

Analysis of the presence of the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* Bd. in the Amphibian populations of 8 localities in the southern Ecuadorian Andes.

Análisis de hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* Bd., en las poblaciones de anfibios de 8 localidades de los andes sur del Ecuador.

Freire, Diana¹; Fernández, Carla¹; Nogales, Fernando²

¹ Tesis de Ingeniería Ambiental – U. T. P. L, dxfreire@utpl.edu.ec, cnfernandez@utpl.edu.ec

² Escuela de Ciencias Ambientales – U. T. P. L, anfibios@arcoiris.org.ec

February 2006

Download at: <http://www.lyonia.org/downloadPDF.php?pdfID=2.393.1>

Analysis of the presence of the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* Bd. in the Amphibian populations of 8 localities in the southern Ecuadorian Andes.

Resumen

En Ecuador existen 421 especies de anfibios, lo que lo convierte en el tercer país más diverso del mundo. En la última década esta diversidad se ha visto amenazada, en Ecuador algunos autores reportan la Chytridiomycosis, que es una enfermedad mortal que ataca la piel de los anuros, como una de las posibles causas. Sin embargo en la Región Sur, Loja y Zamora Chinchipe no existen estudios del *B. dendrobatidis* sobre la declinación de anfibios, es así que este estudio pretende identificar la presencia de agentes patógenos como el *B. dendrobatidis*. El análisis de la Chytridiomycosis se realizó en cortes de secciones de piel: parche pélvico y patas a través de rutinas histológicas de cortes transversales de tres micras, teñidas con hematoxilina y eosina; la identificación se realizó en microscopio óptico. Fueron analizados un total de 62 especímenes de 8 localidades diferentes, ubicadas en Loja y Zamora, los especímenes fueron clasificados en posibles positivos y negativos. Los 12 especímenes posibles positivos fueron llevados al Laboratorio de herpetología de la PUCE, resultando negativos. Es importante que los 12 especímenes que se sospecha portan la Chytridiomycosis, sean analizados por otros tipos de diagnóstico, como por ejemplo: por otros hongos, envenenamiento por químicos, parásitos, virus, para tratar de determinar otros agentes asociados a la declinación de los anfibios.

Palabras claves: Chytridiomycosis, piel, declinación, Andes

Abstract

There are 421 amphibian species in Ecuador, which makes the country the third most diverse country in the world. In the last decade, this diversity has been threatened, in Ecuador some authors report Chytridiomycosis, which is a lethal illness attacking amphibian skin, as a possible cause. However in the Southern Region, Loja and Zamora Chinchipe there aren't studies on *B. Dendrobatidis* about amphibian's declination, therefore this study is willing to identify the presence of pathogen agents as *B. Dendrobatidis*. Chytridiomycosis analysis was made by cutting skin sections: pelvic patch and paws by means of histological routines of 3 microns transversal cutting, stained with hematoxiline and eosine; optical microscope was used for identification. 62 specimens from 8 different localities placed in Loja and Zamora were analyzed. Specimens were classified in possible positive and negative ones. Twelve possible positive specimens were taken to PUCE'S Herpetology Laboratory and they resulted negative. It is remarkable that those 12 specimens suspected to host Chytridiomycosis should be analyzed with other diagnosis types, for example: other fungus, chemical poisoning, parasites, viruses, to try to determine other associated agents to amphibian declination.

Key words: Chytridiomycosis, skin, decline, Andes

Introducción

Ecuador tiene una densidad de 0.016 especies / Km², lo que lo hace tres veces más diverso que Colombia y 21 veces más que Brasil (Coloma & Quiguango 2000). La información de la última década sugiere que al menos 26 especies de anfibios del Ecuador han disminuido (Ron et al. 2000). Las razones para esta crisis de la biodiversidad no son claras. Las declinaciones han ocurrido donde no es evidente la destrucción del hábitat. (Pounds & Crump 1994).

En Ecuador el número de especies desaparecidos es alto, sin embargo por parte de la comunidad científica, la atención prestada es mínima y no existen publicaciones científicas específicas sobre el tema a pesar de que el número de especies es potencialmente elevado y es comparable al de países como Costa Rica o Panamá en donde han recibido bastante atención. (Pounds & Crump 1994).

