Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS
CARRERA DE BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI 2021**

VALORACIÓN DEL POTENCIAL DE LA RANA INVASORA *Eleutherodactylus johnstonei* COMO VECTOR DEL HONGO PATÓGENO *Batrachochytrium dendrobatidis*

ANDRÉS FELIPE RODRÍGUEZ BETANCOURT

DIRECTORA

SANDRA VICTORIA FLECHAS

CODIRECTORA

NICOLA S. FLANAGAN

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA CALI

FACULTAD DE INGENIERIA Y CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS

CARRERA DE BIOLOGÍA

SANTIAGO DE CALI 2021

Resumen

La quitridiomycosis, causada por el hongo microscópico *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), es al día de hoy una de las principales amenazas hacia la supervivencia de los anfibios a nivel mundial. Su incidencia sobre 501 especies y la marcada variación en los grados de tolerancia al patógeno por parte de éstas, plantea la necesidad de monitorear la incidencia de *Bd* en ensamblajes de anfibios de manera continua. Un factor a considerar al momento de entender la dispersión del hongo hacia ambientes nuevos es la introducción de especies invasoras a nuevos hábitats por medios antrópicos, más aún cuando se tienen registros de altos niveles de tolerancia a la infección por parte de algunas de estas especies. Este estudio, plantea la primera valoración en Suramérica de la prevalencia de *Bd* sobre la especie invasora *Eleutherodactylus johnstonei*. Se muestrearon 124 individuos, de los cuales 104 corresponden a *E. johnstonei*, 2 a *Boana xerophylla*, 12 a *Dendropsophus columbianus* y 6 a *Scinax ruber* en seis localidades de la zona periurbana del municipio de Jamundí. Se realizó extracción de DNA usando GeneReleaser (Bioventures inc) y se realizó PCR convencional utilizando los primers Bd1a y Bd2a (Annis et. al., 2004). Se obtuvo únicamente un resultado positivo para *Bd* en la especie *Scinax ruber*, que fue enviado a Macrogen – Korea, para su posterior secuenciación. Se presenta la secuencia consenso de la región ITS rRNA obtenida mediante el software Geneious versión 6.0, correspondiente a *Bd* y se discuten las implicaciones de este resultado positivo para la zona.

Palabras clave: *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Eleutherodactylus johnstonei*, Quitridiomycosis, PCR convencional, Especie invasora

Summary

The chytridiomycosis, a disease caused by the pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) is nowadays one of the main threats to amphibian survival worldwide. Its presence in at least 501 species and the marked variation in tolerance to the pathogen raises the need to continuously monitor the incidence of *Bd* in amphibian assemblages. One of the keys to understand the spread of *Bd* through new environments is the anthropogenic trade and human facilitated dispersion of invasive species, especially because there are several records of high tolerance to infection by some of these species. This study, provides the first assessment of *Bd* prevalence on the invasive species *Eleutherodactylus johnstonei* in South America. 124 individuals were sampled in the periurban area of the municipality of Jamundí, of which 104 correspond to *E. johnstonei*, 2 to *Boana xerophylla*, 12 to *Dendropsophus columbianus* and 6 to *Scinax ruber*. DNA extraction was performed using GeneReleaser extraction kit (Bioventures inc) and end-point PCR was performed using primers Bd1a and Bd2a (Annis et. Al., 2004). Only one individual, belonging to the species *Scinax ruber* was positive for *Bd*. The sample was sent to Macrogen – Korea for subsequent sequencing. The consensus sequence of the ITS rRNA region obtained using Geneious software version 6.0 is presented and I discuss the implications of this positive result for the locality.

Key words: *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Eleutherodactylus johnstonei*, chytridiomycosis, End-point PCR, Invasive species.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis directoras Vicky Flechas y Nicola Flanagan, por su paciencia, entrega, disponibilidad y compromiso incondicional durante el desarrollo de este trabajo. También al profesor Gustavo Kattan (Q.E.P.D) por sus asesorías invaluableles durante las primeras etapas de planeación del proyecto. A mi familia por apoyarme y a mis compañeros/as de carrera por acompañarme durante este proceso.

Tabla de contenido

Resumen.....	5
Summary	6
Agradecimientos	7
Introducción.....	9
Background anfibios	9
Estado de conservación	9
Amenazas	9
Técnicas de detección de <i>Bd</i> y antecedentes en el país	11
Antecedentes, especies de desarrollo directo (coquí) e inclusión de <i>Eleutherodactylus johnstonei</i> en el planteamiento	12
Materiales y métodos	14
Área de estudio	14
Extracción de DNA, amplificación y secuenciación.....	15
Resultados	16
Discusión.....	17
Conclusión	20
Referencias bibliográficas	20
Anexos.....	24

Introducción

Background anfibios

La clase amphibia, posee a la fecha 8287 especies descritas, 214 de éstas pertenecen al orden Gymnophiona (cecilias), 759 al orden Caudata (salamandras y tritones) y 7250 al orden Anura (ranas y sapos), siendo este último, el de mayor diversidad dentro de la clase (Frost 2020). A nivel ecológico, los anfibios participan en procesos como la bioturbación y el ciclado de nutrientes (Cortés-Gomez et al., 2015). Desempeñan el rol de predadores primarios, lo que ayuda a regular tamaños poblacionales de insectos y otros invertebrados y facilitan el flujo energético como biomasa y alimento entre invertebrados y vertebrados de mayor tamaño (Stuart, et al., 2008). En términos de biomasa total y de abundancia en ecosistemas del neotrópico, superan a otras clases de vertebrados terrestres, como mamíferos, reptiles y aves (Stuart, et al., 2008).

Estado de conservación

En la década de 1980, se reportaron disminuciones drásticas en el número de individuos de diversas especies de anfibios en hábitats donde no era evidente un efecto antropogénico representativo al cual atribuir esta pérdida (Carey, 1993; Crump et al., 1992; Pounds et al., 1997). No obstante, no fue hasta 2004 con la Evaluación Global de los Anfibios (Global Amphibian Assessment, GAA) desarrollada por la IUCN, que se evaluó el estado de conservación a nivel de clase y se reconoció un aumento en el grado de amenaza sobre 435 especies con respecto a la clasificación existente en la década de 1980, con lo cual se incluyó el 32.5% de los anfibios descritos hasta el 2004 en alguna categoría de amenaza (Stuart et al., 2004).

En la actualidad, se estima que el 41% de las especies de anfibios se encuentran amenazadas, generalmente con una tendencia a la disminución en sus tamaños poblacionales (IUCN 2020). Este grado de amenaza contrasta con el de otros grupos, como mamíferos o aves, los cuales poseen 26% y 14% de sus especies en alguna categoría de la IUCN, respectivamente (IUCN, 2020). Estos valores no consideran a las especies no descritas, aquellas con datos deficientes o sin evaluar, por lo que el valor real debe ser mayor.

