

Invasión de rana toro y quitridiomicosis: dos amenazas a la conservación de los anfibios en Uruguay



MSc. Gabriel Laufer

Tesis de doctorado de Ciencias Biológicas,

Opción Ecología

Orientador: Dr. Rafael O. de Sá

Co-orientador: Dr. Álvaro Soutullo

Co-orientador: Dr. Claudio Martínez-Debat

Programa de Desarrollo de las
Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Facultad de Ciencias, Universidad de
la República

Área Biodiversidad y Conservación,

Museo Nacional de Historia Natural

Invasión de rana toro y quitridiomycosis: dos amenazas a la conservación de los anfibios en Uruguay

Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas,

Opción Ecología

Autor: MSc Gabriel Laufer

Área Biodiversidad y Conservación, Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo, 25 de mayo 582, Montevideo 1100, Uruguay. E-mail: gabriel.laufer@gmail.com

Orientador: Dr. Rafael de Sá

Department of Biology, University of Richmond. Richmond, EE. UU. rdesa@richmond.edu

Co-orientador: Dr. Álvaro Soutullo

*Centro Universitario Regional Este, Universidad de la República, Maldonado
Área Biodiversidad y Conservación, Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo.
a.soutullo@gmail.com*

Co-orientador: Dr. Claudio Martínez-Debat

LaTraMA Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria, Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo. clau@fcien.edu.uy

Tribunal

Presidente: Dr. Daniel Naya

Sección Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo

Vocal: Dr. Marcelo Loureiro

Sección Zoología de Vertebrados, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo

Vocal: Dr. Alvar Carranza

Centro Universitario Regional Este, Universidad de la República, Maldonado.

Agradecimientos

A mis padres, hermanos y Sofi y Fedé! Siempre el apoyo de la familia en todo!

A mis orientadores por todo su apoyo! Gracias Rafael, Álvaro y Claudio. Al tribunal: Daniel Naya, Alvar Carranza, Marcelo Loureiro por sus valiosos comentarios y a Omar Defeo por sus aportes durante el seguimiento.

A toda la gente que me apoyó en este camino. A Mailén Arleo y Claudio Borteiro, grandes compañeros del PCR. A los del Museo, Diego Arrieta, Javier González, Cristhian Clavijo y Gonzalo Cortés.

Por su apoyo en tareas de campo y laboratorio agradezco a Ramiro Pereira, Mauro Berazategui, Matías Zarucki, Juan Manuel Barreneche, Lucía Ziegler, Juan Manuel Piñeiro, Sofía Cortizas, Noelia Gobel, Beco Mautone y Nadia Kacevas. Por su apoyo en campo y aportes en la comprensión de la invasión a los colegas argentinos Mauricio Akmentins, Eduardo Sarabia, Diego Barraso y Marcos Vaira. Por su apoyo de siempre a Matías Arim, Marcelo Loureiro y el Trocha.

A la NOE. Gran compañera en el mundo de las RANAS y en mi vida!

A los pobladores y dueños de predios de todas las localidades donde trabajamos. En especial a la gente de Aceguá, Ariel Landaburu, Ruben Almeida, Roberto y muchos otros.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación ANII por la Beca de Posgrado que me permitió realizar esta tesis. Al apoyo del Sistema Nacional de Investigadores SNI.

Índice

<i>Agradecimientos</i>	2
Capítulo 1: Introducción, objetivos y metodología	6
La crisis global de anfibios.....	6
Desafíos para la conservación de los anfibios en Uruguay.....	8
La rana toro <i>Lithobates catesbeianus</i>	9
El hongo patógeno quitridio <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	13
Objetivos.....	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos.....	16
Metodología general.....	17
Referencias.....	17
Capítulo 2: Distribución de las poblaciones de rana toro en Uruguay, estado de la invasión y prospección de quitridiomycosis	25
Resumen.....	25
Introducción.....	26
Estado de invasión de rana toro en Uruguay.....	26
La rana toro como vector de quitridiomycosis.....	27
Objetivos.....	28
Metodología.....	29
Distribución y avance de la rana toro en Uruguay.....	29
Dinámica de la invasión en Aceguá.....	30
Prospección de quitridiomycosis.....	31
Resultados.....	32
Distribución y avance de la rana toro en Uruguay.....	32
Dinámica de la invasión en Aceguá.....	39
Prospección de quitridiomycosis.....	40
Discusión.....	42
Referencias.....	47
Capítulo 3: Efectos de la rana toro sobre la riqueza de anfibios nativos y análisis de dieta	51
Resumen.....	51
<i>Parte I. Efecto de la rana toro sobre la riqueza de anfibios nativos</i>	52
Introducción.....	52

Metodología.....	54
Sitio de estudio	54
Muestreo de campo	55
Análisis de datos	56
Resultados.....	57
Discusión	63
<i>Parte II. Ecología trófica de la rana toro</i>	<i>65</i>
Introducción.....	65
Metodología.....	66
Muestreo de campo	66
Análisis de contenido estomacal.....	66
Análisis de datos	67
Resultados.....	68
Discusión	75
Referencias	77
Capítulo 4: Quitridiomicosis en el ensamble de anfibios nativos invadido por la rana toro en Aceguá.....	83
Resumen	83
Introducción.....	84
Metodología.....	86
Sitio de estudio	86
Muestreo de campo	88
Determinación de infección por PCR convencional.....	89
Análisis de contenido estomacal.....	89
Análisis de datos	90
Resultados.....	91
Prevalencias de quitridio.....	91
Costos a nivel de individuo.....	95
Discusión	97
Prevalencias de quitridio.....	97
Costos del quitridio	100
El rol de la rana toro	102
Referencias	105
Capítulo 5: Prevalencia y efecto de quitridiomicosis en larvas de anuros de Aceguá	112
Resumen	112

Introducción.....	112
Metodología.....	114
Muestreos de campo	114
Determinación de infección por PCR en tiempo real	116
Análisis de datos	117
Análisis de daño y dieta	118
Resultados.....	119
Costo del quitridio en disco oral	121
Efecto del daño en disco oral sobre la dieta	124
Discusión	124
Referencias	127
Capítulo 6: Conclusiones y recomendaciones.....	130
Conclusiones.....	130
Recomendaciones	132
Referencias	133
ANEXO 1. Evaluación del método utilizado para la detección de rana toro, a través de sus vocalizaciones:	
horario de actividad	135
Introducción.....	135
Metodología.....	136
Resultados y Discusión.....	137
Referencias	139

Capítulo 1: Introducción, objetivos y metodología

La crisis global de anfibios

Estamos viviendo la era del antropoceno en el planeta tierra, asociada a efectos sin precedentes sobre la biota. La magnitud, y sobre todo la tasa de cambio y degradación de la biodiversidad, parecen no tener precedentes históricos (Barnosky et al. 2011). Esto ha llamado la atención pública a nivel global y existe un sinnúmero de iniciativas de los estados y las organizaciones civiles para lograr detener o revertir este proceso. A pesar de dichas iniciativas internacionales, las tendencias de los diferentes indicadores de conservación de la biodiversidad se mantienen mayormente negativas (Butchart et al. 2010). En tal sentido, las Listas Rojas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) son un buen indicador de esta crisis global. Dichas listas son el inventario más completo del estado de conservación de la biodiversidad a nivel mundial, categorizando mediante un conjunto de criterios el riesgo de extinción a los diferentes taxa. Analizando los números que arroja esta categorización podemos observar que la situación es alarmante: una buena parte de los vertebrados del mundo se encuentran bajo alguna categoría de amenaza, en un rango que va desde un 14% correspondiente a las aves a un 41% correspondiente a los anfibios (Hoffmann et al. 2010).

La situación de los anfibios es la más preocupante entre los vertebrados. Hace más de 60 años se advirtió que las poblaciones nativas de ranas utilizadas para el consumo humano en EEUU, especialmente la rana toro *Lithobates catesbeianus* (Shaw 1802), estaban disminuyendo (Dickerson 1969). Ya desde esa época se plantearon como posibles causas la destrucción de su hábitat, los contaminantes y la sobreexplotación. Sin embargo, recién en 1989, en el marco del primer Congreso Mundial de Herpetología, se logró una perspectiva global del declive de los anfibios (Collins et al. 2009). Este fenómeno de declive global configura una situación de una escala no conocida en nuestra época, comparable en magnitud de la extinción de los dinosaurios (Wake y Vredenburg 2008). Esto provocó un llamado de atención internacional muy

significativo por señalar la gran escala del fenómeno, pero además por plantear dos causas comunes previamente ignoradas: las especies exóticas invasoras (Kraus 2009) y las enfermedades infecciosas (Olson et al. 2013). Si bien la mayor causa sigue siendo la pérdida de hábitat, esto se agravó por la suma de estas “nuevas” amenazas, que actúan aún dentro de las áreas protegidas, al igual que el cambio climático (Li et al. 2013).

En respuesta a esto, se están implementando diferentes planes para la conservación de los anfibios, con estrategias diversas y planteando frecuentemente más cuestionamientos que soluciones (Collins et al. 2009; Bishop et al. 2012; Beebee 2014; Nori et al. 2015; Meredith et al. 2016). Si bien existe un consenso entre investigadores y conservacionistas acerca de la importancia de la conservación del hábitat y de las áreas protegidas, esta estrategia *per se* no siempre está resultando útil; muchos anfibios están declinando dentro de las mismas áreas protegidas (Geldmann et al. 2013). Por supuesto que los programas de monitoreo en áreas agrícolas y urbanas también muestran fuertes caídas poblacionales, probablemente debidas a las causas antes mencionadas, sumadas a las características propias del avance de la frontera agrícola y la urbanización (Nori et al. 2015). Las grandes dificultades para conservar a ciertas especies en el medio natural ha llevado a generar una corriente de promoción de manejo *ex situ* como una opción urgente que pretende aislar algunas poblaciones de anfibios de sus amenazas (Griffiths y Pavajeau 2008; Harding et al. 2015). Sin embargo, los resultados a largo plazo de estos programas de cría en cautiverio son cuestionables, debido a que aún se conoce poco de la historia natural, inmunología y genética de este grupo, por lo que no sería una estrategia sostenible en el tiempo. La posibilidad de una reintroducción rápida debería ser la condición imprescindible para dichos programas, pero esta sigue estando restringida por la persistencia de las amenazas en el medio natural (Griffiths y Pavajeau 2008).

La situación global de los anfibios resulta comprometida y la gestión de su conservación parece estar siendo limitada por las herramientas existentes. Sin duda, el éxito a largo plazo está condicionado por el mantenimiento del hábitat de las diferentes especies y por una comprensión profunda de las amenazas existentes, que permita la generación de medidas eficientes de mitigación. Esto último, solo será posible mediante una intensificación de la investigación y el desarrollo del conocimiento compartido en la comunidad internacional, uno de los mayores

desafíos para la conservación en nuestros tiempos (Smith y Sutherland 2014).

Desafíos para la conservación de los anfibios en Uruguay

En Uruguay ocurren 47 especies de anfibios anuros nativos y una especie de cecilia, *Gymnophiona* (Carreira y Maneyro 2015). Considerando la ubicación de nuestro país, podemos encontrar anfibios típicos de las pampas, así como especies que encuentran aquí sus límites de distribución tanto del sur de Brasil como del límite litoral con Argentina. Algunas de las especies nativas tienen en nuestro país una parte importante de su distribución global, como algunos anuros serranos o costeros. Contamos con una relativamente importante diversidad de anuros, correspondientes a diferentes eco-regiones. Así tenemos tanto especies de amplia distribución (distribuidas en todo el país), como especies asociadas a diferentes paisajes. Entre estas últimas, cabe destacar ensambles de anuros típicos del litoral del Río Uruguay, de la costa sobre el Río de la Plata y el Océano Atlántico, o de las Serranías del Este (Brazeiro et al. 2012). Justamente, son estos ambientes los que albergan a la mayor diversidad de anfibios (Nunez et al. 2004; Kolenc et al. 2009; Laufer et al. 2009b; Canavero et al. 2010; Prigioni et al. 2011; Maneyro y Carreira 2012; Carreira y Maneyro 2015).

Al igual que en el resto del mundo, una de las mayores amenazas a la conservación de anfibios en Uruguay es la pérdida y degradación de hábitat. El avance de la frontera agrícola (especialmente asociada a la forestación con eucalipto y el cultivo de soja), la intensificación de la ganadería, la industrialización y la urbanización, son las principales amenazas a la biodiversidad nativa de anfibios (Clavijo et al. 2013). Lamentablemente, tal vez el mayor problema sea la escasa información que tenemos acerca de la historia natural y el estado actual de la mayor parte de las especies que habitan en nuestro país. En este sentido, cabe destacar que si bien el conocimiento de las amenazas y el estado de conservación de nuestra anurofauna se ha incrementado en forma importante en la última década, el mismo sigue siendo limitado, fragmentado, y en gran parte anecdótico y poco sistematizado (Laufer et al. 2008; Borteiro et al. 2009; Kolenc et al. 2009; Canavero et al. 2010; Toranza 2011; Brazeiro et al. 2012; Gobel 2013; Toranza y Maneyro 2013; Cortizas 2014). De hecho, no existe para Uruguay un plan de acción consensuado que plantee medidas concretas para la conservación de los anfibios nativos.

En los últimos años se han realizado una serie de evaluaciones del estado de conservación de los anfibios de Uruguay por diferentes autores y con diferentes objetivos o estrategias. Arrieta y colaboradores (2013) analizan el estatus de las especies de anfibios uruguayas, concluyendo que el 44% de las mismas resultan prioritarias para la conservación, el 42% se encuentran amenazadas y el 40% requieren de esfuerzos de protección dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas SNAP. Laufer (2012) analiza la susceptibilidad de los anfibios del Uruguay al cambio climático, encontrando que seis especies de anuros serían mayormente vulnerables a este fenómeno y por tanto deberían ser priorizadas. Finalmente, Carreira y Maneyro (2015) realizan una categorización nacional de anfibios siguiendo los criterios de la UICN, y proponen que 12 de las especies se encuentra bajo algún grado de amenaza, estando tres de estas categorizadas como “en peligro crítico”, ocho “en peligro” y una como “vulnerable”. En resumen, existe un consenso en que una buena parte de las especies de anfibios uruguayos se encuentran bajo algún grado de peligro, por lo que resulta primordial evaluar las amenazas y buscar medidas para manejarlas.

Dos amenazas recurrentes para los diferentes autores, son la introducción de especies exóticas invasoras y las enfermedades. Una especie exótica de alto riesgo que ha sido registrada en Uruguay es la rana toro, *Lithobates catesbeianus* (Laufer et al. 2008; Ruibal y Laufer 2012). Además, una serie de enfermedades infecciosas han sido reportadas para nuestro país, como la quitridiomycosis, causada por el hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (Mazzoni et al. 2003; Borteiro et al. 2009; Bardier et al. 2011), el *Ranavirus* (Galli et al. 2006), los Dermocystida de los géneros *Sphaerothecum* y *Rhinosporidium* (Borteiro 2016), y la esparganosis causada por tenias de *Spirometra* (Borteiro et al. 2015). Tanto para la rana toro, como para la amenaza de las enfermedades, existe un vacío de información local y regional que debe ser llenado con estudios de terreno y laboratorio, priorizando evaluaciones sobre sus interacciones con las comunidades nativas.

La rana toro *Lithobates catesbeianus*

En diferentes regiones del mundo se ha evidenciado el fuerte efecto de la introducción de depredadores tope sobre las comunidades de anfibios (Hecnar y M'Closkey 1997a; Kats y Ferrer 2003). La evidencia indica que los grandes depredadores que están en contacto con sistemas acuáticos son los de mayor riesgo, entre ellos encontramos los grandes peces, como pueden ser

los salmónidos, los cangrejos de río, e incluso algunas especies de anuros que invaden y afectan negativamente a las comunidades de anfibios nativos (Pearl et al. 2005; Havel et al. 2015). Entre estos últimos cabe resaltar a la rana africana de uñas *Xenopus laevis* que fue comercializada en el mundo por su uso como animal de laboratorio y como mascota. Hoy ocurren invasiones esta especie en varios sitios del mundo, siendo las más estudiadas las de Europa y Chile (Lobos y Jaksic 2005; Measey et al. 2012).

Tal vez la especie más problemática por su persistencia como invasora y por sus efectos sea la rana toro, *Lithobates catesbeianus*, un anfibio originario de la costa este de Norteamérica. Este es uno de los anfibios mejor conocidos por la ciencia, desde múltiples enfoques (Peters 1994; Cooper Jr. 2011; Cecília Silva de Castro 2014). Históricamente se cosechó a la rana toro en su distribución original para el consumo humano. Es así que las primeras invasiones de rana toro ocurren en el oeste de Estados Unidos, al traslocarla intencionalmente fuera de su distribución nativa con el fin de que sus poblaciones asilvestradas sirvieran como fuente de alimento para humanos (Adams y Pearl 2007). Posteriormente, asociado a la expansión del gusto por el consumo de carnes exóticas, esta rana fue utilizada como especie de acuicultura e introducida en diferentes sitios de Asia, Europa y Sudamérica. Estas introducciones fueron tanto para realizar liberaciones deliberadas como para su cría en sistema cerrados, pero en ambos casos se terminaron estableciendo poblaciones ferales que se transformaron en un problema para la biodiversidad nativa (Lowe et al. 2000; Ficetola et al. 2007; Cunha y Delariva 2009; Kraus 2009; Bai et al. 2012; Lin et al. 2013).