Una de las especies con ejemplo más claro de declinación, es el jambato, *Atelopus ignescens* (Coloma et al. 2000, Ron et al. 2001), era uno de los sapos más comunes y ampliamente distribuidos en las zonas altas del Ecuador, abarcando las provincias, de Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Napo, Chimborazo y Bolívar. Para la Región Sur del Ecuador, Loja – Zamora Chinchipe, existe evidencia de declinación de anfibios en géneros como: *Telmatobius*, *Atelopus*,

Bufo; sin embargo no existen estudios para determinar las posibles causas de esta declinación; por esta razón se cree pertinente el estudio de esta enfermedad, para lo cual han sido seleccionadas las siguientes localidades: Bosque Aguirre, San Luis - Parque Nacional Podocarpus (PNP), Palanda, Utuana, Chorrillos, San Francisco, Zamora Huayco, Espíndola - Páramo de Amaluza.

Recientemente se ha identificado al Hongo Quitridio del género *Batrachochytrium* (Longcore et al. 1999) que infecta a los anfibios y puede haber sido el causante de su muerte en Australia, Sudamérica, América Central y los Estados Unidos (Berger et al. 1998, Pessier et al. 1999, Daszak et al. 1999, Lips 1999). La más común causa de muerte en los anfibios de Australia es el hongo quitridio (Berger et al. 1999) y también ha sido encontrado en menor proporción en anfibios saludables y en renacuajos (Berger et al. 1999).

Chytridiomycosis es considerada una enfermedad infecciosa emergente (Daszak et al. 2000). Los efectos de *B. dendrobatidis* en algunas poblaciones de anfibios ha sido devastadora, Esta declinación esta siendo investigada por herpetólogos, ecologistas y epidemiólogos.

Siendo así la presente investigación pretende contribuir, considerando la enfermedad mitótica Chytridiomycosis como posible agente causal (Berger et al. 1998, 1999a) Desde el año 1998 en el Museo de la PUCE se iniciaron investigaciones y se han detectado agentes patógenos, siendo así, una especie hace poco descrita de hongo quitridio, *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), se cree es la responsable de la extinción de poblaciones y especies de anfibios en el mundo. Este hongo se encuentra en todos los medios de vida, y particularmente en áreas bien conservadas ya que son muy sensibles a la contaminación. Sin embargo, la especie que afecta a los anfibios es de reciente descripción, siendo el primer caso de hongo quitridio que afecta a un vertebrado. (Garner et al. 2005).

Las poblaciones de anfibios afectadas por esta especie de hongo, generalmente desaparecen en pocos meses, siguiendo el patrón de dispersión típico de las enfermedades infecciosas. Los adultos mueren rápidamente mientras que las larvas, que infectan sólo en la zona bucal, mueren más tarde cuando la queratina (y con ella los hongos) se extiende por todo su cuerpo al completar la metamorfosis. Una vez que el hongo ha aparecido en una zona permanece en el medio como saprófito, incluso cuando los anfibios ya han desaparecido. (Garner et al. 2005)

La causa última de la muerte de los animales infectados aún no se conoce con seguridad, pero sí el desarrollo de la enfermedad (conocida como quitridiomycosis), que afecta a la superficie de la piel, y nunca a los órganos internos. Cuando las zoosporas de estos hongos entran en contacto con la piel de los anfibios se fijan, y a los pocos días se desarrollan esporangios que generan nuevas zoosporas. (Garner et al. 2005).

La Chytridiomycosis se diagnosticó en secciones de piel teñidas con técnicas estándar de hematoxilina y eosina (Berger et al. 1999b)

Materiales y Métodos

Basada en dos fases, detalladas de la siguiente forma:

Fase de Revisión de Información Secundaria:

Se inició con la revisión del material a ser diagnosticado, es decir con las colecciones de anfibios, obtenidas entre los años 2003 y 2005 por el Bgo. Fernando Nogales, estas colecciones fueron de 8 localidades diferentes, ubicadas en Loja y Zamora Chinchipe. Esta información fue almacenada en una base de datos que contenía la siguiente información básica obtenida en el campo: Localidad, fecha, hora (inicio - final), tiempo de muestreo, Noche, Transecto, Investigadores. E información que describió a los especímenes colectados así: Numero, Familia, Nombre Científico, Altura, Sustrato (hoja, arroyo), Actividad, Observaciones.