Amenazas

A partir de la evaluación global, se reconoció que el 52% de la disminución en los tamaños poblacionales de las especies de anfibios conocidas era atribuible a factores como la pérdida de hábitat y sobreexplotación. Sin embargo, muchas de las disminuciones, casi un 48% de éstas no eran explicadas por estos dos procesos (Stuart et al., 2004). Actualmente se reconoce que además de los factores nombrados anteriormente, los declives globales en las poblaciones de anfibios se encuentran mediados por la presencia de especies invasoras, cambio climático, compuestos tóxicos en el ambiente y enfermedades emergentes, como la quitridiomycosis cutánea (Stuart et al., 2008). Esta enfermedad es causada por el hongo

microscópico *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), desconocido para la comunidad científica hasta 1998 (Berger et al., 1998; Daszak et al., 1999; Longcore et al., 1999), cuando se describió por primera vez la existencia de un quitridiomiceto actuando como parásito en vertebrados (Berger et al., 1998; Daszak et al., 1999). Este descubrimiento surgió al evaluar eventos masivos de mortalidad en anuros de montaña en Australia y Panamá (Berger et al., 1998) y a través de los años, ha adquirido relevancia como uno de los principales agentes etiológicos ligados a la pérdida global de poblaciones, lo que ha estimulado los esfuerzos de investigación sobre su fisiología, biogeografía, mecanismos de acción en el hospedero y patogenicidad (Berger et al., 2005; Mendoza-Almeralla et al., 2015; OIE, 2017; Piotrowski et al., 2004; Skerratt et al., 2007).

El ciclo de vida de *Bd* tiene dos fases. Durante la primera se da el proceso de dispersión a partir de zoosporas móviles uniflageladas de vida corta (Berger et al., 2005; Piotrowski et al., 2004) lo que implica un ciclo de vida altamente ligado a fuentes hídricas o a grados elevados de humedad en el ambiente ya que fisiológicamente *Bd* no tolera condiciones de desecación (Piotrowski et al., 2004). La segunda fase consiste en la propagación asexual del patógeno sobre el tejido del hospedero, mediante la proliferación de una estructura de talo monocéntrico que se deriva en la formación de un zoosporangio alojado en la epidermis estratificada (OIE 2017), y que posteriormente continúa desarrollándose hacia las células distales queratinizadas, donde se da un rompimiento de la membrana celular epidérmica y una apertura hacia la superficie (Berger et al., 2005) (Figura 1). El proceso de infección está dado exclusivamente sobre estructuras queratinizadas, por lo que la ocurrencia en renacuajos se encuentra limitada a las partes bucales (OIE 2017).

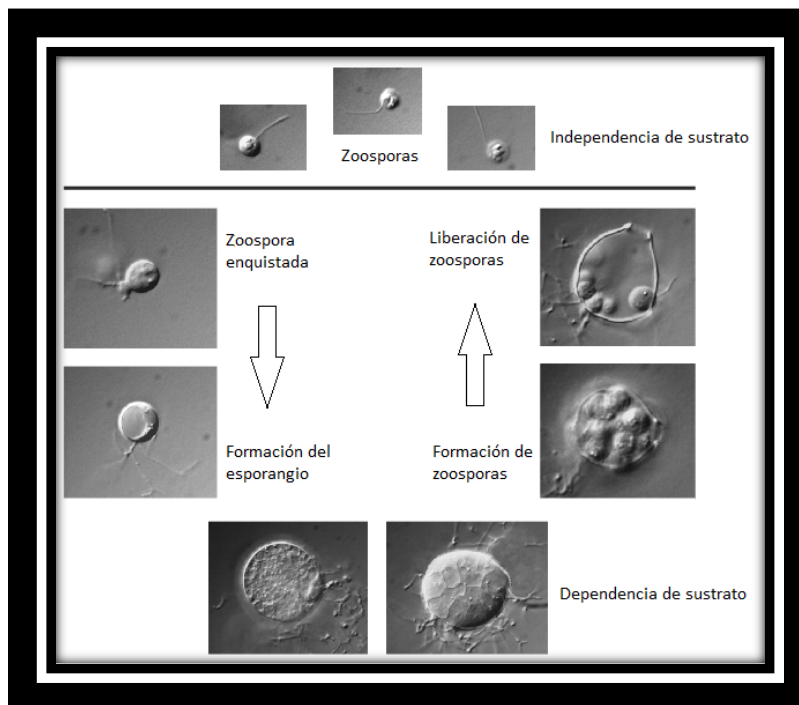


Figura 1 Ciclo de vida de *Bd*. Adaptado de Rosenblum et al., 2008.

Actualmente, se reconoce que *Bd* al afectar la piel de los anfibios, altera los procesos de osmorregulación impidiendo el transporte de iones, lo que desencadena un desbalance osmótico en el interior de las células. Esta condición es conocida como hipocalemia (baja concentración de potasio en plasma) o hiponatremia (baja concentración de sodio en plasma) y generalmente se traduce en insuficiencia cardíaca. Partiendo de dicha base, se entiende que la pérdida de concentración de iones al interior del organismo se atribuye al escape de estos (cargas) a través de la epidermis y no a procesos de dilución mediados por la absorción excesiva de agua (Voyles et al., 2009). El segundo factor consiste en su efecto inhibitorio de la respuesta inmune del huésped. Se ha reportado la influencia de las estructuras del hongo, vivas o muertas, como limitantes para la proliferación de células del sistema inmune. Los resultados obtenidos a partir de la experimentación *in vitro*, demuestran que el contacto entre los cultivos de linfocitos T y linfocitos B con células de *Bd* acarrea en determinados casos una disminución drástica en la proliferación de células, mientras que, en otros, causa un proceso inhibitorio total de las mismas (Fites et al., 2013).

Técnicas de detección de *Bd* y antecedentes en el país

Hoy en día, el desarrollo de métodos moleculares de detección como el EndPoint PCR (o PCR convencional) y el PCR en tiempo real, ha permitido a la comunidad científica identificar la infección por *Bd* a bajos costos, con alta especificidad hacia el patógeno e incluso en individuos con cargas fúngicas mínimas (Annis et al., 2004; Boyle et al., 2004; Kriger et al., 2006). Además, durante las últimas dos décadas, se han explorado mecanismos de muestreo cada vez menos invasivos que facilitan la obtención de muestras viables, permiten la detección temprana de la infección y llevar a cabo monitoreos constantes sobre un mismo individuo (Hyatt et al., 2007).

Diversos autores estipulan que tanto el desarrollo de este patógeno como su nivel de virulencia se encuentran en un estado óptimo en temperaturas inferiores a los 25 °C (Peter Daszak et al., 2003; Piotrowski et al., 2004; Stuart et al., 2004 ; *OIE 2017*), valor asociado a su distribución predominante en regiones templadas, con una marcada dependencia hacia el ascenso en un gradiente altitudinal. En Colombia, las primeras valoraciones de presencia de *Bd* fueron realizadas mediante técnicas histológicas en organismos provenientes de colecciones biológicas, colectados desde la década de 1960 (Ruiz & Rueda-Almonacid, 2008) y con resultados positivos para el patógeno desde 1994 (Velasquez et al., 2007). Recientemente, se ha determinado que la presencia del hongo *Bd* se explica por la interacción entre la temperatura anual media (AMT), la precipitación durante el mes más seco (PDM), el rango medio de temperatura diurna (MDTR) y la variación de temperatura por temporadas (TS). No obstante, la presencia en el territorio nacional abarca 12 familias taxonómicas (Flechas et al., 2017) desde zonas costeras hasta una altura máxima muestreada de 3200 msnm, mostrando un patrón de escasa probabilidad de ocurrencia en sectores por debajo de los 300 msnm. Estos hallazgos representan un progreso en el conocimiento asociado al grado de dispersión del patógeno, ampliándolo hasta tierras bajas

con temperaturas medias superiores a las predefinidas para su desarrollo optimo (Flechas et al., 2017).