La rana toro es un anuro acuático de gran tamaño relativo durante toda su ontogenia, tanto en estado larval como adulto. Una hembra adulta puede superar los 18 cm de longitud de hocico a cloaca y los renacuajos pueden medir hasta 18 cm de longitud del hocico a la punta de la cola (Bury y Whelan 1984). Por su tamaño y comportamiento es una especie muy conspicua, especialmente durante la temporada reproductiva cuando los machos vocalizan un sonido característico similar al de un toro, lo que le da su nombre común (Capranica 1968). Si bien son capaces de utilizar una amplia gama de sistemas dulceacuícolas como hábitat, prefieren los cuerpos de agua lénticos permanentes de tamaño pequeño o mediano, con vegetación emergente. Incluso, se les encuentra frecuentemente en distintos tipos de reservorios de agua para consumo

humano, animal o riego (Gahl et al. 2009; Cook et al. 2013). De hecho, el tipo de uso productivo del agua superficial puede determinar el éxito de establecimiento, la distribución y la velocidad de dispersión esta especie (Doubledee et al. 2003; Ficetola et al. 2010).

Todo su ciclo transcurre dentro del agua, desde las masas gelatinosas donde las hembras ponen más de 20.000 huevos, pasando por sus larvas que pueden persistir en esta fase por varios años, hasta metamorfos y adultos. Si bien luego de la metamorfosis son capaces de moverse por el medio terrestre, utilizan muy poco este medio, restringiéndolo principalmente a ciertos momentos de forrajeo y dispersión (Gahl et al. 2009; Wang y Li 2009). Su reproducción es estacional, ocurriendo en primavera, con la formación de coros e incluso *leks* (Emlen 1976; Ryan 1980). Una vez eclosionadas, las larvas se alimentan de una gran diversidad de algas, pequeños invertebrados y huevos (Ruibal y Laufer 2012). Luego, el adulto se alimentan de una gran diversidad de presas, desde invertebrados hasta mamíferos y aves, actuando como depredadores tope y estructuradores de las comunidades (Hecnar y M'Closkey 1997b; Krupa 2002; Wu et al. 2005; Boelter y Cechin 2007; Yiming et al. 2011). Sin duda todos estos atributos hacen a la rana toro una especie muy plástica y tolerante a condiciones ambientales, y han favorecido su invasión y establecimiento (Kraus 2009).

Una vez establecida, la rana toro es capaz de depredar fuertemente sobre presas nativas, competir con el ensamble de anuros y transmitir enfermedades. Sus renacuajos abundantes alteran el ambiente acuático. Se ha reportado desde un descenso en riqueza y abundancia de las especies nativas, hasta el cambio en estructuras comunitarias o interferencias acústicas, asociadas a la invasión de la rana toro (Adams y Pearl 2007; Kiesecker y Blaustein 2008; Kraus 2009; Dodd 2010; Both y Grant 2012).

En Sudamérica, el país que promovió y lideró la introducción de la ranas toro para acuicultura fue Brasil, con un gran desarrollo de su cría en granjas ranícolas (Cunha y Delariva 2009). Luego, varios países de la región imitaron este ejemplo de producción, para lo cual introdujeron ejemplares importados desde Brasil. Es en este contexto que Uruguay introduce la rana toro en los años 80 bajo la promoción del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (a través de la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos) y la Universidad de República (a través del Instituto de Investigaciones Pesqueras de la Facultad de Veterinaria) y la inversión de una

serie de productores privados, llegando al número aproximado de 19 granjas de ranas (Mazzoni 2001; Carnevia 2008). A pesar del riesgo que implicaba la introducción de esta especie, no existe ningún relevamiento ni análisis de riesgo oficial disponible del número exacto de establecimientos que funcionó en Uruguay, su estado actual y el destino de los animales de los que dejaron de funcionar.

Contrariamente a lo esperado, desde un principio los técnicos ignoraron o subestimaron el riesgo asociado esta especie, a pesar de la fuerte evidencia existente ya en esas fechas sobre la capacidad de la rana toro de invadir y tolerar el clima de nuestras latitudes (Korschgen y Moyle 1955; Willis et al. 1956; Emlen 1968; Wiewandt 1969; Lillywhite 1970; Lillywhite 1971; Moyle 1973; Ryan 1980). Por diversos motivos, tales como la no factibilidad del negocio, la falta de conocimiento técnico y la subestimación del costo económico, los criaderos fueron cerrando y no se realizó ningún tipo de control sobre el destino de los ejemplares que ellos mantenían en cautiverio. Es así que para principios de la primer década del 2000 dejaron de funcionar la casi totalidad de las granjas de rana en Uruguay. En el año 2005, en las proximidades de donde funcionó una de esas granjas en Rincón de Pando, Canelones, se detectó la primer población asilvestrada de la especie. Desde este primer registro, se evidenciaron efectos negativos de *L. catesbeianus* sobre la biodiversidad nativa (Laufer et al. 2008). Posteriormente, en el marco del Proyecto Invasiones Acuáticas de la Sección Zoología de Vertebrados de la Facultad de Ciencias, Universidad de la República—liderado por Matías Arim y financiado por el programa PDT (Dirección de Ciencia y Tecnología, Ministerio Educación y Cultura)—se reporta la presencia de dos nuevas poblaciones en las localidades de Paraje Bizcocho, Soriano y Paraje Aceguá, Cerro Largo (Laufer et al. 2009a). Recientemente, Lombardo y colaboradores (2016) reportan la ocurrencia de un cuerpo de agua invadido en la localidad de San Carlos, Maldonado. En todos los casos, los reportes fueron de poblaciones relativamente pequeñas, encontrando a la rana toro en una etapa temprana de invasión.

Los registros de Uruguay se deben considerar en el contexto de la invasión corriente en el cono sur de Sudamérica, donde la rana toro aparece como la especie herpetológica exótica más persistente al este de los Andes. Su invasión crece en la región tanto por el avance de las poblaciones del sur de Brasil, las de Córdoba Argentina, como por la aparición de nuevos focos

en las provincias argentinas de San Juan, Mendoza, Salta, y Misiones (Giovannelli et al. 2008; Akmentins et al. 2009; Kraus 2009; Akmentins y Cardozo 2010; Both et al. 2011; Nori et al. 2011a; Sanabria et al. 2011b; Sanabria et al. 2011a). Los modelos de nicho indican que la región es adecuada para el establecimiento de poblaciones de rana toro (Ficetola et al. 2007; Nori et al. 2011b), por lo que se debería considerar a la invasión de este anfibio como un problema preocupante para la conservación de la biodiversidad regional.

La presencia de quitridiomycosis en las invasiones de rana toro de la región también resulta preocupante. La rana toro podría tener un rol de vector, por su resistencia y la baja prevalencia recurrente en todas sus poblaciones (Garner et al. 2006; Schloegel et al. 2012; Gervasi et al. 2013; Huss et al. 2013).

El hongo patógeno quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis*

A finales de los años 90 se reportaron eventos de mortalidad masiva e importantes declinaciones de poblaciones de anfibios en áreas protegidas o relativamente bien conservadas, especialmente en América Central, el Caribe y Australia (Collins et al. 2009). Estos eventos fueron rápidamente asociados a la quitridiomycosis, una enfermedad infecciosa causada por un hongo quitridio patógeno acuático, *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), un consumidor de la queratina presente en la piel de anfibios que recientemente había sido descrito (Berger et al. 1999; Longcore et al. 1999; Collins and Storfer 2003; Skerratt et al. 2007; Fisher et al. 2009; Collins et al. 2009). Esta noticia preocupó a la comunidad científica y los conservacionistas, por tratarse de una fuerte amenaza poco visible y de muy difícil control. Es así que se generaron diversas líneas de investigación de campo y laboratorio, y la implementación de diferentes estrategias de conservación tanto *in situ* como *ex situ*, que buscaban contrarrestar las amenazas y mantener a las especies en críticamente amenazadas (Skerratt et al. 2007; Fisher et al. 2009; Collins et al. 2009). En este contexto se iniciaron una serie de estudios de investigación, logrando determinar al día de hoy que el quitridio se encuentra prácticamente en todos los sitios donde hay anfibios (Borteiro et al. 2009; Rosenblum et al. 2013; Olson et al. 2013; Hirschfeld et al. 2016), que existe una serie de cepas diferentes y posiblemente con efectos diferentes (Bataille et al. 2013; Lips 2014) e incluso una especie del mismo género que afecta a las salamandras, *Batrachochytrium salamandrivorans* (Martel et al. 2013). Se logró determinar que los efectos de

Bd pueden diferir entre poblaciones y especies (Bielby et al. 2015; Bradley et al. 2015) y que este hongo es muy sensible a la desecación y a ciertos tratamientos anti-fúngicos (Forrest y Schlaepfer 2011; Woodhams et al. 2012), pero que sin embargo su infección es muy persistente en condiciones húmedas (Kriger y Hero 2007; Kriger et al. 2007). Si bien no está claro si el quitridio es la causa primaria del declive global de anfibios, sin duda es una de las variables que está interactuando en este complejo fenómeno (Young et al. 2001; Blaustein et al. 2010; Voyles et al. 2011; Li et al. 2013; Buck et al. 2015; Van Rooij et al. 2015; Lips 2016).

A pesar de ser una especie nueva para la ciencia, mucho se ha avanzado en su conocimiento en los últimos años. El hongo *B. dendrobatidis* tiene dos etapas principales en su ciclo de vida, la de dispersión consistente en zoosporas móviles con un único flagelo posteriormente dirigido, y la reproductiva consistente en zoosporangios en la piel de los anfibios. Si bien los zoosporangios producen esporas en forma asexual, se ha observado que este hongo puede tener también reproducción sexual (Longcore et al. 1999; Berger et al. 2005; Farrer et al. 2013). El crecimiento y la supervivencia de Bd es óptimo entre 17 y 25 °C y en un pH entre 6 y 7 (Johnson et al. 2003; Piotrowski et al. 2004). Por su baja tolerancia a la desecación, especialmente en sus zoosporas de vida libre, se entiende que los sistemas acuáticos actúan como reservorios y sitios de infección (Rachowicz et al. 2004; Kriger y Hero 2007; Grant et al. 2008; Garmyn et al. 2012). Incluso, recientemente se ha presentado evidencia de dispersión de esporas por vías naturales abióticas, lo que hace aún más compleja la comprensión de este patógeno (Kolby et al. 2015).

Las zoosporas de *B. dendrobatidis* infectan las zonas queratinizadas de la epidermis de los anfibios postmetamórficos (generando la proliferación de células de queratina y una hiperqueratosis sobre todo en la región ventral y pélvica, y en los dígitos) y el disco oral de las larvas (generando la pérdida total o parcial de sus piezas bucales) (Fellers et al. 2001; Marantelli et al. 2004). Estas alteraciones vuelven mucho más grueso al tejido epidérmico, afectando su integridad y función, y generan la posterior pérdida de la homeostasis que puede llevar a la muerte del individuo (Berger et al. 1999; Daszak et al. 2003; Briggs et al. 2005; Knapp y Morgan 2006; Brem et al. 2007; Voyles et al. 2007; Kilpatrick et al. 2010). Sin embargo hoy parece claro que en la mayoría de los casos la infección por Bd no lleva necesariamente a la muerte del

individuo. Las consecuencias de la quitridiomycosis no son iguales para todos los anfibios, pudiendo identificarse especies o poblaciones resistentes, tolerantes y susceptibles. La evolución clínica de la infección depende del estado del anfibio, de la virulencia de la cepa infectante y de los determinantes ambientales (Carey et al. 2006; Kriger y Hero 2006; Ruggeri et al. 2015).

La idea inicial de una desaparición rápida de los anfibios a nivel global por la llegada de Bd, surgió de estudios de campo que evidenciaron efectos importantes y muy notorios (Berger et al. 1999; Skerratt et al. 2007; Wake y Vredenburg 2008). Sin embargo, posteriormente, la evidencia ha mostrado que mientras que algunos anfibios mueren con infecciones menores de Bd, otros son capaces de mantenerse sanos y exhibir escasa mortalidad (Savage et al. 2011). A partir de esta noción de que la quitridiomycosis no implica mortalidad, se abre una serie de preguntas acerca del costo de la infección con quitridio. A nivel ecológico se ha determinado que la infección con quitridio podría afectar interacciones ecológicas tales como la competencia y la depredación, e incluso aumentar la susceptibilidad al estrés ambiental (Johnson et al. 2003; Parris and Cornelius 2004; Briggs et al. 2005; Han et al. 2011; Kleinhenz et al. 2012; Buck et al. 2015). La suma de estos factores implicaría una posible degradación en la genética poblacional y reducción del *fitness* individual por presencia de la infección (Allentoft y O'Brien 2010).

Si bien existen diferentes hipótesis acerca del origen de Bd, como que se trate de una enfermedad emergente antes endémica, o que sea un patógeno global que ha aumentado su virulencia, la evidencia disponible hasta el momento parece poco clara y contradictoria (Fisher et al. 2009; Farrer et al. 2011; Schloegel et al. 2012). Actualmente la enfermedad está distribuida en forma global, con diferentes cepas del hongo afectando a más de 350 especies de anfibios (Fisher et al. 2009; Farrer et al. 2011; Rosenblum et al. 2013; Olson et al. 2013). Desde un principio se ha identificado al comercio internacional de especies como un posible vector diseminador de Bd. Si bien son varias las especies transportadas a nivel internacional que han mostrado ser portadoras del patógeno, hay dos que tienen un mayor potencial por estar ampliamente distribuidas, por ser invasoras, por ser acuáticas y por ser resistentes a la enfermedad, *Xenopus laevis* y *Lithobates catesbeianus* (Schloegel et al. 2009; Solís et al. 2010; Schloegel et al. 2012; Gervasi et al. 2013). Justamente se ha relevado el hecho de que prácticamente todas las poblaciones exóticas y nativas, cautivas y asilvestradas de rana toro tienen infección de quitridio

(Mazzoni et al. 2003; Garner et al. 2006; Bai et al. 2010; Schloegel et al. 2012) generalmente en una baja prevalencia (Huss et al. 2013). De hecho, mediante una prospectiva histórica se logró determinar que esta especie estaba infectada ya en 1928 dentro de su rango de distribución original (Huss et al. 2013).

Objetivos

Objetivo general

Los anfibios en Uruguay se encuentran amenazados y el efecto de dos de los factores reportados, la presencia de rana toro y la quitridiomycosis, ha sido escasamente explorado. El objetivo de la presente tesis es relevar y evaluar la ocurrencia, distribución y los efectos de la presencia de rana toro (*Lithobates catesbeianus*) y la quitridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) sobre la biodiversidad de los anfibios nativos de Uruguay. A su vez, es objetivo de esta tesis contribuir a la comprensión de los mecanismos subyacentes tras estos fenómenos de escala global. En este sentido, se pretende entender los mecanismos de interacción de la rana toro con las comunidades nativas, especialmente sus efectos sobre el ensamble de anuros, así como entender los costos ecológicos de la infección de quitridio en larvas y adultos.

Objetivos específicos

1. Evaluar la distribución de la rana toro en Uruguay, describiendo los patrones de avance de la invasión
2. Evaluar los efectos de la presencia de rana toro sobre la riqueza de anuros nativos
3. Describir y analizar la dieta que sustenta a la rana toro en Uruguay
4. Explorar la posible infección de quitridio en las diferentes poblaciones de rana toro de Uruguay
5. Evaluar la prevalencia de la quitridiomycosis en diferentes anuros nativos en una localidad invadida por rana toro
6. Evaluar los costos asociados a la infección con quitridio en los diferentes estados ontogénicos de los anuros
7. Proponer medidas de manejo tendientes a la mitigación de las amenazas evaluadas,

contribuyentes a la conservación de los anfibios nativos

Metodología general

La realización de esta tesis se basa fundamentalmente en un trabajo sistematizado de seguimiento de la invasión de rana toro en Uruguay desde el año 2005 en que fue inicialmente registrada (Laufer et al. 2008). Los estudios realizados fueron de distribución en campo, tanto de la rana toro como de los anfibios nativos en las zonas invadidas. Como criterio general se evaluó en diferentes sitios la presencia de rana toro mediante técnicas de muestreo de comunidades acuáticas enfocadas en larvas y técnicas de muestreo acústico y visual de anfibios adultos. En dichos sitios se puso a prueba el método de muestreo comúnmente utilizado de detección por canto de adultos, evaluando mediante registros sonoros la intensidad de canto por hora. En diferentes casos fueron colectados individuos y sacrificados siguiendo la reglamentación nacional de bienestar animal, que se encuentran depositados en la colección herpetológica del Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo (MNHN). Estos ejemplares fueron utilizados para la determinación de presencia de enfermedades, evaluaciones de la composición del ensamble, distribución de las frecuencias de talla y para los estudios de dieta.

Los análisis de dieta y estado de individuos se realizaron en el Museo Nacional de Historia Natural, mediante lupa binocular y determinación por claves específicas. Las determinaciones de la infección de quitridio se realizaron en el Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria de Facultad de Ciencias, con técnicas de histología, PCR convencional y PCR en tiempo real.

Los resultados obtenidos fueron analizados siguiendo diferentes criterios explicados en cada capítulo y los resultados de los análisis fueron contrastados con la información disponible en la literatura.