Se continuó con la Catalogación y Etiquetación de las colecciones realizadas, así los datos fueron escritos con tinta permanente sobre papel resistente al alcohol, se usó hilo de algodón para atar la etiqueta, la cual fue colocada en la extremidad posterior del espécimen, la información detallada en las etiquetas contenía lo siguiente:

- Número de campo (Designación única de la muestra)
- Iniciales del Colector
- Iniciales del patógeno a ser analizado *Batrachochytrium dendrobatidis* (BD)

Fase de Laboratorio:

Rutina Histológica E Identificación del hongo

Para realizar el análisis de *Batrachochytrium dendrobatidis* las colecciones fueron conservadas en frascos con formol al 70%. Se realizó cortes con bisturí de secciones de piel: parche pélvico y

patas, las secciones fueron colocadas en cajas plásticas pequeñas utilizadas para procesos histológicos.

Inclusión en Parafina: las muestras de tejidos fueron colocadas en las cajas, se llenaron de parafina, formando un bloque macizo, con el uso del Microtomo a través de rutinas histológicas de cortes transversales de tres micras, se obtuvieron las placas con las muestras de tejido.

Tinción con Hematoxilina y Eosina

Procedimiento de Hematoxilina y Eosina de MAYER (Hall et al. 1993)

Procedimiento de Giemsa (Brown et al. 1993)

Identificación: Se realizó en microscopio óptico.

Resultados

Análisis para Chytridiomycosis

Fueron analizados un total de 62 especímenes. Correspondientes a las siguientes familias: Leptodactilidae con los géneros Eleutherodactulus, Prinophus, Phyllionastes; Hylidae con los géneros: Philomedusa e Hyla; Bufonidae con el género: Bufo; Centronelidae con el género Cocranella; y Dendrobatidae con el género: Colosthetus (Fig 1.), encontrados en las 8 localidades diferentes: Bosque Aguirre, San Luis - Parque Nacional Podocarpus (PNP), Palanda, Utuana, Chorrillos, San Francisco, Zamora Huayco, Espíndola - Páramo de Amaluza. ubicadas en Loja y Zamora, (Fig. 2.)



Figura 1. Familias registradas en el Sur de Ecuador.

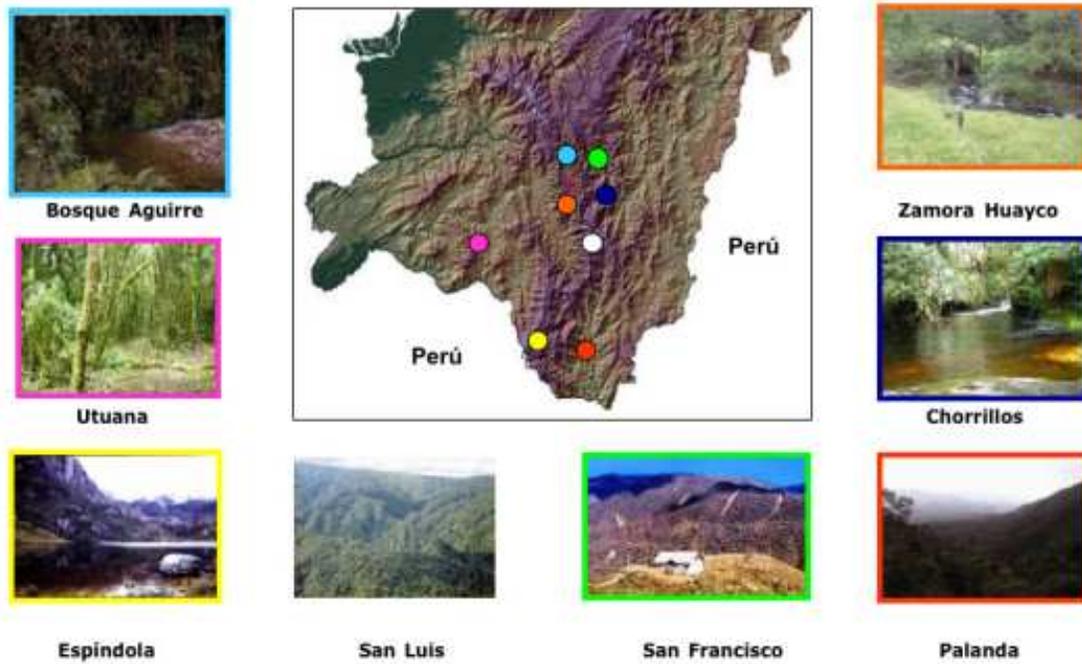


Figura 1. Mapa de ubicación del área de estudio

Figura 2. Mapa de la zona de estudio.