Antecedentes, especies de desarrollo directo (coquí) e inclusión de *Eleutherodactylus johnstonei* en el planteamiento

Se ha reportado que especies como la rana africana de uñas (*Xenopus laevis*) y la rana toro americana (*Lithobates catesbeianus*) tienen una alta tolerancia a la infección por *Bd* (Huss et al., 2013; Rollins-Smith et al., 2009) y son considerados como portadoras asintomáticas (Daszak et al., 2004; Reeder et al., 2012). Lo anterior convierte a estas especies “resistentes” en un potencial reservorio del patógeno y, por ende, en un factor de peligro para otras especies que son más susceptibles a la infección. Si se considera además que tanto la rana toro como la rana africana de uñas están catalogadas como especies invasoras (Lobos & Measey, 2002) se tienen organismos tolerantes a la infección, con alto grado de dispersión y altas tasas reproductivas.

No obstante, el proceso infeccioso mediado por *Bd* no es exclusivo de organismos con estadios de vida acuáticos, existen reportes de la presencia del patógeno en especies de desarrollo directo, pertenecientes a las familias Eleutherodactylidae y Craugastoridae (Burrowes et al., 2017; Flechas et al., 2017; Rollins-Smith et al., 2015). Gran parte del enfoque hacia el estudio de *Bd* en estas especies se ha centrado en *Eleutherodactylus coqui* (Eleutherodactylidae), generalista con tolerancia al patógeno (Longo et al., 2009; Rollins-Smith et al., 2015) nativa de Puerto Rico y reconocida como especie invasora en Hawaii (Pitt et al., 2012). La relevancia de estas especies catalogadas como invasoras reside en su capacidad para asegurar el éxito reproductivo y la permanencia en una población ajena a su área de distribución natural, afectando las dinámicas originales del sistema invadido.

Teniendo en cuenta lo anterior, surge la necesidad de centrar esfuerzos en el estudio de otras especies invasoras, para determinar su potencial como vectores del hongo patógeno, *Bd*. En Colombia, para esta categoría, además de la rana toro se ha registrado el coquí antillano, *Eleutherodactylus johnstonei*, (Eleutherodactylidae). A la fecha, se desconoce si la respuesta de *E. johnstonei* a la infección por *Bd* es similar a la de *E. coqui*. Sin embargo, los numerosos registros de *Bd* en ranas de desarrollo directo en Colombia (Flechas et al., 2017) plantean la interrogante de cuál es su rol como vector del patógeno y su potencial capacidad de afectación hacia otros anfibios, resultante del traspaso del patógeno a poblaciones sanas.

Eleutherodactylus johnstonei es nativa de las Antillas Menores y se ha dispersado mediante la acción humana a través del neotrópico, con los primeros registros correspondientes a principios del siglo XX (Kaiser, 1997; Melo et al., 2014) Actualmente, la especie se ha establecido de manera exitosa en gran parte del Caribe (Kaiser, 1997; Kaiser & Hardy, 1994; Melo et al., 2014). En Colombia, ha sido registrada en los municipios de Cali, Cartagena, Barranquilla, Bucaramanga y Fusagasugá (Gómez-Martínez et al., 2016;

Hernández Córdoba, 2014; Kaiser et al., 2002). Urbina y Castro reportaron una ocupación de *E. johnstonei* sobre el 10.5% del territorio nacional (Urbina-Cardona & Castro, 2010).

La dispersión de la especie suele darse por influencia humana, mediante el comercio de plantas ornamentales a través de viveros (Ernst et al., 2011; Rödder, 2009) y su éxito se atribuye a la capacidad de reproducirse constantemente a lo largo del año, poseer desarrollo directo y cuidado parental de las puestas (Ortega et al., 2005). A pesar de encontrarse ampliamente distribuida por el Caribe, los reportes oficiales para la especie se restringen a ambientes intervenidos como jardines o viveros, donde el desempeño de otras especies es menor, lo que sugiere una baja capacidad de dispersión (Ernst et al., 2011; Ortega et al., 2005; Rodríguez Gómez et al., 2017). No obstante, la ampliación de la frontera urbana en Colombia, podría facilitar la introducción de *E. johnstonei* en nuevas áreas intervenidas, por lo que se mantiene la necesidad de profundizar en estudios sobre la respuesta de la especie a una infección por *Bd*. Con esto en mente, se pretende que este estudio actúe como una valoración de la presencia del hongo sobre poblaciones de *E. johnstonei* establecidas en el Valle del Cauca y aporte al conocimiento sobre su potencial rol como vector de *Bd* en territorio colombiano.

Materiales y métodos

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en seis localidades de la zona periurbana del municipio de Jamundí, Valle del Cauca, Colombia donde se tenían registros previos de la presencia de *Eleutherodactylus johnstonei*. Las localidades son: 1. Colinas de Miravalle, Etapa 1; 2. Condominio Campestre Las Mercedes; 3. Solares de La Morada 7-8; 4. Colinas de Miravalle Etapa 3; 5. Palmares del Castillo; 6. Vivero Plantar, y se encuentran ubicadas entre los 900-1200 msnm (Figura 2). Las localidades Palmares del Castillo y Vivero el Plantar fueron seleccionadas como complemento de los muestreos realizados por la Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca (CVC) en el marco del proyecto sobre manejo de especies invasoras que adelanta de manera conjunta con la Universidad Javeriana Cali.

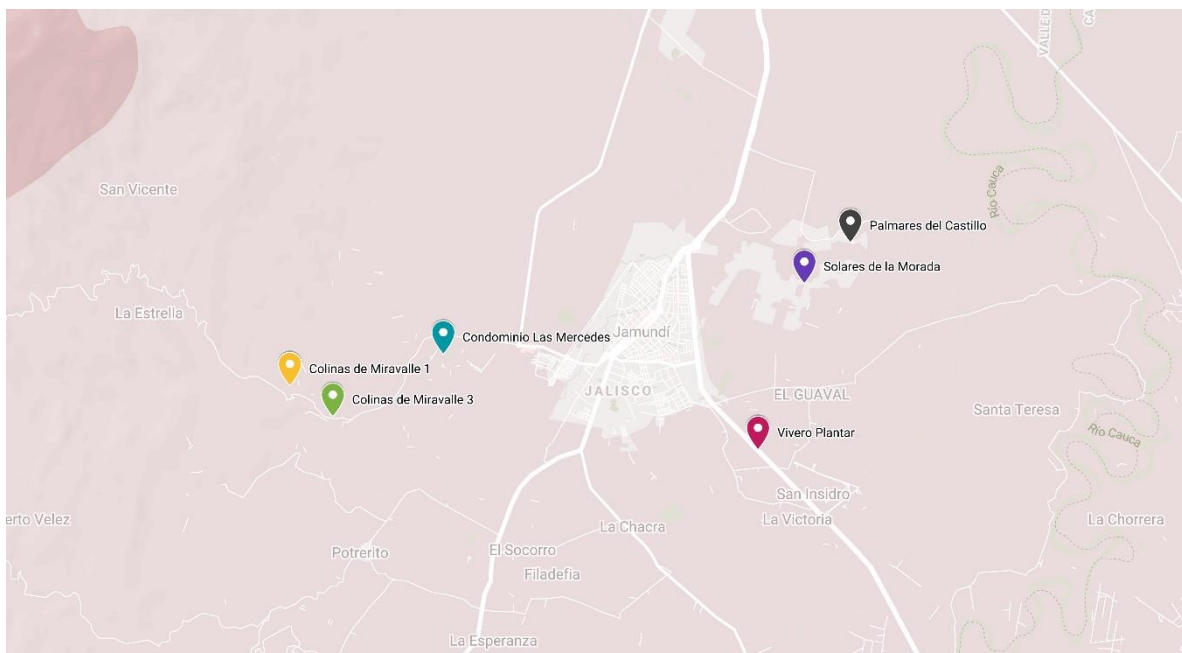


Figura 2 Mapa de los sitios de muestreo en la zona rural del municipio de Jamundí – Valle del Cauca. Coordenadas disponibles en anexos.