Referencias

- Adams M, Pearl C (2007) Problems and opportunities managing invasive Bullfrogs: is there any hope? In: Gherardi F (ed) Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats. Springer Netherlands.
- Akmentins MS, Cardozo DE (2010) American bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Shaw,

- 1802) invasion in Argentina. *Biol Invasions* 12:735–737.
- Akmentins MS, Pereyra LC, Lescano JN (2009) Primer registro de una población asilvestrada de rana toro (*Lithobates catesbeianus*) en la provincia de Córdoba, Argentina: Notas sobre la biología de la especie. *Cuad Herpetol* 23:25–32.
- Allentoft ME, O'Brien J (2010) Global Amphibian Declines, Loss of Genetic Diversity and Fitness: A Review. *Diversity* 2:47–71.
- Arrieta D, Borteiro C, Kolenc F, Langone JA (2013) Anfibios. In: *Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares.*, Soutullo, A. Clavijo, C. & Martínez-Lanfranco, J. A. SNAP, MVOTMA, Montevideo.
- Bai C, Garner T, Li Y (2010) First Evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in China: Discovery of Chytridiomycosis in Introduced American Bullfrogs and Native Amphibians in the Yunnan Province, China. *EcoHealth* 7:127–134.
- Bai C, Ke Z, Consuegra S, et al (2012) The role of founder effects on the genetic structure of the invasive bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in China. *Biol Invasions* 14:1785–1796.
- Bardier C, Ghirardi R, Levy M, Maneyro R (2011) First case of chytridiomycosis in an adult specimen of a native anuran from Uruguay. *Herpetol Rev* 42:65–66.
- Barnosky AD, Matzke N, Tomiya S, et al (2011) Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature* 471:51–57.
- Bataille A, Fong JJ, Cha M, et al (2013) Genetic evidence for a high diversity and wide distribution of endemic strains of the pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in wild Asian amphibians. *Mol Ecol* 22:4196–4209.
- Beebee TJ (2014) Amphibian conservation in Britain: A 40-year history. *J Herpetol* 48:2–12.
- Berger L, Hyatt AD, Speare R, Longcore JE (2005) Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis Aquat Organ* 68:51–63.
- Berger L, Speare R, Hyatt A (1999) Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. *Declines Disappearances Aust Frogs Environ Aust Canberra* 1999:23–33.
- Bielby J, Fisher MC, Clare FC, et al (2015) Host species vary in infection probability, sub-lethal effects, and costs of immune response when exposed to an amphibian parasite. *Scientific reports*, 5-10828.
- Bishop PJ, Angulo A, Lewis JP, et al (2012) The Amphibian Extinction Crisis - what will it take to put the action into the Amphibian Conservation Action Plan? *SAPI EN* 5-2.
- Blaustein AR, Walls SC, Bancroft BA, et al (2010) Direct and indirect effects of climate change on amphibian populations. *Diversity* 2:281–313.
- Boelter RA, Cechin SZ (2007) Impact of the Bullfrog diet (*Lithobates catesbeianus*-Anura, Kanidae) on native fauna: case study from the region of Agudo-RS-Brazil. *Nat Conserv* 5:115–123.
- Borteiro C (2016) Enfermedades de la piel en anfibios de Uruguay y sureste de Brasil: nuevos diagnósticos y posibles efectos. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.
- Borteiro C, Cruz JC, Kolenc F, Aramburu A (2009) Chytridiomycosis in frogs from Uruguay. *Dis Aquat Organ* 84:159–162.
- Both C, Grant T (2012) Biological invasions and the acoustic niche: the effect of bullfrog calls on the acoustic signals of white-banded tree frogs. *Biol Lett* 8:714–716.
- Both C, Lingnau R, Santos-Jr A, et al (2011) Widespread Occurrence of the American Bullfrog, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura: Ranidae), in Brazil. *South Am J Herpetol* 6:127–134.

- Bradley PW, Gervasi SS, Hua J, et al (2015) Differences in sensitivity to the fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* among amphibian populations. *Conserv Biol* 29:1347–1356.
- Brazeiro A, Panario D, Soutullo A, et al (2012) Clasificación y delimitación de las eco-regiones de Uruguay. MGAP/PPR – Facultad de Ciencias/Vida Silvestre/Sociedad Zoológica del Uruguay/CIEDUR, Montevideo
- Brem F, Mendelson III JR, Lips KR (2007) Field-sampling protocol for *Batrachochytrium dendrobatidis* from living amphibians, using alcohol preserved swabs. Version 1:18.
- Briggs CJ, Vredenburg VT, Knapp RA, Rachowicz LJ (2005) Investigating the population-level effects of chytridiomycosis: an emerging infectious disease of amphibians. *Ecology* 86:3149–3159.
- Buck JC, Hua J, Brogan III WR, et al (2015) Effects of Pesticide Mixtures on Host-Pathogen Dynamics of the Amphibian Chytrid Fungus. *PLoS One* 10:e0132832.
- Bury RB, Whelan JA (1984) Ecology and management of the bullfrog. U.S. Fish and Wildlife Service 155.
- Butchart SH, Walpole M, Collen B, et al (2010) Global biodiversity: indicators of recent declines. *Science* 328:1164–1168.
- Canavero A, Brazeiro A, Camargo A, et al (2010) Amphibian diversity of Uruguay: Background knowledge, inventory completeness and sampling coverage. *Bol Soc Zool Urug* 19:2–19.
- Capranica RR (1968) The vocal repertoire of the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Behaviour* 31:302–324.
- Carey C, Bruzgul JE, Livo LJ, et al (2006) Experimental exposures of boreal toads (*Bufo boreas*) to a pathogenic chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *EcoHealth* 3:5–21.
- Carnevia D (2008) Análisis de las oportunidades de cultivo de especies acuáticas en Uruguay. DINARA – FAO, Montevideo.
- Carreira S, Maneyro R (2015) Lista Roja de los Anfibios y Reptiles del Uruguay. Dirección Nacional de Medio Ambiente, Montevideo.
- Cecília Silva de Castro DA (2014) Feed digestibility and productive performance of bullfrogs raised in cages and fed in different periods and high frequency. *Aquaculture* 433:1–5.
- Clavijo C, Martínez-Lanfranco JA, Soutullo A (2013) Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares. SNAP / DINAMA / MVOTMA y DICYT / MEC, Montevideo.
- Collins JP, Crump ML (2009) *Extinction in Our Times: Global Amphibian Decline*, 1st edn. Oxford University Press, USA
- Collins JP, Storfer A (2003) Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Divers Distrib* 9:89–98.
- Cook MT, Heppell SS, Garcia TS (2013) Invasive bullfrog larvae lack developmental plasticity to changing hydroperiod. *J Wildl Manag* 77:655-662.
- Cooper Jr. WE (2011) Escape strategy and vocalization during escape by American Bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*). *Amphib-Reptil* 32:213–221.
- Cortizas S (2014) Respuestas asimétricas de los anuros nativos ante la invasión de rana toro. Tesina de Grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.
- Cunha ER, Delariva RL (2009) Introdução da Rã-Touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802): Uma Revisão. *SaBios* 4:34-46
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD (2003) Infectious disease and amphibian population declines. *Divers Distrib* 9:141–150.
- Dickerson MC (1969) *The Frog Book*. Dover Publications, New York.

- Dodd CK (2010) Amphibian ecology and conservation: a handbook of techniques. Oxford University Press.
- Doubledee RA, Muller EB, Nisbet RM (2003) Bullfrogs, disturbance regimes, and the persistence of California red-legged frogs. *J Wildl Manag* 424–438.
- Emlen ST (1976) Lek organization and mating strategies in the bullfrog. *Behav Ecol Sociobiol* 1:283–313.
- Emlen ST (1968) Territoriality in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Copeia* 1968:240–243.
- Farrer RA, Henk DA, Garner TW, et al (2013) Chromosomal copy number variation, selection and uneven rates of recombination reveal cryptic genome diversity linked to pathogenicity. *PLoS Genet* 9:e1003703.
- Farrer RA, Weinert LA, Bielby J, et al (2011) Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proc Natl Acad Sci* 108:18732–18736.
- Fellers GM, Green DE, Longcore JE, Gatten Jr RE (2001) Oral chytridiomycosis in the mountain yellow-legged frog (*Rana muscosa*). *Copeia* 2001:945–953.
- Ficetola GF, Maiorano L, Falcucci A, et al (2010) Knowing the past to predict the future: land-use change and the distribution of invasive bullfrogs. *Glob Change Biol* 16:528–537.
- Ficetola GF, Thuiller W, Miaud C (2007) Prediction and validation of the potential global distribution of a problematic alien invasive species—the American bullfrog. *Divers Distrib* 13:476–485.
- Fisher MC, Garner TW, Walker SF (2009) Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. *Annu Rev Microbiol* 63:291–310.
- Forrest MJ, Schlaepfer MA (2011) Nothing a hot bath won't cure: infection rates of amphibian chytrid fungus correlate negatively with water temperature under natural field settings. *PLoS One* 6:e28444.
- Gahl MK, Calhoun AJ, Graves R (2009) Facultative use of seasonal pools by American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Wetlands* 29:697–703.
- Galli L, Pereira A, Márquez A, Mazzoni R (2006) Ranavirus detection by PCR in cultured tadpoles (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) from South America. *Aquaculture* 257:78–82.
- Garmyn A, Van Rooij P, Pasmans F, et al (2012) Waterfowl: potential environmental reservoirs of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS One* 7:e35038.
- Garner TW, Perkins MW, Govindarajulu P, et al (2006) The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biol Lett* 2:455–459.
- Geldmann J, Barnes M, Coad L, et al (2013) Effectiveness of terrestrial protected areas in reducing habitat loss and population declines. *Biol Conserv* 161:230–238.
- Gervasi SS, Urbina J, Hua J, et al (2013) Experimental evidence for American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) susceptibility to chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *EcoHealth* 10:166–171.
- Giovanelli J, Haddad C, Alexandrino J (2008) Predicting the potential distribution of the alien invasive American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in Brazil. *Biol Invasions* 10:585–590.
- Gobel N (2013) Efectos comunitarios de la invasión de rana toro *Lithobates catesbeianus* en Aceguá, Cerro Largo. Tesina de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.
- Grant EHC, Bailey LL, Ware JL, Duncan KL (2008) Prevalence of the amphibian pathogen

- Batrachochytrium dendrobatidis* in stream and wetland amphibians in Maryland, USA. *Appl Herpetol* 5:233–241.
- Griffiths RA, Pavajeau L (2008) Captive breeding, reintroduction, and the conservation of amphibians. *Conserv Biol* 22:852–861.
- Han BA, Searle CL, Blaustein AR (2011) Effects of an Infectious Fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, on Amphibian Predator-Prey Interactions. *PLoS ONE* 6:e16675.
- Harding G, Griffiths RA, Pavajeau L (2015) Developments in amphibian captive breeding and reintroduction programs. *Conserv Biol* 30:340–349.
- Havel JE, Kovalenko KE, Thomaz SM, et al (2015) Aquatic invasive species: challenges for the future. *Hydrobiologia* 1–24.
- Hecnar SJ, M'Closkey RT (1997a) The effects of predatory fish on amphibian species richness and distribution. *Biol Conserv* 79:123–131.
- Hecnar SJ, M'Closkey RT (1997b) Changes in the composition of a ranid frog community following bullfrog extinction. *Am Midl Nat* 145–150.
- Hirschfeld M, Blackburn DC, Doherty-Bone TM, et al (2016) Dramatic Declines of Montane Frogs in a Central African Biodiversity Hotspot. *PloS One* 11:e0155129.
- Hoffmann M, Hilton-Taylor C, Angulo A, et al (2010) The impact of conservation on the status of the world's vertebrates. *science* 330:1503–1509.
- Huss M, Huntley L, Vredenburg V, et al (2013) Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in 120 archived specimens of *Lithobates catesbeianus* (American bullfrog) collected in California, 1924–2007. *EcoHealth* 10:339–343.
- Johnson ML, Berger L, Phillips L, Speare R (2003) Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis Aquat Organ* 57:255–260.
- Kats LB, Ferrer RP (2003) Alien predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. *Divers Distrib* 9:99–110.
- Kiesecker JM, Blaustein AR (2008) Effects of Introduced Bullfrogs and Smallmouth Bass on Microhabitat Use, Growth, and Survival of Native Red-Legged Frogs (*Rana aurora*). *Conserv Biol* 12:776–787.
- Kilpatrick AM, Briggs CJ, Daszak P (2010) The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends Ecol Evol* 25:109–118.
- Kleinhenz P, Boone MD, Fellers G (2012) Effects of the amphibian chytrid fungus and four insecticides on Pacific treefrogs (*Pseudacris regilla*). *J Herpetol* 46:625–631.
- Knapp RA, Morgan JA (2006) Tadpole mouthpart depigmentation as an accurate indicator of chytridiomycosis, an emerging disease of amphibians. *Copeia* 2006:188–197.
- Kolby JE, Ramirez SD, Berger L, et al (2015) Presence of amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in rainwater suggests aerial dispersal is possible. *Aerobiologia* 1–9.
- Kolenc F, Borteiro C, Baldo D, et al (2009) The tadpoles and advertisement calls of *Pleurodema bibroni* Tschudi and *Pleurodema kriegi* (Muller), with notes on their geographic distribution and conservation status (Amphibia, Anura, Leiuperidae). *Zootaxa* 1969:1–35.
- Korschgen LJ, Moyle DL (1955) Food habits of the bullfrog in central Missouri farm ponds. *Am Midl Nat* 332–341.
- Kraus F (2009) Alien reptiles and amphibians: a scientific compendium and analysis. Springer Verlag
- Kruger KM, Hero J-M (2007) The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is non-randomly distributed across amphibian

- breeding habitats. *Divers Distrib* 13:781–788.
- Kruger KM, Hero J-M (2006) Survivorship in wild frogs infected with chytridiomycosis. *EcoHealth* 3:171–177.
- Kruger KM, Pereoglou F, Hero J-M (2007) Latitudinal Variation in the Prevalence and Intensity of Chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) Infection in Eastern Australia. *Conserv Biol* 21:1280–1290.
- Krupa JJ (2002) Temporal Shift in Diet in a Population of American Bullfrog (*Rana catesbeiana*) in Carlsbad Caverns National Park. *Southwest Nat* 47:461.
- Laufer G (2012) Lista de especies de anfibios y reptiles de Uruguay vulnerables al cambio climático global. IIBCE, MEC, Montevideo
- Laufer G, Arim M, Loureiro M (2009a) Informe de dos nuevas poblaciones invasoras de Rana Toro en Uruguay. Montevideo
- Laufer G, Canavero A, Núñez D, Maneyro R (2008) Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) invasion in Uruguay. *Biol Invasions* 10:1183–1189.
- Laufer G, Piñeiro-Guerra JM, Pereira-Garbero R, et al (2009b) Distribution extension of *Scinax aramothyella* (Anura, Hylidae). *Biota Neotropica* 9:275–277.
- Li Y, Cohen JM, Rohr JR (2013) Review and synthesis of the effects of climate change on amphibians. *Integr Zool* 8:145–161.
- Lillywhite HB (1970) Behavioral temperature regulation in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Copeia* 1970:158–168.
- Lillywhite HB (1971) Temperature selection by the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 40:213–227.
- Lin Y, Gao Z, Zhan A (2013) Introduction and use of non-native species for aquaculture in China: status, risks and management solutions. *Rev Aquac* 7:28–58.
- Lips K (2014) A tale of two lineages: unexpected, long-term persistence of the amphibian-killing fungus in Brazil. *Mol Ecol* 23:747–749.
- Lips KR (2016) Overview of chytrid emergence and impacts on amphibians. *Phil Trans R Soc B* 371:20150465.
- Lobos G, Jaksic FM (2005) The ongoing invasion of African clawed frogs *Xenopus laevis* in Chile: causes of concern. *Biodivers Conserv* 14:429–439.
- Lombardo I, Elgue E, Villamil J, Maneyro R (2016) Registro de una población asilvestrada de rana toro (*Lithobates catesbeianus*) (Amphibia: Anura: Ranidae) en el Departamento de Maldonado, Uruguay. *Bol. Soc. Zool. Uruguay* 25:61–65.
- Longcore JE, Pessier AP, Nichols DK (1999) *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91:219–227.
- Lowe S, Browne M, Boudjelas S, De Poorter M (2000) 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database. Invasive Species Specialist Group Auckland, New Zealand
- Maneyro R, Carreira S (2012) Guía de Anfibios del Uruguay. Ediciones de la Fuga.
- Marantelli G, Berger L, Speare R, Keegan L (2004) Distribution of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin during tadpole development. *Pac Conserv Biol* 10:173–179.
- Martel A, Spitzen-van der Sluijs A, Blooi M, et al (2013) *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proc Natl Acad Sci* 110:15325–15329.
- Mazzoni R (2001) Ranicultura. Manual Básico para inversores. DINARA/IIP, Montevideo.
- Mazzoni R, Cunningham AA, Daszak P, et al (2003) Emerging Pathogen in Wild Amphibians and Frogs (*Rana catesbeiana*) Farmed for International Trade. *Emerg Infect Dis*

- 9:995–998.
- Measey GJ, Rödder D, Green SL, et al (2012) Ongoing invasions of the African clawed frog, *Xenopus laevis*: a global review. *Biol Invasions* 14:2255–2270.
- Meredith HM, VanBuren CS, Antwis RE (2016) Making amphibian conservation more effective. *Conserv Evid* 13:1–5.
- Moyle PB (1973) Effects of introduced bullfrogs, *Rana catesbeiana*, on the native frogs of the San Joaquin Valley, California. *Copeia* 1973:18–22.
- Nori J, Akmentins M, Ghirardi R, et al (2011a) American bullfrog invasion in Argentina: where should we take urgent measures? *Biodivers Conserv* 20:1125–1132.
- Nori J, Lemes P, Urbina-Cardona N, et al (2015) Amphibian conservation, land-use changes and protected areas: A global overview. *Biol Conserv* 191:367–374.
- Nori J, Urbina-Cardona JN, Loyola RD, et al (2011b) Climate change and American Bullfrog invasion: what could we expect in South America? *PloS One* 6:e25718.
- Nunez D, Maneyro R, Langone J, de Sa RO (2004) Distribución geográfica de la fauna de anfibios del Uruguay. *Smithsonian Herpetological Information Service* 134:1–34.
- Olson DH, Aanensen DM, Ronnenberg KL, et al (2013) Mapping the Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the Amphibian Chytrid Fungus. *PLoS ONE* 8:e56802.
- Parris MJ, Cornelius TO (2004) Fungal pathogen causes competitive and developmental stress in larval amphibian communities. *Ecology* 85:3385–3395.
- Pearl C, Adams M, Leuthold N, Bury R (2005) Amphibian occurrence and aquatic invaders in a changing landscape: Implications for wetland mitigation in the willamette valley, Oregon, USA. *Wetlands* 25:76–88.
- Peters SE (1994) Properties of twitch motor units of the ankle extensor muscles in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *J Morphol* 221:121–131.
- Piotrowski JS, Annis SL, Longcore JE (2004) Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96:9–15.
- Prigioni C, Borteiro C, Kolenc F (2011) Amphibia and Reptilia, Quebrada de los Cuervos, Departamento de Treinta y Tres, Uruguay. *Check List* 7:763–767.
- Rachowicz LJ, Vredenburg VT, others (2004) Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Dis Aquat Organ* 61:75–83.
- Rosenblum EB, James TY, Zamudio KR, et al (2013) Complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed with genome resequencing data. *Proc Natl Acad Sci* 110:9385–9390.
- Ruggeri J, Longo AV, Gaiarsa MP, et al (2015) Seasonal variation in population abundance and chytrid infection in stream-dwelling frogs of the Brazilian Atlantic forest. *PloS One* 10:e0130554.
- Ruibal M, Laufer G (2012) Bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Amphibia: Ranidae) tadpole diet: description and analysis for three invasive populations in Uruguay. *Amphib-Reptil* 33:355–363.
- Ryan MJ (1980) The reproductive behavior of the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Copeia* 1980:108–114.
- Sanabria E, Debandi G, Quiroga L, et al (2011a) First record of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) in Mendoza province, Argentina. *Cuad Herpetol* 25:55–58.
- Sanabria E, Ripoll Y, Jordan M, et al (2011b) Nuevo registro de rana toro americana (*Lithobates catesbeianus*) en San Juan, Argentina. *Rev Mex Biodivers* 82:311–313.