Los resultados fueron clasificados en posibles positivos y negativos. Resultando como negativos 50 especímenes (Anexo 1.) y como posibles positivos 12 especímenes los cuales fueron llevados al Laboratorio de herpetología de la PUCE, resultando negativos para Chytridiomycosis. (Tabla 1.)

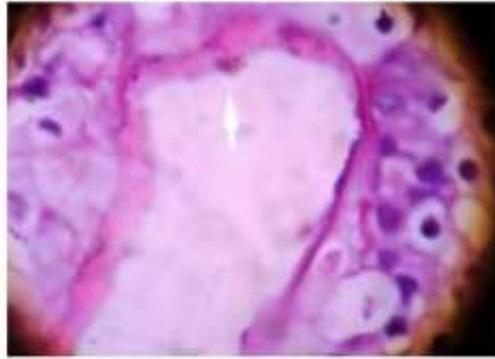
Discusión

Las declinaciones en las poblaciones de anfibios han involucrado también a varias especies de las zonas altas de los Andes del Ecuador (Coloma 1992, 1995, 1996; Vial & Sailor 1993, Stebbins & Cohen 1995, Lotters 1996, Coloma et al. 2000).

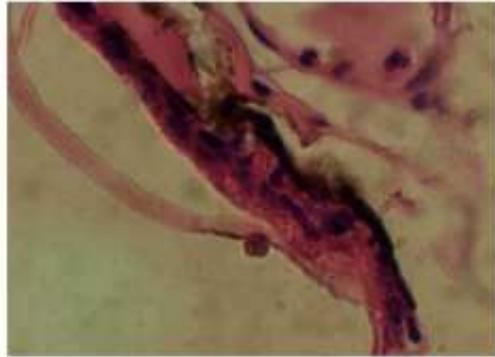
Cabe resaltar que según el estudio realizado sobre Chytridiomycosis para el Ecuador, la distribución de especímenes positivos en ese estudio, abarca desde el Páramo del Volcán Chiles en la Provincia de Carchi, al norte, hasta las lagunas del Parque Nacional Cajas, al Sur. (Ron & Merino-Viteri 2000) Es importante considerar que la colección mas antigua para Chytridiomycosis es de *Atelopus bomolochos* recolectado el 1 de diciembre de 1980, mientras que el mas reciente corresponde a *Gastrotheca pseustes* colectados como renacuajos el 8 de septiembre de 1999 y metamorfosearon en condiciones de laboratorio. (Merino- Viteri 2001).

Sin embargo es importante tomar en cuenta que según los resultados obtenidos, los 12 especímenes sospechosos para Chytridiomycosis (Tabla. 1), Presentan anomalías comparativas a una piel sana; como es el caso del Número BD 00021, *Eleutherodactylus*, No. BD 00066, *Bufo*, que presentan desprendimiento en la piel y formación de bulbos, así mismo en el resto de placas se presentan características anormales en la piel, las cuales fueron apreciadas en el microscopio (Fig. 3 A. B. C:) Por la tanto el diagnostico de estos especímenes, debe ser considerado para otros tipos de diagnósticos, como por ejemplo por otros hongos, bacterias, envenenamiento por químicos, etc., para tratar de determinar otros agentes asociados a la declinación de los anfibios.

A.



B.



C.



Figura 3. A. Fotografía de la piel de un anfibio Número BD 00021, *Eleutherodactylus*, presenta estructuras diferentes observadas a la de una piel normal, B. Fotografía de la piel de un anfibio No. BD 00066, *Bufo*, presenta desprendimiento de la piel y formación de un bulbo. C. Fotografía B usando lente de mayor aumento. Fotos: Diana Freire

A pesar de que los especímenes que resultaron positivos para Chytridiomycosis fueron los obtenidos en museos de historia natural, o colecciones obtenidas entre los años 80 y 90, se consideró de suma importancia realizar un estudio de contribución en la Región Sur, en donde existe evidencias de declinación de Anfibios en las poblaciones de *Atelopus*, *Bufo* y *Telmatobius*, sin embargo no existe mayor atención y escasa información al respecto.

Probablemente ésta enfermedad exista en otras localidades, en tanto no se podría afirmar su ausencia, más bien se deberían realizar más investigaciones tomando en cuenta las enfermedades patógenas y diversos causas.