En las seis localidades se ubicaron dataloggers para medir humedad relativa y temperatura cada 25 minutos durante 18 días previos al muestreo, para un total de 1000 datos por sitio. El muestreo fue llevado a cabo entre el 20 y el 30 de agosto de 2019, durante la temporada seca en el Valle del Cauca. Inicialmente se planteó comparar la prevalencia del hongo en las poblaciones durante dos momentos del año con diferente precipitación, pero dada la emergencia sanitaria, la colecta programada para 2020 no pudo ser realizada.

Los muestreos se realizaron entre las 6 pm y 12 am. Los individuos fueron colectados con guantes de nitrilo y mantenidos de forma individual para evitar contaminación cruzada (adaptado de Burrowes et al., 2017; Longo et al., 2009). Con el fin de validar la presencia del patógeno en los sitios, se muestrearon todos los individuos encontrados de las cuatro

especies observadas durante el muestreo, *E. johnstonei*, *Boana xerophylla*, *Dendropsophus columbianus* y *Scinax ruber*. A todos los individuos se les tomó frotis siguiendo la metodología de Catenazzi et al (2017), basada en Kriger et al. (2006) y Hyatt et al. (2007); 30 pases por individuo, 10 en la zona abdominal, 10 en la sección interna de las patas posteriores y 10 en las falanges de las patas posteriores (Figura 3). Cada hisopo fue guardado en seco en crioviales plásticos estériles inmediatamente. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta que fueron procesadas.



Figura 3. Frotis de *Eleutherodactylus johnstonei*

Extracción de DNA, amplificación y secuenciación.

La extracción del DNA se llevó a cabo usando el kit Gene Releaser (Bioventures Inc.) en las instalaciones de la Universidad Javeriana Cali. Se realizó una PCR convencional de la región rRNA-ITS a cada muestra, usando los primers Bd1a (5' - CAGTGTGCCATATGTCACG-3') y Bd2a (5' -CATGGTTCATATCTGTCCAG-3') específicos para *Bd* (Annis et al., 2004). Se determinó la presencia o ausencia del patógeno a partir de los resultados de la amplificación, teniendo como control positivo una extracción proveniente de un cultivo previamente identificado como *Bd*, y como control negativo una extracción sin DNA molde para cada PCR. Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa de 1%, en buffer de 1X TBE. Se usaron los marcadores de peso Generuler 100bp plus y Hyperladder II para la verificación del tamaño de la secuencia amplificada. El producto positivo de PCR fue purificado y enviado a la empresa Macrogen (Korea), para la secuenciación de la región ITS rRNA con los primers Bd1a y Bd2a utilizados durante el estudio.

Resultados

Se tomaron frotis de piel de 124 individuos, 104 correspondientes a *E. johnstonei*, dos a *Boana xerophylla*, 12 a *Dendropsophus columbianus* y seis a *Scinax ruber* (Tabla 1).

Tabla 1. Conteo de Individuos por localidad.

Localidad	Especies encontradas	Número de individuos
Miravalle etapa 1 (MV1)	<i>Boana xerophylla</i>	1
	<i>Eleutherodactylus johnstonei</i>	3
Condominio Las Mercedes (CA)	<i>Dendropsophus columbianus</i>	7
	<i>Scinax ruber</i>	1
	<i>Eleutherodactylus johnstonei</i>	22
Solares de la Morada (M)	<i>Boana xerophylla</i>	1
	<i>Dendropsophus columbianus</i>	5
	<i>Scinax ruber</i>	5
	<i>Eleutherodactylus johnstonei</i>	10
Miravalle etapa 3 (CH)	<i>Eleutherodactylus johnstonei</i>	25
Vivero El Plantar (EP)	<i>Eleutherodactylus johnstonei</i>	15
Palmares del Castillo (EC)	<i>Eleutherodactylus johnstonei</i>	29

Los análisis moleculares para determinar la presencia de *Bd* en los 124 individuos muestreados empezaron en febrero de 2020. Desafortunadamente, debido a la emergencia sanitaria solo se pudo concluir hasta diciembre de 2020. Todas las muestras, excepto la AR043 (Figura 4) perteneciente a la especie *Scinax ruber* dieron negativo para *Bd*. Este individuo de *S. ruber* fue muestreado en el condominio Solares de la Morada, donde se tomaron frotis de 21 individuos divididos entre las especies *Scinax ruber*, *Boana xerophylla*, *Dendropsophus columbianus* y *Eleutherodactylus johnstonei*. Para el individuo AR031 de la especie *S. ruber* en la misma localidad, se observó una banda difusa de aproximadamente 300 bp en la electroforesis posterior al PCR y la purificación (Figura 5). No obstante, la secuenciación del producto de PCR no permitió confirmar si la banda pertenecía a *Bd*.

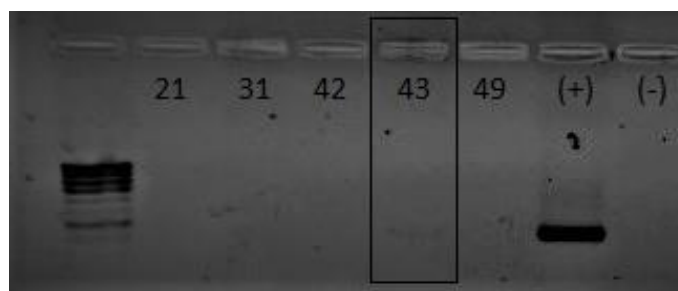


Figura 4. Purificación de las muestras tentativas para secuenciación. Banda leve únicamente observada en la muestra AR043, positiva para *Bd*.



Figura 5. Electroforesis con banda difusa de la muestra AR031. Control positivo de aproximadamente 300bp visible a la derecha seguido de control negativo.

Tabla 2. Secuencia de consenso generada con el software Geneious versión 6.0.