- Savage AE, Sredl MJ, Zamudio KR (2011) Disease dynamics vary spatially and temporally in a North American amphibian. *Biol Conserv* 144:1910–1915.
- Schloegel LM, Picco AM, Kilpatrick AM, et al (2009) Magnitude of the US trade in amphibians and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus infection in imported North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Biol Conserv* 142:1420–1426.
- Schloegel LM, Toledo LF, Longcore JE, et al (2012) Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Mol Ecol* 21:5162–5177.
- Skerratt LF, Berger L, Speare R, et al (2007) Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth* 4:125–134.
- Smith RK, Sutherland WJ (2014) *Amphibian Conservation: Global evidence for the effects of interventions*. Pelagic Publishing Ltd
- Solís R, Lobos G, Walker S, et al (2010) Presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in feral populations of *Xenopus laevis* in Chile. *Biol Invasions* 12:1641–1646.
- Toranza C (2011) Riqueza de anfibios de Uruguay: determinantes ambientales y posibles efectos del cambio climático. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Sub-área Ecología. PEDECIBA, Montevideo.
- Toranza C, Maneyro R (2013) Potential effects of climate change on the distribution of an endangered species: *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae). *Phyllomedusa* 12:97–106.
- Van Rooij P, Martel A, Haesebrouck F, Pasmans F (2015) Amphibian chytridiomycosis: a review with focus on fungus-host interactions. *Vet Res* 46:1–22.
- Voyles J, Berger L, Young S, et al (2007) Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. *Dis Aquat Organ* 77:113–118.
- Voyles J, Rosenblum EB, Berger L (2011) Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity. *Microbes Infect* 13:25–32.
- Wake DB, Vredenburg VT (2008) Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proc Natl Acad Sci* 105:11466–11473.
- Wang Y, Li Y (2009) Habitat Selection by the Introduced American Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) on Daishan Island, China. *J Herpetol* 43:205–211.
- Wiewandt TA (1969) Vocalization, aggressive behavior, and territoriality in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Copeia* 1969:276–285.
- Willis YL, Moyle DL, Baskett TS (1956) Emergence, breeding, hibernation, movements and transformation of the bullfrog, *Rana catesbeiana*, in Missouri. *Copeia* 1956:30–41.
- Woodhams DC, Geiger CC, Reinert LK, et al (2012) Treatment of amphibians infected with chytrid fungus: learning from failed trials with itraconazole, antimicrobial peptides, bacteria, and heat therapy. *Dis Aquat Organ* 98:11.
- Wu Z, Li Y, Wang Y, Adams MJ (2005) Diet of introduced Bullfrogs (*Rana catesbeiana*): predation on and diet overlap with native frogs on Daishan Island, China. *J Herpetol* 39:668–674.
- Yiming LI, Zhunwei KE, Yihua W, Tim M (2011) Frog community responses to recent American bullfrog invasions. *Curr Zool* 57:83–92.
- Young BE, Lips KR, Reaser JK, et al (2001) Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conserv Biol* 15:1213–1223.

Capítulo 2: Distribución de las poblaciones de rana toro en Uruguay, estado de la invasión y prospección de quitridiomycosis

Resumen

El seguimiento y monitoreo de los procesos de invasiones biológicas resulta fundamental para su comprensión y control. A diferencia de la mayoría de las invasiones, que son detectadas en estados avanzados, la invasión de rana toro (*Lithobates catesbeianus*) era esperada y por tanto se encontró tempranamente en Uruguay. Este capítulo presenta el seguimiento de la invasión en Uruguay desde 2005 a 2015, la modelación de su crecimiento poblacional en Aceguá y la prospección nacional de quitridiomycosis. Los datos de campo se obtuvieron mediante un muestreo anual intensivo (o bianual en algunos casos) de los sitios invadidos, tanto por pesca de larvas y avistamiento de adultos, como por registros sonoros. Desde su aparición en 2005 a la fecha, se ha detectado a la rana toro en cinco localidades: Rincón de Pando-Canelones y Paraje Bizcocho-Soriano (donde las poblaciones no persistieron al 2015), Buceo-Montevideo (con registros puntuales dentro de las instalaciones del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable), y San Carlos-Maldonado y Aceguá-Cerro Largo (donde las poblaciones se encuentran en crecimiento y expansión). Seguramente el éxito en el establecimiento haya estado asociado al tamaño del criadero del que salieron, el cual indicaría la magnitud de la presión de propágulos. Nuestro modelo predice que para 2020 tendremos unos 50 charcos ocupados por la rana toro en Aceguá. La prospección molecular e histológica demostró que todas las poblaciones se encuentran infectadas por el patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis*. Esto es preocupante por el rol de vector que tiene esta especie para dicha enfermedad. Se requiere implementar medidas urgentes de control y erradicación para evitar la expansión de *L. catesbeianus* en Uruguay. El presente monitoreo es un insumo fundamental para planificar, ejecutar y evaluar dicho manejo.

Introducción

Estado de invasión de rana toro en Uruguay

Las invasiones biológicas deben ser entendidas como un proceso poblacional que incluye diferentes etapas. Inicialmente, un número limitado de individuos que fueron removidos de su área de distribución original son transportados a un área nueva y se liberan en el medio natural. Esto sucede de forma intencional o no intencional y por diferentes vías de transporte e introducción. En el proceso de invasión, estos individuos introducidos en un medio nuevo deben lograr establecerse y conformar una población auto-sostenible, o de lo contrario se extinguirán. Esta nueva población generalmente tiene un período de establecimiento, en el cual no muestra crecimiento numérico ni expansión geográfica. Luego de esta fase de *lag*, puede seguir una fase de expansión, con un aumento en el área geográfica de su distribución y en las densidades poblacionales. Se trata de una fase de crecimiento exponencial y expansión, para finalmente alcanzar una etapa de saturación donde la población invasora deja de crecer (Arim et al. 2006; Neill y Arim 2011). Generalmente es recién durante estas etapas tardías cuando las especies exóticas suelen ser detectadas por el hombre y consideradas como especies invasoras, por sus altas densidades o por los daños que ocasionan en la biodiversidad, las funciones ecosistémicas, la economía o la salud humana y animal (Myers et al. 2000; Lockwood et al. 2006).

Conocer la historia de una invasión biológica resulta fundamental para entender los mecanismos que la promueven y favorecen, así como para monitorear su estado y generar o evaluar acciones de manejo y gestión (Simberloff et al. 2005; Simberloff 2009a). Esto es rara vez posible dado que se trata de un fenómeno inesperado, poco buscado, que adolece del problema de la interacción de los especialistas en ecología, en conservación y en taxonomía, con los tomadores de decisiones. El hecho de que la detección o atención sea mayormente tardía, ha generado un vacío de información de etapas tempranas de las invasiones biológicas a nivel global (Puth y Post 2005; Simberloff et al. 2005), el cual parece ser aún más importante en Sudamérica (Speziale et al. 2012). De hecho, en Uruguay conocemos poco del origen y las etapas tempranas de la mayoría de las invasiones de vertebrados (Pereira-Garbero et al. 2013). Aumentar dicho conocimiento nos permitiría comprender mejor los procesos de estas invasiones y podría ser un insumo para entender y modelar la situación a futuro en la región. En este

sentido, tampoco se cuenta con mapas reales de distribución de las especies exóticas invasoras, lo cual limita la investigación medioambiental, la gestión de recursos y la planificación territorial de la conservación en Uruguay. Dicha falta de información también afecta a la evaluación de la biodiversidad, el diseño y planificación de las áreas protegidas, la gestión de planes de conservación y restauración del medio ambiente, y la predicción de los efectos del cambio global sobre las comunidades y ecosistemas nativos (Aber and Ferrari 2010; Masciadri et al. 2010; Aber et al. 2012; Pereira-Garbero et al. 2013).

La situación de la invasión de la rana toro en Uruguay es particularmente diferente a las invasiones previas, porque la comunidad de investigadores herpetológicos tuvo la oportunidad de observar como este proceso ha ocurrido en la región, especialmente en el sur de Brasil (Boelter y Cechin 2007; Giovanelli et al. 2008; Cunha y Delariva 2009), y pudo anticiparse y esperar su aparición. Esto queda claramente ilustrado en los casos en los que se detectaron poblaciones muy incipientes de la especie (Laufer et al. 2008; Lombardo et al. 2016), y en el monitoreo nacional de los diferentes sitios donde funcionaron los antiguos establecimientos de ranicultura (Laufer et al. 2009). Realmente podemos describir el caso de la rana toro como una invasión esperada, lo cual resulta en una ventaja importante para la respuesta de gestión. Pero una vez encontrada, se hace necesario un importante esfuerzo de seguimiento y monitoreo de dicha invasión, para determinar la distribución de la especie y los momentos en que la misma salta a las mencionadas etapas poblacionales. Esta información resulta valiosa para la gestión y la aplicación de medidas de control y manejo (Kraus 2009; Louette et al. 2013), teniendo en cuenta que el control de la rana toro es una de las prioridades planteadas por el Comité de Especies Exóticas de la Dirección Nacional de Medio Ambiente (Aber et al. 2012).

La rana toro como vector de quitridiomycosis

Desde la aparición del quitridio y su relacionamiento con el declive global de anfibios, se ha buscado la forma en que se expande esta enfermedad. Dado que los focos fueron apareciendo en todo el planeta, se tendió a pensar en posibles especies que estuviesen actuando como vectores. En este contexto se puso atención en las especies comercializadas a nivel internacional y las especies invasoras. Los candidatos eran las especies más utilizadas para experimentación, acuicultura y mascotismo, entre las que se destacan la rana toro, *L. catesbeianus*, la rana africana

de uñas, *Xenopus laevis*, y otras especies utilizadas como mascotas. El rol del comercio internacional de anfibios para mascotas u otros usos es sin duda el menos conocido, pero la evidencia existente muestra que el quitridio ha sido transportado repetidas veces de esta forma (Fisher y Garner 2007; Schloegel et al. 2009; Schloegel et al. 2012; Peterson et al. 2013).

X. laevis resultó ser una especie portadora de la enfermedad en diferentes regiones del mundo. El uso histórico de esta especie para test de embarazos y otros estudios en laboratorio llevo a plantear la idea de que podría tratarse de una enfermedad emergente (Weldon et al. 2004). Las prospecciones en individuos de colecciones de su distribución original confirmaron que estos eran portadores de quitridio, en baja prevalencia. Aunque *X. laevis* puede haber estado relacionado a la dispersión de ciertas cepas de quitridio, la evidencia existente a la fecha no arroja conclusiones fuertes sobre esta hipótesis de la enfermedad emergente (Solís et al. 2010; Tinsley et al. 2015).

Otro candidato a haber diseminado el quitridio en el mundo es la rana toro, el anfibio invasor que tiene la mayor distribución global. Un relevamiento de Garner y colaboradores (2006) reveló que este anuro se encuentra globalmente infectado con quitridio. Cabe destacar que dicho diagnóstico incluyó datos de presencia de quitridio en granjas de rana toro en Uruguay (Mazzoni et al. 2003). Al parecer, la rana toro sería relativamente resistente a esta enfermedad, pero la portaría y por tanto actuaría como un vector (Daszak et al. 2004; Gervasi et al. 2013). Incluso se ha identificado mediante estudios genéticos a la rana toro como la responsable del ingreso de ciertas cepas a Brasil y China (Bai et al. 2010; Schloegel et al. 2010; Schloegel et al. 2012).

En Uruguay no se dispone de un claro diagnóstico de la presencia de quitridio en ranas toro. El único registro de quitridiomycosis en rana toro existente hasta la fecha refería a ejemplares cautivos en un criadero comercial en el Departamento de San José (Mazzoni et al. 2003), no habiéndose explorado aún el estado de las poblaciones asilvestradas.

Objetivos

El objetivo de este capítulo es reportar el seguimiento la invasión de rana toro desde el

año 2005 al año 2015, relevando en cada uno de los focos conocidos, el estado de la invasión, la distribución de la especie y su avance anual. Además, se plantea revisar la ocurrencia de quitridiomycosis en las poblaciones registradas, de forma de tener una idea clara de la presencia de la enfermedad en este potencial vector.

El objetivo fue generar un diagnóstico nacional detallado del estado de la invasión de rana toro al año 2015, como información básica para su control. Además para aquellos focos en sea posible, se pretende modelar la dinámica de invasión de forma de entender el estado poblacional actual y predecir su avance en el futuro cercano.

Metodología

Distribución y avance de la rana toro en Uruguay

En base a la información disponible del relevamiento nacional de criaderos de rana toro (Laufer et al. 2008; Laufer et al. 2009), se estableció un plan de seguimiento de los tres sitios donde fueron detectadas poblaciones ferales, Rincón de Pando (Canelones), Paraje Bizcocho (Soriano) y Aceguá (Cerro Largo). Además se incorporó a los muestreos, y forma parte de la presente evaluación, una serie de registros en un sitio puntual en Montevideo y un muestreo de distribución en la localidad de San Carlos (Maldonado), a partir de un reporte reciente de la presencia de rana toro (Lombardo et al. 2016).

En cada uno de los sitios donde se reportó la presencia de la rana toro, se realizaron muestreos periódicos, de frecuencia anual o bianual, que consistieron en el muestreo completo de todos los cuerpos de agua cercanos a esta población en un radio de 500 m en búsqueda de adultos, huevos o larvas. Para aquellos casos en que se detectó que la rana toro se encontraba asilvestrada, se fueron agregando círculos concéntricos de muestreo entorno al foco primario hasta llegar a encontrar al menos un radio de 1 km sin evidencia de la invasión. Estos muestreos fueron realizados con dos metodologías, el muestreo en campo durante los meses de mayor actividad (de octubre a enero)—la pesca de renacuajos mediante calderines y redes de arrastre, y el muestreo de adultos por avistamiento y por escucha de vocalizaciones nocturnas durante la época reproductiva (Sutherland 1996; Heyer et al. 2014)—y la consulta con vecinos de la zona

acerca de su conocimiento de la rana toro y los cuerpos de agua invadidos. La consulta con pobladores locales se utilizó como una importante y útil referencia, pero la confirmación de presencia se realizó siempre en base a datos de observaciones de campo. Si bien en el correr de los años y muestreos hubo diferentes esfuerzos, sabemos hoy que en todos los casos los esfuerzos realizados fueron importantes y suficientes para detectar la presencia de la especie. Esto se confirmó por el conocimiento de su historia natural, así como por la constancia en los patrones de registro entre los diferentes años. Además, como confirmación metodológica se exploró el período de vocalización durante la temporada reproductiva, para así muestrear en el horario de mayor probabilidad de detección (ANEXO 1). A partir de los registros realizados se armó la base de datos georeferenciada y se mapeo la distribución de la especie año a año para cada sitio, utilizando el software ArcMap10 del ArcGis.

Dinámica de la invasión en Aceguá

Para la localidad de Aceguá, donde se tiene el registro preciso del estado de la invasión por año desde el 2007, se analizó el crecimiento poblacional, basado en el número de cuerpos de agua invadidos como un indicador del tamaño poblacional. Para esto se utilizó el criterio de considerar invadido a todo cuerpo de agua donde se haya constatado la presencia de adultos, huevos y/o larvas, mediante las técnicas de muestreo antes detalladas. Para determinar el año de invasión se consideró únicamente los datos de muestreo de primavera. Mediante el seguimiento anual fue posible determinar la primer primavera con registros de rana toro en cada cuerpo de agua y se asignó en ese momento el año de invasión. Los primeros charcos encontrados invadidos fueron asignados al 2007, aunque probablemente fueron invadidos antes, ya que el criadero de Aceguá había dejado de funcionar por el año 2000.

A partir de los datos de presencia—ausencia por cuerpo de agua y el tiempo de invasión (de 2007 a 2015), se modeló la dinámica de avance de la población invasora de rana toro en Aceguá. Para esto se utilizó un modelo lineal generalizado GLM que permite evaluar la dinámica de crecimiento. Se utilizó año como la variable independiente y número de charcos acumulados invadidos como variable dependiente. El modelo utilizado es de la familia Gaussiana con la función de conexión logarítmica (Zuur et al. 2007). Esta modelación se realizó utilizando el software libre R.

Prospección de quitridiomycosis

A partir de ejemplares colectados en los diferentes sitios invadidos se realizó una prospección asistemática de la presencia de quitridiomycosis en ranas toro asilvestradas en Uruguay. Se realizaron diagnósticos de infección de este hongo patógeno mayormente mediante procedimientos moleculares, pero también se utilizaron métodos histológicos como forma de confirmación.