Cabe resaltar que entre otras, las causas asociadas a la declinación de anfibios son las siguientes: cambio climático, radiación ultravioleta, especies introducidas, uso de agroquímicos, y la citada en la presente investigación en lo que se refiere a enfermedades patógenas, posiblemente estas podrían dar como resultado un proceso de SINERGISMO, en donde la interacción de todos estos patrones podrían estar provocando un aumento drástico en la declinación de anfibios.

Conclusiones

Existe evidencia que el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, esta presente en el Ecuador desde los años 80. Y que esta asociado en las declinaciones de Anfibios en Sudamérica y en todo el mundo.

Los 50 especímenes colectados para el análisis de *B. dendrobatidis*, en las 8 localidades estudiadas, fueron diagnosticados como negativos para la Chytridiomycosis.

Se encontraron estructuras anormales a las de la piel normal de un anfibio como: desprendimiento, formación de bulbos.

Posiblemente pueden existir la enfermedad en otras localidades, por lo que para confirmar se deben realizar mas investigaciones.

RECOMENDACIONES

Se recomienda la recolección de especímenes de museos para analizar el *B. dendrobatidis*, y su posible vinculo con las declinaciones en los géneros: *Atelopus*, *Telmatobius*, *Hyla*.

También se recomienda que según los resultados obtenidos, los especímenes sean analizados tomando en cuenta la posible infección por otros hongos, bacterias o diferentes agentes patógenos. Es importante revisar las tinciones específicas para investigaciones realizadas para hongos, esto facilitara el trabajo al momento de la identificación.

Se debería fomentar el interés por parte de la comunidad científica y la comunidad en general sobre la declinación de anfibios, que es un problema que va en aumento.

Además ya que se observo la venta libre de rana toro en la ciudad de Loja, se debería considerar para controlar a través de los organismos encargados la prohibición de estos.

Agradecimientos

Un Agradecimiento especial al Blgo. Fernando Nogales por los conocimientos impartidos, auspicio económico y facilitar los especímenes para el análisis del *B. dendrobatidis*.

A Don Church – Conservación Internacional

A P. Barrazueta por la valiosa colaboración en la etapa de Laboratorio

A Dr. R. Saa por la colaboración en la fase de diagnóstico

Blgo. Juan Pablo Suárez por la colaboración para el material fotográfico

A A. Merino-Viteri por compartir su experiencia en el estudio de *B. dendrobatidis*

Referencias

Berger, L., R. Speare, P. Daszak, D.E. Green, A.A. Cunningham, C.L. Goggin, R. Slocombe, M.A. Ragan, A.D. Hyatt, K.P., McDonald, H.B. Hines, K.R., Lips, G. Marantelli & H. Parkes 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 95: 9031-9036.

Berger, L., R. Speare & A. Hyatt 1999a. Chytrid fungus and amphibian declines: overview. Implications and future directions. In: A. Campbell (ed.) *Declines and Disappearances of Australian Frogs*. Environment Australia. Canberra Australia, Pp. 21-31.

Berger, L., R. Speare & A. Kent. 1999b. *Diagnosis of Chytridiomycosis in amphibians by histologic examination*. (Online). Amphibian Diseases Home Page, Australia. <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/histo/chhisto.htm>

Brown, A.B. & L. Febiger .1993. *Hematology: Principles and Procedures*, Sixth Edition, Philadelphia p101.

Coloma, L. 1992. Reporte no publicado. *Anfibios del Ecuador: Estatus poblacional y de Conservación*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador

Coloma, L. 1995. *Ecuadorian frogs of the genus Colostethus (Anura: Dendrobatidae)* Miscellaneous Publication of the Natural History Museum University of Kansas No. 87

Coloma, L. 1996. *Systematics, morphology and relationships of Atelopus (Anura: Bufonidae)* Pp: 47 in Program notes and abstracts of the 39th Annual Meeting of the Society for the Study of Amphibians and Reptiles. The University of Kansas.U.S.A.

Coloma, L.A., S. Lotters & A.W. Salas. 2000. Taxonomy of the *Atelopus ignescens* complex (Anura: Bufonidae): designation of a neotype of *Atelopus ignescens* and recognition of *Atelopus exiguous*. *Herpetológica* 56(3): 303 - 324

Coloma, L.A. & A. Quiguango. 2000. *Anfibios de Ecuador: Lista de Especies y Distribución*

altitudinal. (en línea). Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador. <http://www.puce.edu.ec/Zoologia/anfecua.htm>

Daszak P., L. Berger, AA. Cunningham, A.D. Hyatt, D.E. Green & R. Speare. 1999. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging infectious diseases* 5 (5).