Nombre de la muestra	Secuencia obtenida
AR043	CAAAATTTATTTATTTTTTTGTCAAATTAATTGGAAATTGAATAATT TAATTGAAAAAATTGAAAATAAATATTTAAAAACAACCTTTTGACA ACGGATCTCTGGCTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGC GATACGTAATGTGAATTGCAAACCTTTGTGAATCATTAAATCTTTG AACGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGAGAATTATA AAAATACATTGTCCGAATTGACTGGACAGATATGAAGCATG

Discusión

La quitridiomycosis, causada por los patógenos *Batrachochytrium dendrobatidis* (Berger et al., 1998; Daszak et al., 1999) y *B. salamandrivorans* (Martel et al., 2013) es actualmente uno de los principales factores asociados a los declives poblacionales y la pérdida de biodiversidad en anfibios a nivel mundial (A. J. Adams et al., 2020; Crawford et al., 2010; Fisher & Garner, 2020; Mendoza et al., 2017; Pereira et al., 2013; Scheele et al., 2019; Skerratt et al., 2007). Se estima que globalmente ha afectado al menos a 501 especies durante los últimos 50 años, de las cuales 90 se encuentran presuntamente extintas y 428 se distribuyen en Centroamérica/Sudamérica (Scheele et al., 2019), lo que representa el mayor registro de pérdida de biodiversidad causado por enfermedad de la historia (Fisher & Garner, 2020; Skerratt et al., 2007). Se ha determinado que a mayor altitud y en especies ribereñas o con modos reproductivos ligados a fuentes hídricas, la prevalencia del patógeno es mayor, así como las pérdidas poblacionales ligadas a la infección (Brem & Lips, 2008). No obstante, el actual grado de incidencia observado en el neotrópico en conjunto con la variación en el nivel de susceptibilidad de las especies afectadas (Fisher & Garner, 2020; Flechas et al., 2017; Rollins-Smith et al., 2015) plantea la necesidad de ampliar aún más el conocimiento asociado a la presencia del patógeno en ambientes submuestreados y en especies con datos deficientes.

Colombia se consolida como el segundo país con mayor diversidad de anfibios en el mundo (Stuart et al., 2008), con 789 especies de anuros reportadas (Batrachia, 2021) divididas en 14 familias. Los estudios más recientes sobre el territorio nacional indican presencia de *Bd* en 12 familias taxonómicas, siendo Craugastoridae la más muestreada, con amplia representatividad de especies en regiones templadas y húmedas, donde se observan niveles de prevalencia elevados para *Bd* (Flechas et al., 2017). Este panorama debe situar a Colombia como uno de los focos obligatorios para el estudio del patógeno, con el fin de facilitar estrategias de manejo nacionales en aras de la conservación de anfibios.

Este estudio desarrolló la primera valoración en Colombia y en Suramérica de la incidencia de *Bd* sobre la especie invasora *Eleutherodactylus johnstonei*. Resultados anteriores se han obtenido en la isla de Montserrat al sureste de Puerto Rico, con 46 individuos muestreados en el 2005, siendo todos negativos para *Bd* (García et al., 2007). Sin embargo, en el 2015 para la misma localidad se reportó la presencia de *Bd* en *E. johnstonei*, sin especificar el

número de individuos muestreados ni la cantidad de positivos para el patógeno (Adams et al., 2014). Al ser una especie invasora en países como Brasil y Colombia que ostentan la mayor diversidad de anfibios en el mundo, la posibilidad de que actúe como vector de *Bd* debe ser evaluada con prioridad. A la fecha se tienen registros de tolerancia al patógeno en otras especies invasoras como *Lithobates catesbeianus* y *Xenopus laevis*. Esto, sumado a los registros de tolerancia a la infección en *Eleutherodactylus coqui* en Puerto Rico reafirma la necesidad de evaluar a *E. johnstonei* y a otras especies invasoras como posibles vectores de *Bd*.

Las 124 muestras analizadas en este estudio fueron colectadas durante la segunda temporada seca de 2019 en el lapso de una semana. Los resultados de Longo et al. (2009) en Puerto Rico sugieren una mayor prevalencia de la enfermedad en *Eleutherodactylus coqui* durante la temporada seca, debido probablemente a la aglomeración de individuos en los lugares con mayor humedad remanente. Es por esto que en nuestro muestreo se esperaba un mayor número de positivos para *Bd* durante esta época en caso de que el patógeno estuviera presente en las localidades. Dado que la especie se encuentra generalmente en jardines y ambientes altamente intervenidos, era posible que incluso durante la temporada seca, la humedad relativa (HR) en los sitios se viera influenciada por riegos. Teniendo en cuenta este factor, se monitorearon constantemente las variables temperatura y humedad con dataloggers a lo largo de las dos semanas previas a cada muestreo. Sin embargo, al tener solo un resultado positivo para *Bd* en los seis sitios de muestreo, no ha sido posible comparar datos de prevalencia entre localidades en función de estas variables climáticas. Los datos de humedad relativa y temperatura para cada sitio están disponibles como material suplementario.

Los resultados negativos para la totalidad de individuos de *E. johnstonei* muestreados representan una valoración inicial importante sobre el potencial de la especie como vector del patógeno en esta área del Valle del Cauca. Los datos obtenidos de los individuos provenientes del condominio Solares de la Morada resultan aún más pertinentes, puesto que en esta localidad se encontraron las cuatro especies muestreadas en los seis sitios y se ubicó al individuo de *Scinax ruber* positivo para *Bd*, lo que indica presencia del patógeno en la localidad, pero no en la especie *E. johnstonei*. Sin embargo, dado que para esta localidad solo se obtuvieron muestras de 21 individuos y que para el Valle del Cauca se tienen registros previos de *Bd* (Velásquez et al., 2008, Viáfara et al., 2020) resulta pertinente para futuros estudios ampliar el tamaño de muestra y abarcar la totalidad de especies presentes en este ambiente altamente intervenido. Lo anterior con el fin de discriminar la prevalencia del patógeno entre especies, modos reproductivos, entre otros.

A pesar de que la metodología de PCR convencional permite verificar la presencia o ausencia del patógeno de forma económica, puede no ser el método más adecuado para detectar bajas cargas fúngicas o infección en sus primeras etapas. Por lo anterior y sabiendo que *Bd* se encuentra presente en al menos una de las seis localidades muestreadas, se hace

relevante que futuros estudios consideren la metodología de PCR en tiempo real, capaz de detectar y además cuantificar la carga de zoosporas sobre el hospedero. Además, para determinar el comportamiento de la infección por *Bd* sobre la especie *E. johnstonei*, se sugiere llevar a cabo experimentos de exposición al patógeno en laboratorio, para evaluar la tolerancia de la especie y esclarecer por completo su rol como vector del hongo siguiendo la metodología de Catenazzi et al., (2017). Estudios como este deberían ser llevados a cabo para cada una de las especies de anfibios catalogadas como invasoras y considerados para los planes de manejo regionales y nacionales.

En adición, se debe interpretar la presencia de *Bd* en el ambiente semiurbano “Solares de la Morada”, como una alerta temprana sobre el potencial rol de dispersor de *Bd* que pueden llegar a tener los desplazamientos de personas incluso desde sus casas a ambientes naturales cercanos a la ciudad de Cali, entre ellos algunas áreas del PNN Farallones. Esto se debe considerar al momento de recibir visitantes en áreas protegidas, con la finalidad de fortalecer protocolos obligatorios de desinfestación que garanticen el bienestar de las especies nativas y limiten las rutas de ingreso de *Bd* a nuevas localidades. Considerar la presencia de *Bd* mediante análisis moleculares preventivos debe ser una prioridad en cualquier estudio asociado a la conservación de anfibios, tanto *ex situ*, como *in situ*. De este modo, se facilita la implementación de estrategias de manejo adaptable y se disminuyen los impactos del quitridio sobre los esfuerzos de conservación y reintroducción (Adams et al., 2020)

Conclusión

La presencia de *Bd* en al menos una de las localidades muestreadas, plantea la necesidad de reforzar estudios de prevalencia del patógeno no solo en la especie *Eleutherodactylus johnstonei* sino en todo el ensamblaje de anfibios de estos sitios con menor o mayor intervención humana. Los resultados ambiguos que no fueron incluidos para secuenciación y se descartaron como positivos deben ser considerados como posibles falsos negativos, lo que motiva a la utilización de técnicas moleculares con mejor capacidad de detección en futuros estudios.