El diagnóstico molecular se realizó a partir de muestras tomadas en campo, de ejemplares vivos de rana toro, consistentes en hisopados de piel realizados con hisopos comerciales de mango de polietileno y cabeza de polivinilo (Peel Pouch Dryswab™ Fine Tip MW113, Medical Wire and Equipment). Se trabajó con cada ejemplar en forma individual, con equipos y guantes diferentes, de forma de evitar la contaminación entre las muestras. El procedimiento de hisopado fue estandarizado, frotando el hisopo 5 veces sobre la superficie ventral del cuerpo, manos y patas de cada rana adulta. En el caso de las larvas se realizó hisopado de disco oral y muchas veces se extrajo un trozo del mismo que utilizó como muestra. Estas muestras fueron conservadas en etanol a -20° C hasta el momento de su procesamiento.

En el Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria de la Sección Bioquímica de Facultad de Ciencias, se realizó la extracción de ADN de las muestras utilizando procedimientos estandarizados para un kit comercial (DNeasy Blood & Tissue Kit, ID: 69504, Qiagen). Una vez extraído el ADN de las muestras, se procedió a la identificación del quitridio, a través de procedimientos de PCR convencional y PCR en tiempo real. Para la amplificación de PCR convencional se realizó el procedimiento sugerido por Annis et al. (2004) en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 93 °C durante 10 min, seguida por 30 ciclos de 93 °C durante 45 s, luego 45 s a 61 °C y 1 min a 72 °C, con una extensión final de 10 min a 72 °C. Se utilizaron los primers Bd1a (5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3') y Bd2a (5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3'), que permiten amplificar un fragmento del gen 18S RNA de aproximadamente 300 pares de bases (pb), específico de *B. dendrobatidis*. El control positivo de las reacciones de PCR fue la cepa de *Bd* JEL 423, obtenido del laboratorio de Joyce E. Longcore (School of Biology & Ecology, University of Maine, Orono, Maine, USA). Finalmente, los productos del PCR fueron resueltos en geles de poliacrilamida 12 %, para identificar las bandas

características de unos 300 pares de bases (Annis et al. 2004).

Los análisis de PCR en tiempo real siguieron mayormente el procedimiento propuesto por Boyle y colaboradores (2004), con la única diferencia en la utilización de SYBR Green para la visualización de los productos. Dicha molécula se asocia fuertemente al ADN doble hebra, incrementando notablemente su fluorescencia. Las condiciones de amplificación fueron: 2 min a 50 ° C, 10 min a 95 ° C, seguidos de 15 s a 95 ° C y 1 min a 60 ° C durante 50 ciclos consecutivos. Se utilizaron los primers ITS1-3 Chytr (5'-CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC-3') y 5.8S Chytr (5'-AGCCAAGAGATCCGTTGTCAAA-3'), que permiten amplificar un fragmento el fragmento ITS 1 de aproximadamente 120 pb, específico de *B. dendrobatidis* (Boyle et al. 2004).

Para ambos procedimientos de PCR se utilizaron dos controles negativos, un control absoluto en el que la muestra de ADN se sustituyó por agua purificada en sistemas Milli-Q, tratada adicionalmente con radiación UV, y un control negativo con ADN extraído de tejido hepático de un anfibio (*Melanophryniscus montevidensis* de la colección privada BKT 2427). Como control adicional se secuenciaron algunas de las muestras y se hicieron diagnósticos histológicos mediante tinciones con hematoxilina y eosina (Berger et al. 1999). Las preparaciones fueron estudiadas y fotografiadas a 1000X.

Resultados

Distribución y avance de la rana toro en Uruguay

Desde el primer caso en 2005 en Rincón de Pando, se han incrementado fuertemente los registros de rana toro en Uruguay (Tabla 2.1). Identificamos hasta el momento cuatro localidades donde se han registrado ranas toro en forma asilvestrada en el medio natural y uno en el medio urbano en Montevideo (Figura 2.1). Los cuatro registros en el medio natural se ubicaron en las localidades de Rincón de Pando, Canelones en 2005 (Laufer et al. 2008), Paraje Bizcocho, Soriano y Aceguá, Cerro Largo en 2007 (Laufer et al. 2009) y San Carlos, Maldonado en 2015 (Lombardo et al. 2016). El registro de Montevideo, que no ha sido reportado aún en la literatura,

se trata de unos pocos especímenes en una pileta artificial, dentro del predio del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) del Ministerio de Educación y Cultura.

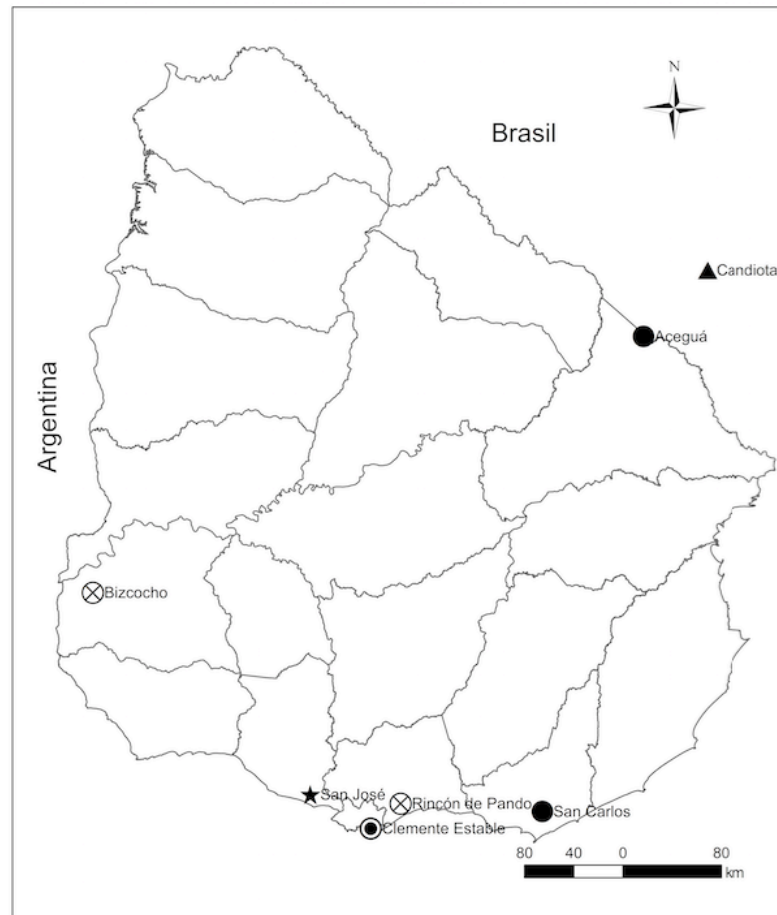


Figura 2.1. Sitios con presencia de rana toro *Lithobates catesbeianus* asilvestrada en Uruguay (círculos). Los círculos negros indican las poblaciones con dato de persistencia a 2015 (Aceguá y San Carlos), los círculos con cruces indican poblaciones sobre las que no hay registros actuales (Rincón de Pando y Paraje Bizcocho) y el círculo con punto negro indica registros puntuales en Montevideo. Con una estrella se indica el punto donde se ubicaba el criadero de ranas toro (San José) donde se identificó por primera vez la presencia de quitridio en Uruguay (Mazzoni et al. 2003). Con un triángulo se indica el registro existente más próximo a Uruguay, en Candiota, Rio Grande do Sul, Brasil (Both et al. 2011).

Tabla 2.1. Registros de diez años de seguimiento de la invasión de rana toro *Lithobates catesbeianus* en Uruguay, desde 2005 hasta 2015. En la tabla se presenta la ubicación de los cuerpos de agua con presencia de rana toro, informando ubicación (localidad, Departamento, coordenadas), la fuente de información y el año de detección.

Localidad	Departamento	Latitud	Longitud	Fuente	Año
IIBCE	Montevideo	34°53'14,4"S	56°08'33,3"O	Com. Pers.: L. Ziegler 2014, D. Arrieta 2014, N. Gobel 2015	2014
Paraje Bizcocho	Soriano	33°27'54,2"S	58°10'08,5"O	Laufer et al. 2009	2007
Paraje Bizcocho	Soriano	33°26'43,2"S	58°09'09,3"O	Laufer et al. 2009	2007
Paraje Bizcocho	Soriano	33°27'03,9"S	58°09'00,5"O	Laufer et al. 2009	2007
Rincón de Pando	Canelones	34°44'20,2"S	55°55'29,6"O	Laufer et al. 2008	2005
Rincón de Pando	Canelones	34°44'23,7"S	55°55'31,0"O	Laufer et al. 2008	2005
Aceguá	Cerro Largo	31°52'50,7"S	54°09'48,2"O	Laufer et al. 2009	2007
Aceguá	Cerro Largo	31°53'45,3"S	54°08'59,7"O	Presente estudio	2007
Aceguá	Cerro Largo	31°53'47,8"S	54°09'06,8"O	Laufer et al. 2009	2007
Aceguá	Cerro Largo	31°53'59,4"S	54°09'02,1"O	Laufer et al. 2009	2007
Aceguá	Cerro Largo	31°53'34,8"S	54°09'09,9"O	Laufer et al. 2009	2007
Aceguá	Cerro Largo	31°56'36,0"S	54°09'09,6"O	Laufer et al. 2009	2007
Aceguá	Cerro Largo	31°53'36,8"S	54°09'06,3"O	Laufer et al. 2009	2007
Aceguá	Cerro Largo	31°53'34,3"S	54°09'06,7"O	Laufer et al. 2009	2007
Aceguá	Cerro Largo	31°53'53,8"S	54°09'08,1"O	Presente estudio	2012
Aceguá	Cerro Largo	31°53'59,3"S	54°09'14,4"O	Presente estudio	2012
Aceguá	Cerro Largo	31°53'53,6"S	54°08'58,0"O	Presente estudio	2012
Aceguá	Cerro Largo	31°53'19,8"S	54°09'46,9"O	Presente estudio	2012

Aceguá	Cerro Largo	31°52'53,1"S	54°10'24,7"O	Presente estudio	2013
Aceguá	Cerro Largo	31°52'35,2"S	54°09'57,9"O	Presente estudio	2013
Aceguá	Cerro Largo	31°52'52,3"S	54°10'13,1"O	Presente estudio	2014
Aceguá	Cerro Largo	31°53'38,0"S	54°09'32,2"O	Presente estudio	2014
Aceguá	Cerro Largo	31°52'18,4"S	54°09'54,8"O	Presente estudio	2014
Aceguá	Cerro Largo	31°53'15,3"S	54°09'53,7"O	Presente estudio	2014
Aceguá	Cerro Largo	31°53'05,1"S	54°10'01,8"O	Presente estudio	2015
Aceguá	Cerro Largo	31°52'37,6"S	54°09'55,4"O	Presente estudio	2015
Aceguá	Cerro Largo	31°52'34,3"S	54°10'13,6"O	Presente estudio	2015
Aceguá	Cerro Largo	31°52'39,8"S	54°10'06,4"O	Presente estudio	2015
San Carlos	Maldonado	34°47'03,9"S	54°53'37,6"O	Presente estudio	2015
San Carlos	Maldonado	34°46'51,5"S	54°53'19,5"O	Presente estudio	2015
San Carlos	Maldonado	34°47'11,1"S	54°53'25,3"O	Presente estudio	2015
San Carlos	Maldonado	34°47'18,5"S	54°53'18,8"O	Presente estudio	2015
San Carlos	Maldonado	34°47'16,7"S	54°53'13,8"O	Presente estudio	2015
San Carlos	Maldonado	34°47'19,5"S	54°53'01,8"O	Presente estudio	2015

A la fecha de esta tesis, las únicas dos poblaciones que han persistido y se están expandiendo son las de Aceguá y San Carlos. Según lo constatado por conversaciones con los habitantes locales, la población de Rincón de Pando habría ocupado en años previos una distribución algo mayor a lo que pudimos observar en nuestro registro inicial de 2005. En visitas en años posteriores, 2007, 2009, 2010, 2011, 2012 y 2015 no pudimos observar ninguna evidencia de presencia de la especie, por lo que tenemos más de diez años sin registro de una población establecida de rana toro (Figura 2.2). Una situación similar es la de Paraje Bizcocho, donde la población se detectó en 2007 y 2008, luego de más de 6 años de cerrado el criadero, pero en muestreos posteriores en 2009, 2011 y 2015 no se pudo identificar ninguna evidencia de la presencia de la especie. Esta localidad se ubica una zona de fuerte avance de la frontera agrícola, cercana al Arroyo Bizcocho y al Río San Salvador. Los registros realizados fueron en cuerpos de agua cercanos al arroyo y en zonas de inundables. Cabe recalcar que este caso la zona invadida fue muy alterada por el avance de la agricultura intensiva desde el año 2008 (Figura 2.3). De hecho los tajamares donde se detectó la presencia de rana toro, fueron desarmados por nivelación de terreno para cultivo intensivo de soja y maíz en los años posteriores.

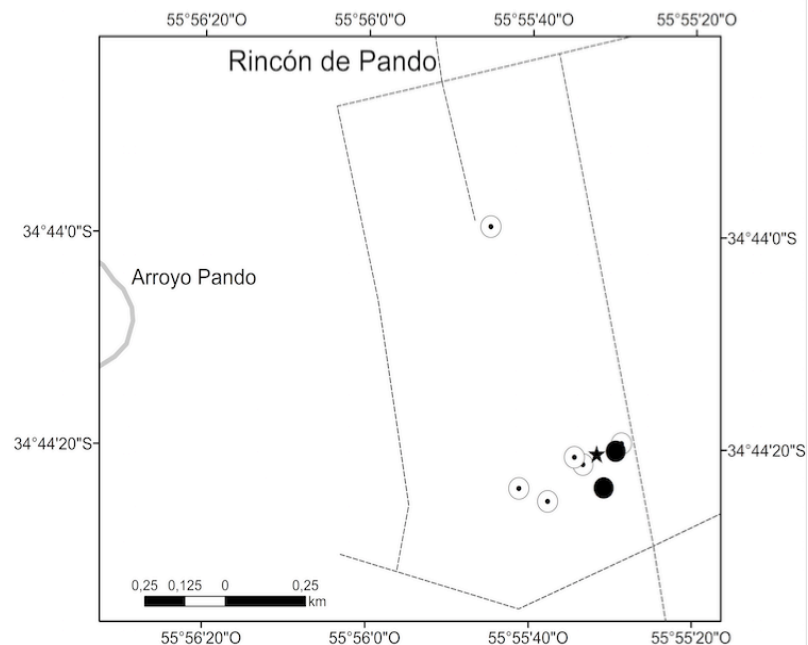


Figura 2.2. Estado de invasión de rana toro *Lithobates catesbeianus* en la localidad de Rincón de Pando, Canelones. La estrella marca el sitio donde se localizó el criadero y los círculos los cuerpos de agua lénticos muestreados. Los círculos negros indican lugares donde se detectó la presencia de individuos de *L. catesbeianus* en 2005 (Laufer et al. 2008). Desde 2006 a 2015 no se volvió a registrar la ocurrencia de esta especie.

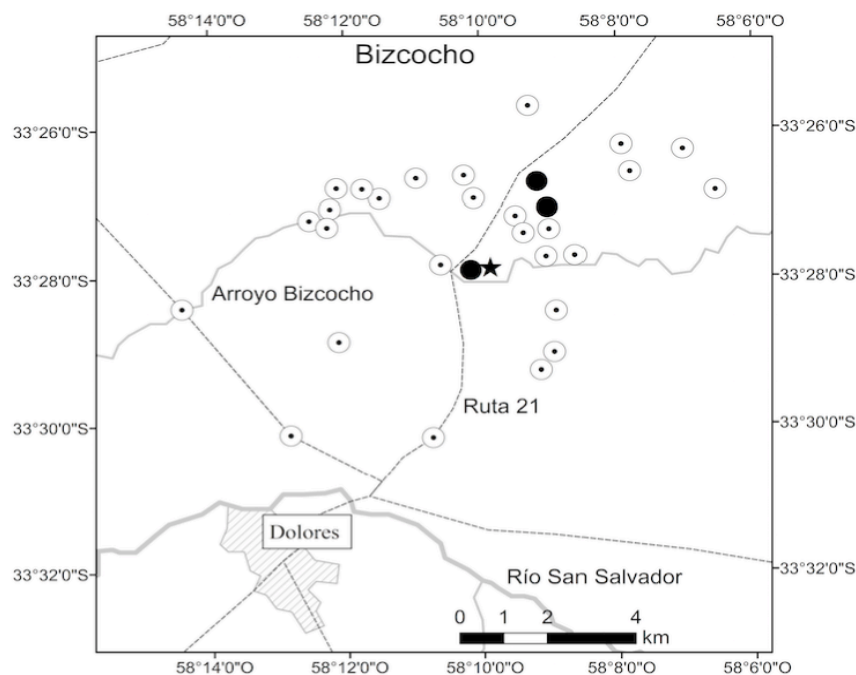


Figura 2.3. Estado de invasión de rana toro *Lithobates catesbaianus* en la localidad de Paraje Bizcocho, Soriano. La estrella marca el sitio donde se localizó el criadero y los círculos los cuerpos de agua lénticos muestreados. Los círculos negros fue donde se detecto la presencia de individuos de *L. catesbeianus* en 2007 (Laufer et al. 2009). Desde 2009 a 2015 no se volvió a registrar la ocurrencia de esta especie.

Tal como sucedió en la mayor parte de los sitios donde funcionaron antiguamente criaderos de rana toro, en los relevamientos de 2007 no se detectó la presencia de rana toro en la localidad de San Carlos, Maldonado (Laufer et al. 2009). Sin embargo, la información que pudimos recabar en esa instancia de la población local nos indicaba que era un sitio con alta probabilidad de ser invadido. Pudimos averiguar por testimonios que la antigua granja de rana toro que allí funcionó liberaba deliberadamente individuos y que hasta unos años antes de nuestra visita era común ver ejemplares libres en la zona.