Daszak P., L. Berger, AA. Cunningham, A.D. Hyatt, D.E. Green & R. Speare. 2000. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging infectious diseases* 5: 1-25.

Garner T.W.J., S. Walker, J. Bosch, A.D. Hyatt, A.A. Cunningham & M.C. Fischer 2005. Chytrid fungus in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 11, No 10. (en línea) <http://www.sosanfibios.org/hongos/html>.

Hall, J.A. & T. Achstetter. *Métodos Histotecnológicos del AFIP*

Lips K. 1999. Mass mortality and population declines of anurans at an upland site in western Panamá. *Conserv Biol* 13: 117 - 125

Longcore, J.E., AP. Pessier & D.K. Nichols. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. Et sp. Nov., n a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91: 219 – 227

Lotters, S. 1996. *The neotropical toad genus Atelopus, Checklist-Biology-Distribution*. M. Vences & F. Glaw Verlage, Koln, Alemania

Merini-Viteri, A. 2001. *Análisis de posibles causas de las disminuciones de poblaciones de anfibios en los Andes de Ecuador*. Licenciatura Thesis, Pontificia Universidad Católica Ecuador, Quito, Ecuador. 66Pgs.

Pessier, A.P.; D.K. Nichols.; J.E. Longcore & M.S. Fuller. 1999. Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobatides spp.*) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11: 194-199.

Pounds, J.A. & M.L. Crump. 1994. Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Conservation Biology* 8: 72 - 85.

Puschendorf R. *Guía práctica para el diagnóstico de quitridiomycosis en anfibios utilizando diferentes técnicas histopatológicas*. Apoyado por el Pan – American Studies Institut, un programa confinado por la US National Science Foundation y el US Departament of Energy

Ron, S. R. & A. Merino. 2000. *Declinación de anfibios del Ecuador información general y primer reporte de Chytridiomycosis para Sudamerica*. Froglog 42: 2-3. Museo de Zoología, PUCE, Quito, Ecuador.

Ron, S.R., L.A. Coloma, A. Merino, J.M. Guayasamín & M. Bustamante. 2000 *Información sobre declinaciones de anfibios en el Ecuador*. <http://www.puce.edu.ec/Zoologia/infodeci.html>.

Stebbins, R.C. & N.W. Cohen 1995. *A Natural History of Amphibians*. Princeton University Press. Estados Unidos.

Vial, J.L. & L. Sailor 1993. *The status of amphibian populations*. Working document No. 1. Declining amphibian Population Task Force, World Conservation Union. Suiza

4

Anexo

Tabla 1. Especímenes diagnosticados como posible positivos para Chytridiomycosis, ordenados por Número de Análisis del *Batrachochytrium dendrobatides* (No. BD)

No BD	Colección	Familia	Genero	Provincia	Localidad	Altitud (msnm)	Tinción	Resultado	Observaciones
02	09/07/04	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Loja	Bosque Aguirre	2800	Hematoxilina	Negativo	características anormales
10	09/07/04	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Loja	Bosque Aguirre	2800	Hematoxilina	Negativo	bulbo
17	29/04/03	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	San Luis	1220	Hematoxilina	Negativo	piel desprendida
21	29/04/03	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	San Luis	1220	Hematoxilina	Negativo	piel desordenada
33	23/01/05	Hylidae	Philomedusa	Zamora Chinchipe	Palanda	1609	Hematoxilina	Negativo	bulbo
β									
43	28/01/05	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Palanda	1609	Hematoxilina	Negativo	características anormales
49	25/01/05	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Palanda	1609	Hematoxilina	Negativo	características anormales
66	28/01/05	Bufo	Bufo	Zamora Chinchipe	Palanda	1609	Hematoxilina	Negativo	características anormales
71		Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Utua	2340	Hematoxilina	Negativo	piel desprendida
83	12/12/04	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Chorrillos	1840	Hematoxilina	Negativo	características anormales
93	29/04/03	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	San Luis PNP	1220	Hematoxilina	Negativo	piel desprendida
94	30/04/03	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	San Luis PNP	1220	Hematoxilina	Negativo	características anormales

ANEXOS:

Anexo 1. Total de especies colectados entre los años 2003 y 2005 para el análisis de *B. Dendrobatidis*

Observaciones: Para verificar y aprovechar el material colectado en el campo se tomó en cuenta especímenes obtenidos en el Bosque Colorado - Puyango y también obtenidos en tiendas de mascotas de la localidad de Loja.