No haber obtenido resultados positivos para *Bd* sobre *E. johnstonei* no descarta la presencia del hongo en esta especie, por lo que es necesario ampliar el tamaño de muestra y abarcar más localidades en el territorio nacional.

Referencias bibliográficas

- Adams, A. J., Pessier, A., Cranston, P., & Grasso, R. L. (2020). Chytridiomycosis-induced mortality in a threatened anuran. *PLoS ONE*, *15*(11 November), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241119>
- Adams, S. L., Morton, M. N., Terry, A., Young, R. P., Dawson, J., Martin, L., Sulton, M., Cunningham, A. A., Garcia, G., Goetz, M., Lopez, J., Tapley, B., Burton, M., & Gray, G. (2014). Saving the mountain chicken: Long-term Recovery Strategy for the Critically Endangered mountain chicken 2014-2034. *Mountain Chicken Recovery Programme, August*, 1–58. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3836.8487>
- Annis, S. L., Dastoor, F. P., Ziel, H., Daszak, P., & Longcore, J. E. (2004). A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases*, *40*(3), 420–428. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.3.420>
- Berger, L., Hyatt, A. D., Speare, R., & Longcore, J. E. (2005). Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, *68*(1), 51–63. <https://doi.org/10.3354/dao068051>
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A. A., Goggin, C. L., Slocombe, R., Ragan, M. A., Hyatt, A. D., McDonald, K. R., Hines, H. B., Lips, K. R., Marantelli, G., & Parkes, H. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(15), 9031–9036. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.9031>
- Boyle, D. G., Boyle, D. B., Olsen, V., Morgan, J. A. T., & Hyatt, A. D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, *60*(2), 141–148. <https://doi.org/10.3354/dao060141>
- Brem, F. M. R., & Lips, K. R. (2008). *Batrachochytrium dendrobatidis* infection patterns among

- Panamanian amphibian species, habitats and elevations during epizootic and enzootic stages. *Diseases of Aquatic Organisms*, 81(3), 189–202. <https://doi.org/10.3354/dao01960>
- Burrowes, P. A., Martes, M. C., Torres-Ríos, M., & Longo, A. V. (2017). Arboreality predicts *Batrachochytrium dendrobatidis* infection level in tropical direct-developing frogs. *Journal of Natural History*, 51(11–12), 643–656. <https://doi.org/10.1080/00222933.2017.1297504>
- Carey, C. (1993). Hypothesis Concerning the Causes of the Disappearance of Boreal Toads from the Mountains of Colorado. *Conservation Biology*, 7(2), 355–362. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1993.07020355.x>
- Catenazzi, A., Swei, A., Finkle, J., Foreyt, E., Wyman, L., & Vredenburg, V. T. (2017). Epizootic to enzootic transition of a fungal disease in tropical Andean frogs: Are surviving species still susceptible? *PLoS ONE*, 12(10), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186478>
- Cortés-Gomez, A. M., Ruiz-Agudelo, C. A., Valencia-Aguilar, A., & Ladle, R. J. (2015). Ecological functions of neotropical amphibians and reptiles: A review. *Universitas Scientiarum*, 20(2), 229–245. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC20-2.efna>
- Crawford, A. J., Lips, K. R., & Bermingham, E. (2010). Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(31), 13777–13782. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914115107>
- Crump, M. L., Hensley, F. R., & Clark, K. L. (1992). Apparent Decline of the Golden Toad: Underground or Extinct? *Copeia*, 1992(2), 413. <https://doi.org/10.2307/1446201>
- Daszak, P., Strieby, A., Cunningham, A. A., Longcore, J. E., Brown, C. C., & Porter, D. (2004). Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetological Journal*, 14(4), 201–207.
- Daszak, Peter, Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2003). Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*, 9(2), 141–150. <https://doi.org/10.1046/j.1472-4642.2003.00016.x>
- Ernst, R., Masméjan, D., & Kowarik, I. (2011). Non-invasive invaders from the Caribbean: The status of Johnstone's Whistling frog (*Eleutherodactylus johnstonei*) ten years after its introduction to Western French Guiana. *Biological Invasions*, 13(8), 1767–1777. <https://doi.org/10.1007/s10530-010-9930-5>
- Fisher, M. C., & Garner, T. W. J. (2020). Chytrid fungi and global amphibian declines. *Nature Reviews Microbiology*, 18(6), 332–343. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0335-x>
- Fites, J. S., Ramsey, J. P., Holden, W. M., Collier, S. P., Sutherland, et al. (2013). The Invasive Chytrid Fungus of Amphibians Paralyzes Lymphocyte Responses. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 342(6156), 366–369. <https://doi.org/10.5061/dryad.878m3>
- Flechas, S. V., Paz, A., Crawford, A. J., Sarmiento, C., Acevedo, A. A., Arboleda, A., Bolívar-García, W., Echeverry-Sandoval, C. L., Franco, R., Mojica, C., Muñoz, A., Palacios-Rodríguez, P., Posso-Terranova, A. M., Quintero-Marín, P., Rueda-Solano, L. A., Castro-Herrera, F., & Amézquita, A. (2017). Current and predicted distribution of the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Colombia, a hotspot of amphibian biodiversity. *Biotropica*, 49(5), 685–694.