Recientemente, Lombardo y colaboradores (2016) reportaron la presencia de un charco invadido, por lo que este sitio se incluyó en nuestro monitoreo. Durante el muestreo de campo en

2015 pudimos constatar que se trataba de una población de mayor tamaño, ocupando seis cuerpos de agua. Los cuerpos invadidos se encuentran dentro de pequeños campos ganaderos y chacras de recreación cercanos a la ruta y al Arroyo San Carlos (Figura 2.4).

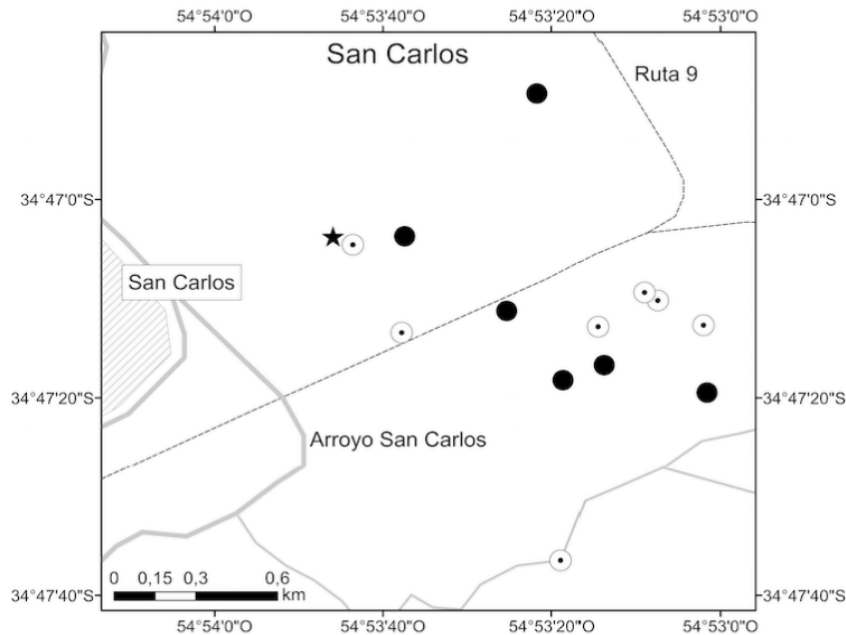


Figura 2.4. Estado de invasión de rana toro *Lithobates catesbeianus* en la localidad de San Carlos, Maldonado. La estrella marca el sitio donde se localizó el criadero y los círculos los cuerpos de agua lénticos muestreados. En los círculos negros fue donde se detectó la presencia de individuos de *L. catesbeianus* en 2015.

Una situación bien diferente sucedió con la población de Aceguá, la cual pudimos monitorear anualmente desde el año 2007 a la fecha (Figura 2.5). Si bien esta es una zona de serranía, con un paisaje relativamente bien conservado, los cuerpos invadidos son mayormente reservorios de agua artificiales. Desde su detección hasta el 2011 la población se mantuvo restringida a ocho cuerpos de agua. Cuatro de estos son sistemas de importante tamaño, compuestos por pequeñas lagunas construidas artificialmente para el sistema de decantación de un frigorífico que al menos desde 2005 se encuentra fuera de actividad. En el año 2012 empezamos a detectar nuevos cuerpos de agua con presencia de rana toro. Este fenómeno de incremento de la distribución se mantiene constante hasta la fecha, ocupando actualmente 23 cuerpos de agua (Figura 2.5). Esta expansión está ocurriendo en el sentido contrario a la

pendiente del terreno, avanzando hacia el pueblo de Aceguá, incluyendo cuerpos de agua y reservorios localizados en la zona periférica. Resulta relevante considerar que esta población invasora se encuentra relativamente cerca de un registro de *L. catesbeianus* realizado en Rio Grande do Sul, Brasil por Both y colaboradores (2011) en la localidad de Candiota (Figura 2.1).

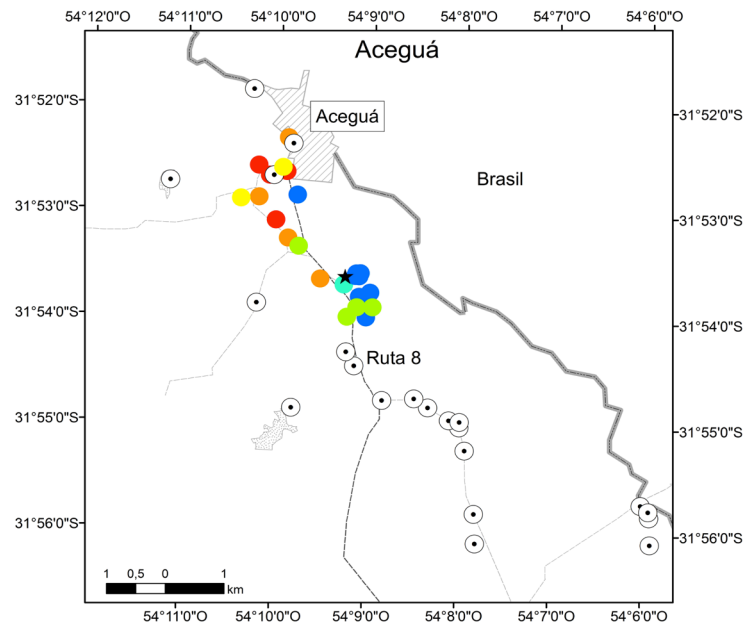


Figura 2.5. Estado de invasión de rana toro *Lithobates catesbeianus* en la localidad de Aceguá, Cerro Largo. La estrella marca el sitio donde se localizó el criadero y los círculos los cuerpos de agua lénticos muestreados. En los puntos indicados con círculos azules fue donde se detectó la presencia de individuos de *L. catesbeianus* en 2007 (Laufer et al. 2009), los círculos celestes son los correspondientes a los registros de 2011, verde 2012, amarillo 2013, naranja 2014 y rojo 2015.

Dinámica de la invasión en Aceguá

Analizando la dinámica de esta invasión en el tiempo, encontramos que el tamaño poblacional (representado por el número de charcos invadidos) responde en forma significativa a un modelo exponencial (Devianza explicada 93,87%, $P < 0,001$, g.l.= 1). Pudimos observar que los primeros años de muestreo, desde 2007 a 2011, la población se mantuvo con un tamaño constante y que desde 2012 está creciendo con una tasa exponencial. El modelo predice que la población se seguirá expandiendo, alcanzando en 2020 aproximadamente 50 cuerpos de agua (Figura 2.6).

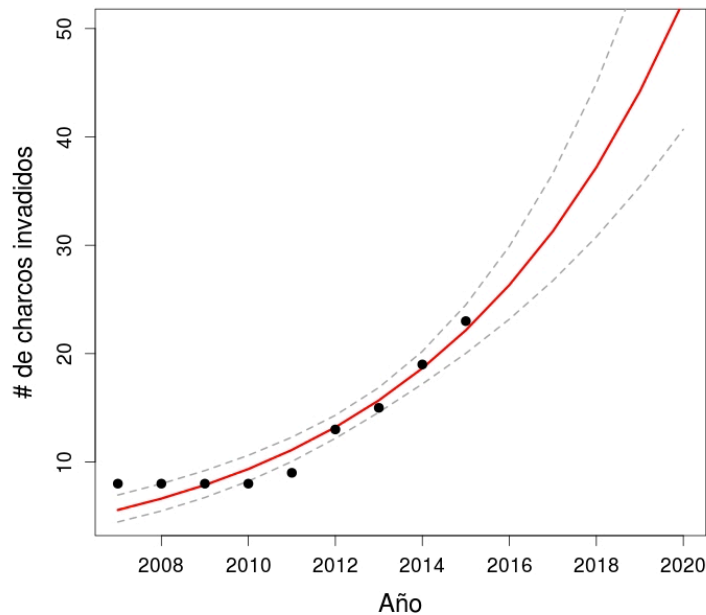


Figura 2.6. Dinámica de la población de la rana toro *Lithobates catesbeianus* en Aceguá, observada a través del número de cuerpos de agua invadidos. Los puntos marcan el número de cuerpos de agua en que se registró la presencia de rana toro en cada año. La línea roja los valores esperados por el modelo exponencial de mejor ajuste y el punteado gris los intervalos de confianza a 95%. Se presenta la proyección estimada por el modelo hasta el año 2020.

Prospección de quitridiomicosis

Se constató la presencia de individuos infectados con quitridiomicosis en todas las poblaciones evaluadas, salvo la de Montevideo de donde no se tienen muestras para analizar. Dichas muestras fueron positivas por análisis histológicos y moleculares (Figuras 2.7 y 2.8). Se detectaron claramente los zoosporangios característicos en piel de ranas adultas (Figura 2.7 C y D), mediante el PCR con los primers Bd1 y Bd2 se logró amplificar la secuencia de 300 pares de base que indica un diagnóstico positivo (Figura 2.8). Mediante el PCR en tiempo real también se obtuvo resultados positivos para la totalidad de las larvas analizadas como producto de los primers ITS1-3 Chytr y 5.8S Chytr. Por tanto todas las poblaciones uruguayas de rana toro se encuentran infectadas con quitridiomicosis.

Tabla 2.2. Resultados de los análisis exploratorios para presencia de quitridiomycosis, producida por *B. dendrobatidis* en individuos de las poblaciones asilvestradas de *L. catesbeianus* en Uruguay. Para cada lote de muestras se brinda el dato de la localidad de origen, el año de muestreo, el número de individuos analizados, su estadio, la técnica de detección y el número de positivos encontrados. El asterisco indica las muestras analizadas en conjunto con Claudio Borteiro en el contexto de su tesis doctoral (datos sin publicar).

Sitio	Año	N individuos	Estadio	Técnica	N positivos
Rincón de Pando	2005	1	Larva	Histológica	1*
Bizcocho	2007	1	Larva	Histológica	1*
Aceguá	2007	2	Larva	Histológica	2*
Aceguá	2012	10	Adultos	PCR convencional	1
San Carlos	2015	10	Larva	PCR tiempo real	10

Figura 2.7. Signos de infección por *B. dendrobatidis* en larvas de rana toro de Rincón de Pando, Departamento, Canelones (A en macro y C en micro) y de Bizcocho, Soriano (B en macro y D en micro). Las imágenes de la derecha muestran la pérdida de queratina características (barra de 2 mm), mientras que los cortes histológicos teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina muestran claramente con flechas los esporangios (barra de 20 μ m). En el E se muestra un ejemplar adulto de los que fueron hisopados para los análisis de PCR.

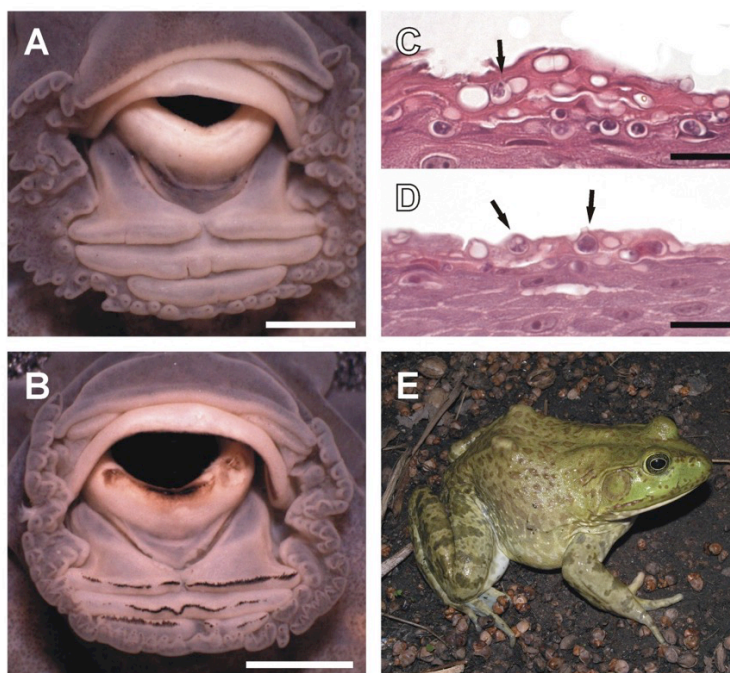
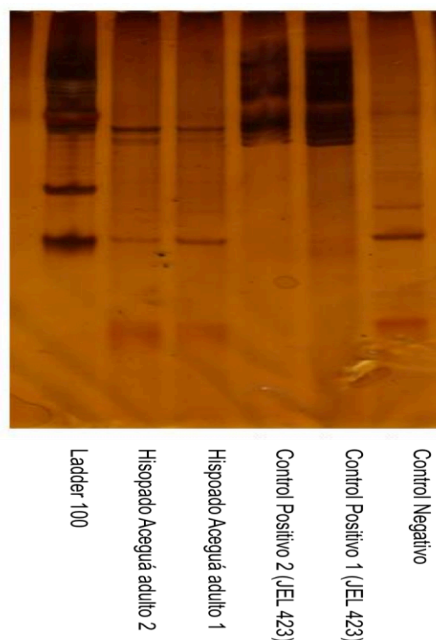


Figura 2.8. Resultado de corrida electroforética en geles de poliacrilamida de amplificaciones por PCR convencional de los primers Bd1 y Bd2, a partir muestras de hisopados de piel de rana toro de Aceguá, Cerro Largo. De izquierda a derecha se observa: el marcador de peso molecular Ladder 100 que marca los pesos de bandas en el equivalente de 100, 200 y 300 pares de bases, dos hisopados de rana toro que dan positivos (con la doble banda característica), dos muestras control de quitridio de cultivo y un control negativo de agua sin ADN.



Discusión

El Plan Estratégico para la Diversidad Biológica 2011-2020 del Convenio sobre la Diversidad Biológica, del cual Uruguay es signatario, consiste en un marco de acción global de diez años mediante el cual los países se comprometen a proteger la diversidad biológica y mejorar los beneficios que esta proporciona para el bienestar de las personas. Este plan tiene 20 metas generales, conocidas como las Metas de Aichi. Una de ellas refiere específicamente a las especies invasoras y propone que “para 2020, se habrán identificado y priorizado las especies exóticas invasoras y vías de introducción, se habrán controlado o erradicado las especies prioritarias, y se habrán establecido medidas para gestionar las vías de introducción a fin de evitar su introducción y establecimiento” (Leadley et al. 2014). En relación a esto, está ocurriendo una valorización de los datos espaciales y un llamado a la implementación y el incremento de los monitoreos a nivel internacional (Schmeller et al. 2015; Latombe et al. 2016). Si bien Uruguay pretende tener esto sistematizado en los próximos años (MVOTMA 2016), se enfrenta a esta situación con una escasa y fragmentada información del estado de sus invasiones biológicas (Masciadri et al. 2010; Pereira-Garbero et al. 2013). En este marco, la presente es la evaluación más detallada hasta el momento del proceso de invasión de una especie exótica en Uruguay y de la rana toro en la región Neotropical. Este tipo de información a largo plazo, con

diez años de seguimiento no es común en la región y tiene un importante valor tanto para estudios como para el manejo de las especies exóticas invasoras (Arroyo 2011; Speziale et al. 2012; Ballari et al. 2016). Los datos obtenidos en el presente estudio ya se están utilizando como indicadores ambientales de biodiversidad y ecosistemas para la Dirección Nacional de Medio Ambiente (Dinama) y están disponibles en su página web como un indicador numérico de especies invasoras (http://www.dinama.gub.uy/indicadores_ambientales/ficha/especie-invasora-rana-toro/). Contamos en Uruguay y la región con una información tan escasa y fragmentada sobre las especies invasoras que resulta muy difícil tener un diagnóstico claro de los principales problemas, saber cómo y dónde atacarlos, o incluso tener un panorama claro a futuro. Estudios como el presente deberían realizarse en forma urgente, al menos para las especies que ya son conocidas en otras regiones por sus efectos negativos (Kulhanek et al. 2011).

La invasión de la rana toro en Uruguay ha ocurrido con la aparición inicial de varios focos, asociados mayormente a las instalaciones de manejo de esta especie con fines de acuicultura. Seguramente por ignorancia o negligencia la liberación de ejemplares de rana toro haya sido un factor común en la mayor parte de los sitios donde funcionaban las granjas. De las 19 granjas que tenemos ubicadas, se lograron identificar cuatro focos con poblaciones ferales de rana toro en el medio natural (Figura 2.1, Tabla 2.1), pero no todos esos focos lograron establecerse e invadir. Entender por qué no lograron establecerse dichas poblaciones podría brindar importante información para su control. El marco teórico de invasiones nos puede ayudar a interpretar estas diferencias, especialmente la hipótesis de los filtros ambientales y la de la presión de propágulos.

La hipótesis de filtros ambientales consiste en la antigua idea de que el invasor tendrá éxito en la medida que se adapte a las condiciones y pueda superar una serie de barreras locales. Sería una fracción menor de las invasiones las que lograrían establecerse por no atravesar dichos filtros (Darwin 1859; Weiher and Keddy 1995; Melbourne et al. 2007; Procheş et al. 2008). De acuerdo a esta hipótesis resulta lógico que, de las múltiples poblaciones iniciales que permanecieron de las liberaciones de los criaderos, solo unas pocas persistan hasta el 2015. De hecho, seguramente hayan existido más poblaciones de las que hemos conocido hasta el momento por un tiempo limitado. Considerando que el territorio uruguayo es mayormente adecuado para la rana toro (Ficetola et al. 2007; Giovanelli et al. 2008; Nori et al. 2011b),

podemos suponer que la presión de propágulos, entendida como las repetidas introducciones y de buena calidad de ejemplares, haya sido determinante para el establecimiento.