No Individuo	No BD	Familia	Genero	Provincia	Localidad	Altitud	Tincion	Resultado
1	1	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Loja	Bosque Aguirre	2800 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
2	2	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Loja	Bosque Aguirre	2800 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
3	4	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Loja	Bosque Aguirre	2800msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
4	5	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Loja	Bosque Aguirre	2800 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
5	6	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Loja	Bosque Aguirre	2800 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo

6	8	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Loja	Bosque Aguirre	2800 msnm	Gram	Negativo
7	9	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Loja	Bosque Aguirre	2800 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
8	10	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Loja	Bosque Aguirre	2800 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
9	11	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Loja	Bosque Aguirre	2800 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
10	14	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	San Luis	1220 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
11	16	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	San Luis	1220 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
12	17	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	San Luis	1220 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
13	21	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	San Luis	1220 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
14	22	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	San Luis	1220 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
15	24	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	San Luis	1220 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
16	28	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Palanda	1609 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
17	33	Hylidae	Philomedusa	Zamora Chinchipe	Palanda	1609 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
18	42	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Palanda	1609 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
19	43	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Palanda	1609 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
20	45	Bufo	Bufo	Zamora Chinchipe	Palanda	1609 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
21	49	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Palanda	1609 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
22	54	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Palanda	1609 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
23	55	Hylidae	Philomedusa	Zamora Chinchipe	Palanda	1609 msnm	Giemsa, Gram, Hematoxilina	Negativo
24	57	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Palanda	1609 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
25	58	Centrolenidae	Cocranella	Zamora Chinchipe	Palanda	1609 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
26	62	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Palanda	1609 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
27	65	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Palanda	1609 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
28	66	Bufo	Bufo	Zamora Chinchipe	Palanda	1609 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo

29	69	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Utuaana	2340 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
30	70	Leptodactylidae	Phrinopus	Zamora Chinchipe	Utuaana	2340msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
31	71	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Utuaana	2340msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
32	74	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Utuaana	2340msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
33	75	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Utuaana	2340 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
34	76	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Chorrillos	1840 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
35	77	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Chorrillos	1840 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
36	78	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Chorrillos	1840 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
37	81	Centrolenidae	Cocranella	Zamora Chinchipe	Chorrillos	1840 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
38	82	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Chorrillos	1840 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
39	83	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Chorrillos	1840 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
40	86	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Chorrillos	1840 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
41	88	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	Chorrillos	1840 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
42	93	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	San Luis PNP	1220msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
43	94	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	San Luis PNP	1220msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
44	95	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	San Luis PNP	1220msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
45	96	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	San Luis PNP	1220msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
46	98	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	San Francisco	2160msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
47	99	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	San Francisco	2160msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
48	00100	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Zamora Chinchipe	San Francisco	2160msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
49	00101	Bufo	Bufo	Loja	Zamora Huayco	3220 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
50	00103	Bufo	Bufo	Loja	Zamora Huayco	3220msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
51	00104	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Loja	Zamora Huayco	3220msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
52	00105	Dendrobatidae	Colosthetus	Puyango	Bosque El Colorado	1800 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo

53	00106	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Puyango	Bosque El Colorado	1800 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
54	00107	Hylidae	Hyla	Puyango	Bosque El Colorado	1800 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
55	00108	Hylidae	Hyla	Puyango	Bosque El Colorado	1800 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
56	00109	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Loja	Páramo de Amaluza	3480 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
57	00110	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Loja	Páramo de Amaluza	3480 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
58	00111	Leptodactylidae	Eleutherodactylus	Loja	Páramo de Amaluza	3480 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
59	00112	Centrolenidae	Cocranella	Loja	Loja	2063 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
60	00113	Centrolenidae	Cocranella	Loja	Loja	2063 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
61	00114	Bufo	Bufo	Loja	Loja	2063 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo
62	00115	Bufo	Bufo	Loja	Loja	2063 msnm	Hematoxilina & Eosina	Negativo