<https://doi.org/10.1111/btp.12457>

- García, G., Cunningham, A. A., Horton, D. L., Garner, T. W. J., Hyatt, A., Hengstberger, S., Lopez, J., Ogradowczyk, A., Fenton, C., & Fa, J. E. (2007). Mountain chickens *Leptodactylus fallax* and sympatric amphibians appear to be disease free on Montserrat. *Oryx*, *41*(3), 398–401. <https://doi.org/10.1017/S0030605307001012>
- Gómez-Martínez, M. J., Llano-Mejía, J., & Cortés-Gómez, Á. M. (2016). Presencia de *Eleutherodactylus johnstonei* (Anura: Eleutherodactylidae) en Ibagué, Tolima, Colombia: El papel de los viveros comerciales. *Boletín Científico Del Centro de Museos*, *20*(2), 164–170. <https://doi.org/10.17151/bccm.2016.20.2.12>
- Hernández Córdoba, O. D. (2014). Hábitos alimenticios de una población de *Eleutherodactylus johnstonei* en una zona a las orillas del río Meléndez, al sur de Cali, Valle del Cauca. *Revista de Ciencias*, *2*, 153–160. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-19352014000200011&script=sci_abstract&tlng=es
- Huss, M., Huntley, L., Vredenburg, V., Johns, J., & Green, S. (2013). Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in 120 archived specimens of *Lithobates catesbeianus* (American bullfrog) collected in California, 1924–2007. *EcoHealth*, *10*(4), 339–343. <https://doi.org/10.1007/s10393-013-0895-6>
- Hyatt, A. D., Boyle, D. G., Olsen, V., Boyle, D. B., Berger, L., Obendorf, D., Dalton, A., Kriger, K., Hero, M., Hines, H., Phillott, R., Campbell, R., Marantelli, G., Gleason, F., & Colling, A. (2007). Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, *73*(3), 175–192. <https://doi.org/10.3354/dao073175>
- Kaiser, H. (1997). Origins and introductions of the Caribbean frog, *Eleutherodactylus johnstonei* (Leptodactylidae): management and conservation concerns. *Biodiversity & Conservation*, *14*(7), 1391–1407. <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1018341814510>
- Kaiser, H., Barrio-Amorós, C. L., Trujillo, J. D., & Lynch, J. D. (2002). Expansion of *Eleutherodactylus johnstonei* in northern South America: Rapid dispersal through human interactions. *Herpetological Review*, *33*(4), 290–294.
- Kaiser, H., & Hardy, J. D. J. (1994). *Eleutherodactylus johnstonei*. *Catalogue of American Amphibians and Reptiles*, *581*, 1–5.
- Kriger, K. M., Hines, H. B., Hyatt, A. D., Boyle, D. G., & Hero, J. M. (2006). Techniques for detecting chytridiomycosis in wild frogs: Comparing histology with real-time Taqman PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, *71*(2), 141–148. <https://doi.org/10.3354/dao071141>
- Lobos, G., & Measey, G. J. (2002). Invasive populations of *Xenopus laevis* (Daudin) in Chile. *Herpetological Journal*, *12*(4), 163–168.
- Longo, A. V., Burrowes, P. A., & Joglar, R. L. (2009). Seasonality of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in direct-developing frogs suggests a mechanism for persistence. *Diseases of Aquatic Organisms*, *92*(2–3), 253–260. <https://doi.org/10.3354/dao02054>
- Martel, A., Spitzen-Van Der Sluijs, A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M. C., Woeltjes, A., Bosman, W., Chiers, K., Bossuyt, F., & Pasmans, F. (2013). *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(38), 15325–15329.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1307356110>
- Melo, M. A., Lyra, M. L., Brischi, A. M., Geraldi, V. C., & Haddad, C. F. B. (2014). First record of the invasive frog *eleutherodactylus johnstonei* (Anura: Eleutherodactylidae) in São Paulo, Brazil. *Salamandra*, 50(3), 177–180.
- Mendoza-Almeralla, C., Burrowes, P., & Parra-Olea, G. (2015). La quitridiomycosis en los anfibios de México: Una revisión. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(1), 238–248.
<https://doi.org/10.7550/rmb.42588>
- Mendoza, J., Alule, M., & McCormick, M. (2017). Infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Manual de Las Pruebas de Diagnóstico Para Los Animales Acuáticos*, 24.
- Ortega, J. E., Serrano, V. H., & Ramírez-Pinilla, M. P. (2005). Reproduction of an introduced population of *Eleutherodactylus johnstonei* at Bucaramanga, Colombia. *Copeia*, 2005(3), 642–648. <https://doi.org/10.1643/CH-04-223R1>
- Pereira, P. L. L., Torres, A. M. C., & Soares, D. F. M. (2013). Chytridiomycosis : a global threat to amphibians The aetiological agent Immunogenicity Characteristics of the to the infection and disease. *Rev Sci Tech*, 32(2911), 857–867.
- Peter Daszak, Lee Berger, Andrew A. Cunningham, Alex D. Hyatt, D. Earl Green, R. S. (1999). Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases*, 5(6), 735–748. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.30.1.133>
- Piotrowski, J. S., Annis, S. L., & Longcore, J. E. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a Chytrid Pathogen of Amphibians. *Mycologia*, 96(1), 9.
<https://doi.org/10.2307/3761981>
- Pitt, W. C., Beard, K. H., & Doratt, R. E. (2012). Management of invasive coqui frog populations in Hawaii. *Outlooks on Pest Management*, 23(4), 166–169. <https://doi.org/10.1564/23aug05>
- Pounds, J. A., Fogden, M. P. L., Savage, J. M., & Gorman, G. C. (1997). Tests of null models for amphibian declines on a tropical mountain. *Conservation Biology*, 11(6), 1307–1322.
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1997.95485.x>
- Reeder, N. M. M., Pessier, A. P., & Vredenburg, V. T. (2012). A reservoir species for the emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* thrives in a landscape decimated by disease. *PLoS ONE*, 7(3), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033567>
- Rödger, D. (2009). Human Footprint, facilitated jump dispersal, and the potential distribution of the invasive *eleutherodactylus johnstonei* Barbour 1914 (anura eleutherodactylidae). *Tropical Zoology*, 22(2), 205–217.
- Rodríguez Gómez, C. A., Díaz-Lameiro, A. M., Berg, C. S., Henderson, R. W., & Powell, R. (2017). Relative abundance and habitat use by the frogs *Pristimantis shrevei* (Strabomantidae) and *Eleutherodactylus johnstonei* (Eleutherodactylidae) on St. Vincent. *Caribbean Herpetology*, 1–12. <https://doi.org/10.31611/ch.58>
- Rollins-Smith, L. A., Reinert, L. K., & Burrowes, P. A. (2015). Coqui frogs persist with the deadly chytrid fungus despite a lack of defensive antimicrobial peptides. *Diseases of Aquatic Organisms*, 113(1), 81–83. <https://doi.org/10.3354/dao02823>

- Rollins-Smith LA, Ramsey JP, Reinert LK, Woodhams DC, Livo LJ, C. C. (2009). Immune defenses of *Xenopus laevis* against *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Frontiers in Bioscience*, 9.
- Rosenblum, E. B., Stajich, J. E., Maddox, N., & Eisen, M. B. (2008). Global gene expression profiles for life stages of the deadly amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(44), 17034–17039. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804173105>
- Ruiz, A., & Rueda-Almonacid, J. V. (2008). *Batrachochytrium dendrobatidis* and chytridiomycosis in anuran amphibians of Colombia. *EcoHealth*, 5(1), 27–33. <https://doi.org/10.1007/s10393-008-0159-z>
- Scheele, B. C., Pasmans, F., Skerratt, L. F., Berger, L., Martel, A. N., Beukema, W., & Al., E. (2019). Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science*, 363(6434)(March 2019), 1459–1463.
- Skerratt, L. F., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., McDonald, K. R., Phillott, A. D., Hines, H. B., & Kenyon, N. (2007). Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth*, 4(2), 125–134. <https://doi.org/10.1007/s10393-007-0093-5>
- Stuart, S.N., Hoffmann, M., Chanson, J.S., Cox, N.A., Berridge, R.J., Ramani, P., Young, B. E. (2008). Threatened Amphibians of the World. In *Phyllomedusa: Journal of Herpetology* (Vol. 7, Issue 2). <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9079.v7i2p149-150>
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S. L., Fischman, D. L., & Waller, R. W. (2004). Status and trends of amphibian. *Science*, 306(5702), 1783–1786.
- Urbina-Cardona, J. N., & Castro, F. (2010). Distribución Actual y Futura de Anfibios y Reptiles con Potencial Invasor en Colombia: Una Aproximación Usando Modelos de Nicho Ecológico. *Biodiversidad y Cambio Climático*, 65–72.
- Viáfara Vega, R. A., (2020) Detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* (CHYTRIDIOMYCOTA) en localidades del Valle del Cauca por técnica de pcr. *Revista Latinoamericana de Herpetología* 3 (1), 81-89,
- Velasquez, B., Castro-herrera, F., Bolívar-García, W., & Herrera-montes, M. I. (2008). Infección por el hongo quitrido *Batrachochytrium Dendrobatidis* en anuros de la Cordillera Occidental de Colombia. *Herpetotropicos*, 4(2).
- Voyles, J., Webb, R., Cook, D., Alford, R. A., Speare, R., Skerratt, L. F., Berger, L., Young, S., Campbell, C., Dinudom, A., & Voyles, W. F. (2009). Pathogenesis of Chytridiomycosis, a Cause of Catastrophic Amphibian Declines. *Science*, 326(5952), 582–585.