La hipótesis de la presión de propágulos propone que una alta oferta en tamaño y frecuencia de introducción de propágulos de un organismo exótico, incrementan la probabilidad de éxito de la invasión debido a la alta diversidad genética, el reforzamiento y renovación continua, y a la mayor probabilidad de introducción en un microambiente favorable (Lonsdale 1999; Lockwood et al. 2005; Simberloff 2009b). Es más, la evidencia empírica indica que la presión de propágulos puede superar otras limitantes al establecimiento (Holle y Simberloff 2005; Hollebone y Hay 2007). La escala y tiempo de funcionamiento de la granja de ranas en cada sitio puede ser un buen indicador de esta presión de propágulos (Liu y Li 2009). Muchas de las granjas que funcionaron en Uruguay fueron de pequeña escala, y tuvieron un bajo éxito productivo y poca duración en funcionamiento. Sin embargo, por lo que pudimos averiguar en conversaciones con público relacionado al desarrollo de la ranicultura, las granjas de Aceguá y de San Carlos se encontraban entre las más grandes y más productivas, habiéndose mantenido en operación por un mayor período con un importante número de animales. Este no fue el caso para la mayoría de las granjas, entre las que se encontraban la de Rincón de Pando y Bizcocho. Esto podría ser un buen indicador de diferencias en la presión de propágulos y por tanto la causa de las diferencias en el éxito de establecimiento.

De todas formas debemos tener precaución a la hora de evaluar los riesgos a futuro. Las poblaciones que no han sido encontradas en los últimos años (Rincón de Pando y Bizcocho), así como el resto de los sitios donde funcionaron los criaderos, siguen presentando un riesgo potencial de invasión de rana toro y deben ser monitoreadas en el tiempo. Se ha propuesto que las oscilaciones poblacionales, e incluso pequeños eventos de dispersión local puede provocar una variación en la probabilidad de detección de las especies invasoras en etapa de establecimiento (Kean y Barlow 2000; Lockwood et al. 2006). Esto debe haber sido el caso de la población de San Carlos, que no fue encontrada en 2007 junto con las de Bizcocho y Aceguá, habiéndose encontrado posteriormente en 2015, en fase de expansión. Por esto se debe implementar un registro adecuado de todos los sitios donde existieron criaderos de rana toro (habilitados o irregulares) y seguir en el tiempo la posible aparición de nuevas poblaciones.

Un aspecto no menor es la responsabilidad de los investigadores que utilizan organismos modelos exóticos que son potencialmente invasores. El caso de la presencia de la rana toro en las instalaciones de un instituto de investigaciones en Montevideo nos alerta al respecto. Debemos considerar el antecedente regional de la invasión de *Xenopus* en Chile, asociada a malas prácticas de un instituto de investigaciones. Esta especie de anuro resulta hoy una fuerte amenaza para la biodiversidad de Chile (Lobos y Measey 2002).

En estos momentos la mayor atención debería darse a las poblaciones que fueron capaces de persistir y establecerse. Las poblaciones de Aceguá y San Carlos son las que deberían llevar una mayor alerta, por encontrarse en etapa de expansión y dispersión. Para el caso Aceguá, nuestras observaciones muestran claramente que *L. catesbeianus* se encuentra en la fase de crecimiento exponencial, pudiendo llegar a 50 charcos invadidos en los próximos 5 años (Figura 2.6). En estos casos aún nos encontramos a tiempo de lograr una gestión adecuada que lleve a una erradicación, pero no debemos olvidar que la dificultad de el control también crece exponencialmente año a año. Si bien las autoridades nacionales ya han reconocido la necesidad de actuar urgentemente en este caso (Aber et al. 2012), no han realizado hasta la fecha ninguna acción de gestión en el terreno. Existen experiencias previas en las que encontrando poblaciones de rana toro en etapas tempranas, con un adecuado esfuerzo y seguimiento, se logró la erradicación (revisado por Kraus 2009). En todos los casos se implementaron múltiples formas de colecta, el secado de cuerpos de agua y el aislamiento de la dispersión. Dichas medidas deberían ser tomadas en forma urgente en Uruguay, evitando que se alcance una dispersión como la esperada para Aceguá, afectando áreas prioritarias e ingresando en paisajes que dificulten el control. Dado que las invasiones están ocurriendo en predios privados, se requiere de la participación de autoridades nacionales y departamentales. Los datos georreferenciados que presentamos en esta tesis facilitarían mucho el trabajo de manejo en el terreno.

La situación en los diferentes focos en Uruguay es algo similar a lo que está ocurriendo en muchos sitios en Argentina (Akmentins y Cardozo 2010; Nori et al. 2011a). Al parecer el mayor frente de invasión en la región sería el de Brasil, país que inició mucho mas temprano la explotación de rana toro en granjas (Giovanelli et al. 2008; Cunha y Delariva 2009; Both et al. 2011). De todas formas, la ocurrencia de varios focos en la región y el avance desde Brasil, no deben ser argumentos para dejar de controlar las poblaciones invasoras en Uruguay. Este control

lograría postergar la llegada de la especie y posibilitaría el formular medidas de contención. Además, debemos considerar que no es deseable el encuentro de dos poblaciones, ya que esto reforzaría la invasión (Arim et al. 2006; Lockwood et al. 2006). Finalmente, se debe tener en cuenta que es posible que en los próximos años haya herramientas nuevas para el manejo de esta invasión, como resultado de las investigaciones en curso en diferentes países sobre medidas de control, que podrían ser utilizadas a futuro en nuestro país (e.g. Govindarajulu et al. 2005; Louette et al. 2013; Roy et al. 2015; Ward et al. 2015).

Un agravante a los efectos de la rana toro es su potencial rol como vector de la quitridiomycosis. Este aspecto debería evaluarse y estudiarse en las comunidades invadidas. Al respecto se realizaron evaluaciones iniciales de esta enfermedad en la comunidad nativa de Aceguá, donde está presente la rana toro. Los resultados de dicha evaluación se presentan en los capítulos 4 y 5 de la presente tesis.

Uruguay se ha comprometido a nivel internacional en controlar y manejar a las invasiones biológicas (Balmford et al. 2005; Leadley et al. 2014; MVOTMA 2016). Esto constituye un importante desafío, ya que las múltiples vías de introducción y el enorme volumen de productos comercializados hacen la interceptación de todas las especies exóticas potencialmente invasoras poco realista. La detección temprana y el control deben ser un componente fundamental de la gestión de las invasiones biológicas, reduciendo significativamente el costo económico y ambiental (MVOTMA 2016). En este contexto, la situación de la rana toro brinda una oportunidad única, debido a que además de estar en una etapa relativamente temprana de invasión, se cuenta con el seguimiento y mapeo detallado de las poblaciones invasoras (Crooks et al. 1999; Hulme 2006; Mehta et al. 2007; Pyšek y Richardson 2010). El tiempo mostrará si a nivel del Estado se explotó esta oportunidad de generar una a respuesta rápida asociada a la detección precoz.

Referencias

- Aber A, Ferrari G (2010) Lineamientos para la gestión nacional de especies exóticas invasoras. UNESCO
- Aber A, Ferrari G, Porcile JF, et al (2012) Identificación de prioridades para la gestión nacional de las especies exóticas invasoras. UNESCO
- Akmentins MS, Cardozo DE (2010) American bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) invasion in Argentina. Biol Invasions 12:735–737.
- Annis SL, Dastoor FP, Ziel H, et al (2004) A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. J Wildl Dis 40:420–428.
- Arim M, Abades SR, Neill PE, et al (2006) Spread dynamics of invasive species. Proc Natl Acad Sci USA 103:374–378.
- Arroyo MTK (2011) Invasiones biológicas en América Latina y el Caribe: tendencias en investigación para la conservación. In: Conservación biológica: perspectivas desde América Latina, Simonetti, J. & Dirzo, R. Editorial Universitaria, Santiago de Chile.
- Bai C, Garner T, Li Y (2010) First Evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in China: Discovery of Chytridiomycosis in Introduced American Bullfrogs and Native Amphibians in the Yunnan Province, China. EcoHealth 7:127–134.
- Ballari SA, Anderson CB, Valenzuela AEJ (2016) Understanding trends in biological invasions by introduced mammals in southern South America: a review of research and management: Invasive mammals in southern South America. Mammal Rev 46:229–240.
- Balmford A, Bennun L, Ten Brink B, et al (2005) The convention on biological diversity's 2010 target.
- Berger L, Speare R, Kent A, others (1999) Diagnosis of chytridiomycosis in amphibians by histologic examination. Zool Print J 15:184–190.
- Boelter RA, Cechin SZ (2007) Impact of the Bullfrog diet (*Lithobates catesbeianus* - Anura, Ranidae) on native fauna: case study from the region of Agudo-RS-Brazil. Nat Conserv 5:115–123.
- Both C, Lingnau R, Santos-Jr A, et al (2011) Widespread Occurrence of the American Bullfrog, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802)(Anura: Ranidae), in Brazil. South Am J Herpetol 6:127–134.
- Boyle DG, Boyle DB, Olsen V, et al (2004) Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. Dis Aquat Organ 60:141–148.
- Crooks JA, Soulé ME, Sandlund OT (1999) Lag times in population explosions of invasive species: causes and implications. In: Invasive Species and Biodiversity Management. Kluwer Academic Publisher, Netherlands, 103–125.
- Cunha ER, Delariva RL (2009) Introdução da Rã-Touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802): Uma Revisão. SaBios 4:34-46
- Darwin C (1859) On the origin of the species by natural selection.
- Daszak P, Strieby A, Cunningham AA, et al (2004) Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. Herpetol J 14:201–207.
- Ficetola GF, Thuiller W, Miaud C (2007) Prediction and validation of the potential global distribution of a problematic alien invasive species—the American bullfrog. Divers Distrib 13:476–485.
- Fisher MC, Garner TW (2007) The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. Fungal Biol Rev 21:2–9.
- Garner TW, Perkins MW, Govindarajulu P, et al (2006) The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally

- infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. Biol Lett 2:455–459.
- Gervasi SS, Urbina J, Hua J, et al (2013) Experimental evidence for American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) susceptibility to chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). EcoHealth 10:166–171.
- Giovanelli J, Haddad C, Alexandrino J (2008) Predicting the potential distribution of the alien invasive American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in Brazil. Biol Invasions 10:585–590.
- Govindarajulu P, Altwegg R, Anholt BR (2005) Matrix model investigation of invasive species control: bullfrogs on Vancouver Island. Ecol Appl 15:2161–2170.
- Heyer R, Donnelly MA, Foster M, McDiarmid R (2014) Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians. Smithsonian Institution
- Holle BV, Simberloff D (2005) Ecological resistance to biological invasion overwhelmed by propagule pressure. Ecology 86:3212–3218.
- Hollebone AL, Hay ME (2007) Propagule pressure of an invasive crab overwhelms native biotic resistance. Mar Ecol Prog Ser 342:191–196.
- Hulme PE (2006) Beyond control: wider implications for the management of biological invasions. J Appl Ecol 43:835–847.
- Kean JM, Barlow ND (2000) Effects of dispersal on local population increase. Ecol Lett 3:479–482.
- Kraus F (2009) Alien reptiles and amphibians: a scientific compendium and analysis. Springer Verlag
- Kulhanek SA, Ricciardi A, Leung B (2011) Is invasion history a useful tool for predicting the impacts of the world's worst aquatic invasive species? Ecol Appl 21:189–202.
- Latombe G, Pyšek P, Jeschke JM, et al (2016) A vision for global monitoring of biological invasions. Biol Conserv. *In Press*.
- Laufer G, Arim M, Loureiro M (2009) Informe de dos nuevas poblaciones invasoras de Rana Toro en Uruguay. Montevideo
- Laufer G, Canavero A, Núñez D, Maneyro R (2008) Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) invasion in Uruguay. Biol Invasions 10:1183–1189.
- Leadley PW, Krug CB, Alkemade R, et al (2014) Progress towards the Aichi Biodiversity Targets: an assessment of biodiversity trends, policy scenarios and key actions. Secretariat of the Convention on Biological Diversity
- Liu X, Li Y (2009) Aquaculture Enclosures Relate to the Establishment of Feral Populations of Introduced Species. PLOS ONE 4:e6199.
- Lobos G, Measey GJ (2002) Invasive populations of *Xenopus laevis* (Daudin) in Chile. Herpetol J 12:163–168.
- Lockwood J, Hoopes M, Marchetti M (2006) Invasion Ecology, 1st edn. Wiley-Blackwell
- Lockwood JL, Cassey P, Blackburn T (2005) The role of propagule pressure in explaining species invasions. Trends Ecol Evol 20:223–228.
- Lombardo I, Elgue E, Villamil J, Maneyro R (2016) Registro de una población asilvestrada de rana toro (*Lithobates catesbeianus*) (Amphibia: Anura: Ranidae) en el Departamento de Maldonado, Uruguay. Bol. Soc. Zool. Uruguay 25:61–65.
- Lonsdale WM (1999) Global patterns of plant invasions and the concept of invasibility. Ecology 80:1522–1536.
- Louette G, Devisscher S, Adriaens T (2013) Control of invasive American bullfrog *Lithobates catesbeianus* in small shallow water bodies. Eur J Wildl Res 59:105–114.
- Masciadri S, Brugnoli E, Muniz P (2010) InBUy database of Invasive and Alien Species (IAS) in Uruguay: a useful tool to confront this threat to biodiversity. Biota Neotropica 10:205–213.
- Mazzoni R, Cunningham AA, Daszak P, et al (2003) Emerging Pathogen in Wild Amphibians and Frogs (*Rana catesbeiana*) Farmed for

- International Trade. *Emerg Infect Dis* 9:995–998.
- Mehta SV, Haight RG, Homans FR, et al (2007) Optimal detection and control strategies for invasive species management. *Ecol Econ* 61:237–245.
- Melbourne BA, Cornell HV, Davies KF, et al (2007) Invasion in a heterogeneous world: resistance, coexistence or hostile takeover? *Ecol Lett* 10:77–94.
- MVOTMA (2016) Estrategia Nacional para la Conservación y Uso Sostenible de la Diversidad Biológica del Uruguay 2016 - 2020. Montevideo
- Myers JH, Simberloff D, Kuris AM, Carey JR (2000) Eradication revisited: dealing with exotic species. *Trends Ecol Evol* 15:316–320.
- Neill P, Arim M (2011) Human Health Link to Invasive Species. 116–123.
- Nori J, Akmentins M, Ghirardi R, et al (2011a) American bullfrog invasion in Argentina: where should we take urgent measures? *Biodivers Conserv* 20:1125–1132.
- Nori J, Urbina-Cardona JN, Loyola RD, et al (2011b) Climate change and American Bullfrog invasion: what could we expect in South America? *PloS One* 6:e25718.
- Pereira-Garbero R, Barreneche JM, Laufer G, et al (2013) Mamíferos invasores en Uruguay, historia, perspectivas y consecuencias. *Rev Chil Hist Nat* 86:403–421.
- Peterson AC, Richgels KL, Johnson PT, McKenzie VJ (2013) Investigating the dispersal routes used by an invasive amphibian, *Lithobates catesbeianus*, in human-dominated landscapes. *Biol Invasions* 15:2179–2191.
- Procheş Ş, Wilson JR, Richardson DM, Rejmánek M (2008) Searching for phylogenetic pattern in biological invasions. *Glob Ecol Biogeogr* 17:5–10.
- Puth LM, Post DM (2005) Studying invasion: have we missed the boat? *Ecol Lett* 8:715–721.
- Pyšek P, Richardson DM (2010) Invasive Species, Environmental Change and Management, and Health. *Annu Rev Environ Resour* 35:25–55.
- Roy LA, Stone NM, Kelly AM, others (2015) Control of Bullfrogs and Their Tadpoles on Commercial Fish Farms. Cooperative Extension Program, University of Arkansas at Pine Bluff, US Department of Agriculture, and county governments cooperating.
- Schloegel LM, Ferreira CM, James TY, et al (2010) The North American bullfrog as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. *Anim Conserv* 13:53–61.
- Schloegel LM, Picco AM, Kilpatrick AM, et al (2009) Magnitude of the US trade in amphibians and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus infection in imported North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Biol Conserv* 142:1420–1426.
- Schloegel LM, Toledo LF, Longcore JE, et al (2012) Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Mol Ecol* 21:5162–5177.
- Schmeller DS, Julliard R, Bellingham PJ, et al (2015) Towards a global terrestrial species monitoring program. *J Nat Conserv* 25:51–57.
- Simberloff D (2009a) We can eliminate invasions or live with them. Successful management projects. *Biol Invasions* 11:149–157.
- Simberloff D (2009b) The role of propagule pressure in biological invasions. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 40:81–102.
- Simberloff D, Parker IM, Windle PN (2005) Introduced species policy, management, and future research needs. *Front Ecol Environ* 3:12–20.
- Solís R, Lobos G, Walker SF, et al (2010) Presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in feral populations of *Xenopus laevis* in Chile. *Biol Invasions* 12:1641–1646.
- Speziale KL, Lambertucci SA, Carrete M, Tella JL (2012) Dealing with non-native species: what makes the difference in South America? *Biol Invasions* 14:1609–1621.
- Sutherland WJ (ed) (1996) *Ecological Census Techniques: A Handbook*. Cambridge University Press

- Tinsley RC, Coxhead PG, Stott LC, et al (2015) Chytrid fungus infections in laboratory and introduced *Xenopus laevis* populations: assessing the risks for UK native amphibians. *Biol Conserv* 184:380–388.
- Ward DL, Finch C, Blasius H (2015) Could high salinity be used to control bullfrogs in small ponds? *J Ariz-Nev Acad Sci* 46:50–52.
- Weiher E, Keddy PA (1995) Assembly rules, null models, and trait dispersion: new questions from old patterns. *Oikos* 74:159–164.
- Weldon C, Du Preez LH, Hyatt AD, et al (2004) Origin of amphibian chytrid fungus. *Emerg Infect Dis* 10:2100–2105.
- Zuur AF, Ieno EN, Smith GM (2007) *Analysing Ecological Data*. Springer New York, New York, NY

Capítulo 3: Efectos de la rana toro sobre la riqueza de anfibios nativos y análisis de dieta.