Anexos

Tabla 3. Información suplementaria sobre individuos muestreados. (MV1) = Miravalle etapa 1. (CA) = Condominio Las Mercedes. (M) = Solares de la Morada. (MV3) = Miravalle etapa 3. (EP) = Vivero Plantar. (EC) = Palmares del Castillo

Id. individuo	Localidad	Fecha de colecta	Especie	LRC (cm)	Peso (gr)	Sexo
AR001	MV1	20/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.8	1.4	F
AR002	MV1	20/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2	0.5	F
AR003	MV1	20/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.5	0.9	F

AR004	MV1	20/08/2019	B. xerophylla	5.4	5.6	M
AR005	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.3	0.9	M
AR006	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.3	0.7	M
AR007	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.8	1.2	F
AR008	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.9	1.2	F
AR009	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.8	1.1	F
AR010	CA	21/08/2019	D. columbianus	2.5	0.8	M
AR011	CA	21/08/2019	D. columbianus	2.5	0.9	M
AR012	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.5	0.7	M
AR013	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.1	0.8	M
AR014	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.3	1	F
AR015	CA	21/08/2019	D. columbianus	3.1	1.8	M
AR016	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.3	0.7	M
AR017	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.5	0.8	F
AR018	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.3	0.7	M
AR019	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.2	0.7	F
AR020	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2	0.5	F
AR021	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	1.9	0.3	F
AR022	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.5	0.9	M
AR023	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.8	1.1	F
AR024	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	1.8	0.4	F
AR025	CA	21/08/2019	S. ruber	2.4	0.7	M
AR026	CA	21/08/2019	D. columbianus	2.5	0.9	M
AR027	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	1.9	0.5	F
AR028	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	1.6	0.3	F
AR029	CA	21/08/2019	D. columbianus	3.4	1.8	F
AR030	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.1	0.6	M
AR031	CA	21/08/2019	D. columbianus	1.7	0.3	F
AR032	CA	21/08/2019	D. columbianus	3.5	2.2	F
AR033	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.1	0.7	M
AR034	CA	21/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.7	1.5	F
AR035	M	21/08/2019	S. ruber	1.6	0.3	F
AR036	M	21/08/2019	B. xerophylla	4.9	6.8	M
AR037	M	23/08/2019	D. columbianus	2	0.6	M
AR038	M	23/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	1.5	0.2	?
AR039	M	23/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.9	1.3	F
AR040	M	23/08/2019	S. ruber	1.8	0.3	F
AR041	M	23/08/2019	S. ruber	2.7	0.9	M

AR042	M	23/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	1.5	0.2	F
AR043	M	23/08/2019	<i>S. ruber</i>	1.8	0.3	M
AR044	M	23/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	1.4	0.2	F
AR045	M	23/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	1.7	0.2	M
AR046	M	23/08/2019	<i>D. columbianus</i>	1.4	0.1	?
AR047	M	23/08/2019	<i>D. columbianus</i>	2.4	0.8	M
AR048	M	23/08/2019	<i>D. columbianus</i>	3	1.5	M
AR049	M	23/08/2019	<i>D. columbianus</i>	3	1.8	M
AR050	M	23/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2	0.6	M
AR051	M	23/08/2019	<i>S. ruber</i>	2.1	0.5	?
AR052	M	23/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.3	0.7	M
AR053	M	23/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	3	1.4	M
AR054	M	23/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	1.6	0.3	M
AR055	M	23/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	1.5	0.2	F
AR056	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2	0.3	M
AR057	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.7	1.3	F
AR058	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.8	1.4	F
AR059	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	1.9	0.3	?
AR060	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	1.8	0.3	M
AR061	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.4	0.7	M
AR062	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	1.9	0.3	?
AR063	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.4	0.8	M
AR064	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.2	0.5	F
AR065	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	3.1	2	F
AR066	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.1	0.6	?
AR067	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.1	0.6	?
AR068	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.3	0.8	M
AR069	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	1.9	0.5	?
AR070	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	1.8	0.4	M
AR071	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.2	0.9	M
AR072	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.3	0.7	M
AR073	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2	0.5	M
AR074	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.2	0.6	M
AR075	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.4	1.1	M
AR076	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2	0.5	M
AR077	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.8	1.3	F
AR078	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.8	1.1	F
AR079	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.3	0.6	M
AR080	CH	28/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	1.4	0.2	?
AR081	EP	29/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.8	1.1	F
AR082	EP	29/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.8	1.4	M
AR083	EP	29/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.1	0.6	M

AR084	EP	29/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.2	0.5	?
AR085	EP	29/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.5	1.1	F
AR086	EP	29/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.4	0.9	F
AR087	EP	29/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.7	1.1	F
AR088	EP	29/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.9	1.5	F
AR089	EP	29/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.2	0.6	F
AR090	EP	29/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.3	0.8	M
AR091	EP	29/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.2	0.5	F
AR092	EP	29/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.5	0.9	M
AR093	EP	29/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.3	0.6	M
AR094	EP	29/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.5	1	M
AR095	EP	29/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.5	0.8	M
AR096	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	3	1.3	M
AR097	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	3.2	1.6	M
AR098	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.7	1.2	M
AR099	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.5	0.8	M
AR 100	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.5	0.8	M
AR 101	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.3	0.6	?
AR 102	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	3	1.5	M
AR 103	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.8	1.4	F
AR 104	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	3	1.6	F
AR 105	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.6	1.1	M
AR 106	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.5	0.8	M
AR 107	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2	0.5	M
AR 108	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.6	1	M
AR 109	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.5	0.9	M
AR 110	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.4	0.7	M
AR 111	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.8	1.5	M
AR 112	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.2	0.7	M
AR 113	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.8	1.1	M
AR 114	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.8	1.2	M
AR 115	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.6	1.1	M
AR 116	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.6	1	M
AR 117	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.2	0.8	M
AR 118	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2	0.5	?
AR 119	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.5	1	F
AR 120	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.4	0.6	M
AR 121	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	1.8	0.3	?
AR 122	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.3	0.5	F
AR 123	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.2	0.5	M
AR 124	EC	30/08/2019	<i>E. johnstonei</i>	2.1	0.5	M
AR 125	Chocó	6/11/2019	<i>Craugastor</i> sp.			
AR 126	Chocó	6/11/2019	<i>Lithobates vaillanti</i>			
AR 127	Chocó	6/11/2019	<i>Smilisca phaeota</i>			

AR 128	Chocó	6/11/2019	<i>Boana aff. rufitela</i>			
AR 129	Chocó	6/11/2019	<i>Craugastor sp.</i>			
AR 130	Chocó	6/11/2019	<i>Smilisca phaeota</i>			
AR 131	Chocó	6/11/2019	<i>Dendropsophus sp.</i>			