Resumen

Entre las grandes preguntas aún no aclaradas de la ecología está la idea de comprender si las especies invasoras son “conductoras” o “pasajeras” en el cambio global. El presente estudio pretendió evaluar este aspecto en la comunidad de anuros de Aceguá, mediante el estudio de la riqueza específica en relación a los años de invasión de rana toro (Parte I del presente capítulo). Además, esto se complementó con un estudio de dieta de esta especie exótica, realizado a partir de diferentes ejemplares colectados en Uruguay (Parte II del presente capítulo). A partir del muestreo de 36 comunidades en la zona invadida, se encontró que la riqueza específica presentaba una asociación negativa con el tiempo de invasión de *L. catesbeianus*. Además, el estudio de dieta indica que consume muchos recursos utilizados por los anfibios nativos, e incluyó varios eventos de consumo de anfibios adultos y larvas. La evidencia encontrada marca que claramente la rana toro es una estructuradora de las comunidades y afecta negativamente la riqueza de anuros nativos. *L. catesbeianus* es un conductor del cambio en Uruguay. Por esto, su control resulta imprescindible y debe ser implementado a la brevedad.

Parte I. Efecto de la rana toro sobre la riqueza de anfibios nativos

Introducción

El hecho de que las especies invasoras sean nocivas para la biodiversidad nativa, no parece ser un tema trivial y ha sido cuestionado por varios investigadores si éstas serían “conductoras” o “pasajeras” en el cambio global. Esta hipótesis puede ser vista como dos extremos de un continuo, donde las especies exóticas podrían conducir cambios en el sistema como resultado de la invasión o bien podrían ser pasajeros pasivos que llegan al sistema después de que este haya cambiado debido a otras razones (Gurevitch y Padilla 2004; Didham et al. 2005). Este cuestionamiento tan básico parece generarse del hecho de que la evidencia empírica disponible, es muchas veces anecdótica o resultado de correlaciones que pueden no estar reflejando una causalidad. Si bien las especies invasoras podrían ser pasajeras, conductoras o incluso ambas, resulta necesario comprender que sucede en los sistemas naturales mediante estudios experimentales o comparativos (Gurevitch y Padilla 2004; Bauer 2012).

La rana toro resulta una especie ideal para evaluar esta hipótesis, por los variados y diferentes sitios donde está invadiendo. Kraus (2009) revisa la evidencia existente (tanto anecdótica como de investigaciones) y plantea que se puede afirmar fuertemente que la rana toro afecta negativamente a la biodiversidad nativa. Este autor resume los mecanismos en depredación y alteración en el uso de ambiente (Kiesecker y Blaustein 2008), pero agrega que otros factores como la modificación o pérdida de hábitat, la presencia de peces exóticos, la sobreexplotación, los disturbios, las enfermedades y la contaminación pueden también estar involucrados en la pérdida de biodiversidad reportada o pueden estar actuando sinérgicamente y aumentando los efectos de la invasión de la rana toro (Kraus 2009 y artículos citados).

A pesar de que la invasión de la rana toro es un fenómeno importante y tiene un gran potencial de expansión en la región Neotropical (Ficetola et al. 2007; Laufer et al. 2008; Both et al. 2011; Nori et al. 2011a; Nori et al. 2011b), sabemos muy poco acerca de sus efectos sobre la biodiversidad nativa. La mayor parte de las publicaciones existentes se remiten a reportes de ocurrencias (e.g. Akmentins et al. 2009; Sanabria et al. 2011; Iñiguez y Morejón 2012), análisis

de dietas (e.g. Boelter et al. 2007; de Pascual y Guerrero 2008; Leivas et al. 2012; Ruibal y Laufer 2012; Quiroga et al. 2015), historia natural y reproducción (e.g. Kaefer et al. 2007; Afonso et al. 2010; Medeiros et al. 2016), y enfermedades (e.g. Mazzoni et al. 2003; Galli et al. 2006; Mazzoni et al. 2009). En cuanto a los efectos sobre la fauna nativa, la evidencia existente es mucho más reducida.

A partir de un estudio genético en Brasil, se ha encontrado una posible relación de las ranas toro con la introducción de enfermedades, aunque no resulta fácil entender si esto ha afectado la biodiversidad de anuros nativos (Schloegel et al. 2010; Schloegel et al. 2012). Además se ha demostrado que el canto de la rana toro afecta el nicho acústico de *Hypsiboas albomarginatus* una especie de Brasil, lo que afectaría su performance aunque esto no demuestra por sí mismo una pérdida de biodiversidad (Both y Grant 2012). Sabemos poco acerca de los patrones generados ante la introducción de *L. catesbeianus* en la región, a partir de registros de ocurrencias (e.g. de Pascual y Guerrero 2008; Akmentins et al. 2009; Sanabria et al. 2011; Batista et al. 2015) y solo en ciertos casos estudios comparativos de comunidades (Boelter et al. 2007; Laufer et al. 2008; Silva et al. 2011).

Si bien la evidencia existente hace pensar en un efecto negativo de la introducción de la rana toro sobre la biodiversidad Neotropical, esta idea necesita de un sustento más robusto. Resulta interesante considerar los estudios realizados en la Mata Atlántica de Brasil, los cuales no encuentran una disminución de la riqueza nativa tras la invasión de *L. catesbeianus* (Both et al. 2014; Both y Melo 2015). Esto genera un contraste fuerte con la evidencia existente, tanto a nivel regional como global (Lowe et al. 2000; Adams y Pearl 2007; Scalera 2007; Kraus 2009). Los autores de estos estudios de Mata Atlántica proponen que esta diferencia se daría por dos factores, la distancia filogenética de las especies nativas con la rana toro y las condiciones locales que podrían promover la coexistencia. De hecho, en un estudio reciente proponen que la rana toro no estaría compitiendo con las especies nativas (Silva et al. 2016). Estos estudios, que plantean la interrogante del efecto potencial de la rana toro en la región, no son concordantes con nuestras observaciones en Aceguá (datos sin publicar, Gobel, 2013; Cortizas, 2014). Se plantea por tanto la pregunta de si la invasión de rana toro estaría siendo un conductor de los patrones de estructura de las comunidades nativas y si se la puede relacionar a una pérdida de biodiversidad.

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de la rana toro sobre la riqueza de especies del ensamble de anuros nativos de la localidad de Aceguá, Cerro Largo, Uruguay, mediante un estudio comparativo de comunidades en diferentes momentos de invasión. El relevamiento de este sitio nos otorga dos ventajas que: 1) el conocimiento certero del tiempo de invasión de cada sistema y 2) el relativo aislamiento entre charcos, que permite considerarlos como comunidades comparables (Capítulo 2).

Hipótesis: La rana toro altera las comunidades nativas de anuros, mediante efectos directos e indirectos de depredación y competencia. Además, actúa como vector de enfermedades y altera el medio acuático por las importantes densidades de sus larvas. La introducción de este depredador tope tendrá un efecto sobre todo el ensamble de anuros nativos. Este efecto se irá incrementando con los años de invasión, en los cuales la rana toro irá aumentando en densidades (considerando que esta especie tiene un ciclo anual). Si bien la rana toro tiene una dieta generalista, su interacción con las diferentes especies de anuros nativos será diferente, siendo mayor para aquellas especies más asociadas al medio acuático—especialmente a sistemas lénticos permanentes—durante toda su ontogenia.

Predicciones: De la hipótesis enunciada, se desprenden tres predicciones: 1) los sistemas invadidos por rana toro tendrán una menor riqueza de anuros que los no invadidos, 2) la pérdida de riqueza mencionada irá incrementándose con el tiempo de invasión, por lo que sistemas recientemente invadidos tendrán una mayor riqueza que los invadidos hace unos años, y 3) que el efecto será diferente para las distintas especies nativas, de acuerdo a su uso del medio acuático y por tanto su tasa de encuentro con la rana toro.

Metodología

Sitio de estudio

La localidad de Aceguá es una zona serrana (aprox 220 msnm), localizada en el Departamento de Cerro Largo al noreste de Uruguay, en la frontera con Brasil. Esta zona perteneciente a la eco-región Cuenca Sedimentaria Godwánica, se dividen dos grandes cuencas, la de la Laguna Merín y la del Río Negro, y alberga una relativamente alta diversidad biológica

(Brazeiro 2015). En la localidad estudiada (31°53'36''S, 54°09'26''W) se encuentran una serie de cuerpos de agua lénticos permanentes, utilizados mayormente como reservorios de agua para fines agropecuarios, especialmente ganadería extensiva. En 2007 fue detectada allí una población asilvestrada de *L. catesbeianus* (ver Capítulo 2) en fase de establecimiento, restringida a ocho cuerpos de agua proveniente de una antigua granja ranícola. Posteriormente, dicha población inició un proceso de expansión en 2012.

En esta zona se estudiaron los ensambles de anuros de 36 cuerpos de agua, de similares características (área, matriz vegetal periférica). Estos charcos presentan un pH medio de 7.5 y una conductividad de 73.45 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Su profundidad máxima es de 2 m y sus áreas van desde 307 m^2 hasta 2736 m^2 , presentan alrededor del 30% de su superficie cubierta por macrófitas flotantes o emergentes y están rodeados de pastizales naturales pastoreados. En estos cuerpos habitan tanto especies nativas de anuros con amplio rango de distribución nacional como: *Hypsiboas pulchellus*, *Pseudis minuta*, *Leptodactylus latrans*, *L. latinasus*, *L. gracilis*, *L. mystacinus*, *Dendropsophus sanborni*, *Pseudopaludicola falcipes*, *Scinax squalirostris*, *S. granulatus*, *Physalaemus biligonigerus*, *Odontophrynus americanus* y *Elachistocleis bicolor*; como, especies restringidas al ambiente serrano tales como: *Dendropsophus minutus*, *Julianus uruguayus*, *Ololygon aromothyella*, *Phyllomedusa iheringii*, *Physalaemus riograndensis* y *Limnomedusa macroglossa* (Laufer et al. 2009; Gobel et al. 2012).

Muestreo de campo

El muestreo de campo se realizó durante las horas de la noche (20:00 a 3:00) entre los días 9 y 12 de diciembre de 2015, en 36 cuerpos de agua de la localidad de Aceguá, incluyendo el área de distribución de *L. catesbeianus* y sus zonas circundantes (ver Capítulo 2). En esta época del año la mayor parte de las especies nativas y la rana toro se encuentran activas, vocalizando y reproduciéndose. La metodología utilizada fue la detección acústica y el avistamiento de individuos adultos en un muestreo estandarizado (Dodd 2010; Heyer et al. 2014). Para esto, dos personas recorrieron el perímetro de los charcos seleccionados durante siete minutos, registrando la cantidad de individuos avistados y la cantidad de vocalizaciones escuchadas por especie. La identificación de especies se realizó con la ayuda de registros sonoros (Amphibia web), de claves de identificación de anfibios (Ziegler y Maneyro 2008) y de listas de

especies regionales (Prigioni et al. 2011; Gobel et al. 2012). Durante el muestreo ocurrieron condiciones típicas de tormenta estival, con una temperatura de entre 18 y 27 °C y la humedad relativa de entre 57 y 99 %.

Para cada cuerpo de agua se contaba con la información del tiempo de invasión de rana toro, es decir, los años que lleva el charco invadido. Además, se registró para cada cuerpo de agua las coordenadas geográficas, el área (definida en una escala de 1 a 7, donde 1 se corresponde con pequeños cuerpos de agua y 7 con grandes lagunas), el tamaño relativo de la zona inundable adyacente al cuerpo de agua (definida categóricamente de 1 a 4), el tipo de matriz vegetal periférica asociada (caraguatal, arbustal y pastizal, variables definidas en escala binomial de acuerdo a su presencia).

Análisis de datos

Se analizó la riqueza de especies de anuros nativos (por presencia visual o registro sonoro) y la presencia de cada una de estas especies por cuerpo de agua mediante modelos lineales generalizados, siguiendo una distribución de Poisson. Como variables independientes se utilizó el área, el tamaño de la zona inundable, la presencia de caraguatal, arbustal y pastizal, y el tiempo que lleva invadido cada cuerpo de agua por la rana toro. Se planteó un primer modelo en el cual la riqueza de especies de anuros nativos medida durante el muestreo 2015 (por avistamiento o canto) constituyó la variable de respuesta y todas los factores previamente mencionados, y sus interacciones, las variables dependientes. En todos los casos los modelos explorados incluían de dos a tres variables explicativas, de forma de realizar una limitación de parámetros considerando el número de sistemas relevados (36 charcos).

Los análisis de presencia por especie se realizaron para las especies más frecuentes (aquellas que estuvieron presentes en al menos 10 cuerpos de agua de los 36 muestreados: *D. minutus*, *D. sanborni*, *H. pulchellus*, *P. iheringii*, *P. minuta*, *L. latrans* y *L. latinasus*) para evaluar la relación de su probabilidad de presencia y el tiempo de invasión de rana toro en los cuerpos de agua. Se construyó para esto un modelo lineal generalizado, con distribución binomial. Como variables independientes se utilizaron las que resultaron significativas en el modelo anterior.

En todos los casos los modelos fueron seleccionados mediante el criterio de información de Akaike (AIC), donde los valores más bajos indican los modelos más parsimoniosos y si la diferencia entre dos valores AIC es mayor que 2 se considera una diferencia significativa. El ajuste de cada variable en los diferentes modelos fue analizado mediante la prueba de ANOVA (LRT), considerando un α de 0,05 (Zuur et al. 2007; Logan 2011). Todos los análisis fueron realizados mediante el software estadístico libre R.

Resultados

El mayor número de especies de anfibios fue observado en los sistemas no invadidos o en aquellos que tenían dos o menos años de invasión. En estos cuerpos de agua se registraron entre tres y ocho especies nativas. Luego, a partir del tercer año se observó una drástica caída en la riqueza del ensamble. En estos charcos, con más de tres años de invasión, se registraron menos de cinco especies nativas (Figura 3.1). Resulta notorio que algunas especies aparecen en los primeros años de invasión y luego parece haber una disminución gradual con el tiempo.

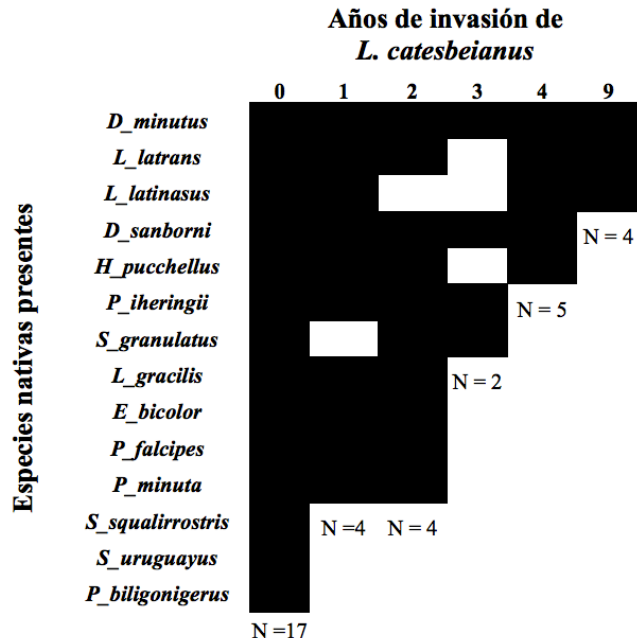


Figura 3.1. Especies de anfibios nativos de la localidad de Aceguá, Cerro Largo, y su presencia en asociación a los 36 cuerpos de agua evaluados. Los cuerpos de agua se dividen en los años de invasión de rana roro, encontrando desde cero para los no invadidos, hasta el mayor período de tiempo que tenemos registrado en el área.

El modelo lineal generalizado que mejor ajustó a los datos de campo incluyó únicamente dos variables independientes, el tiempo de invasión de rana toro (P-valor=0,00011) y la presencia del caragual (P-valor=0,026). En este modelo observamos que la riqueza decayó con el tiempo de invasión, mientras que el efecto del caragual fue más leve ($S = -0,86$ (tiempo de invasión) + 1,55 (caragual) + 3,48). La devianza explicada por el modelo fue de 49,66 %, indicando un buen ajuste de los datos. La calidad de ajuste del modelo (Devianza de los residuos/grados libertad) fue de 0,61, siendo menor a 1,3 por lo que se consideró aceptable (Figura 3.2).

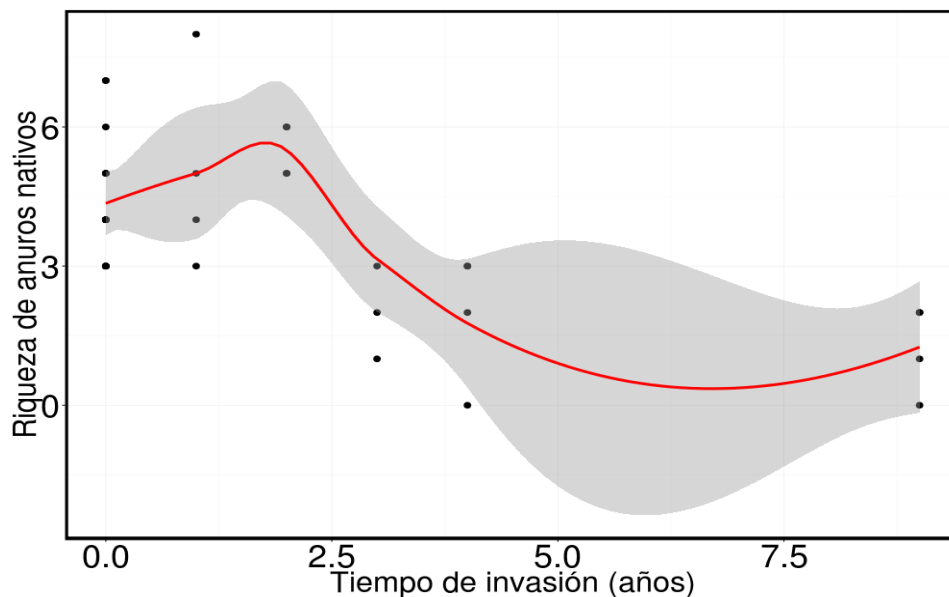


Figura 3.2. Riqueza de anfibios nativos en función del tiempo de invasión de rana toro en los 36 cuerpos de agua evaluados en la localidad de Aceguá, Cerro Largo. La línea roja es el modelo seleccionado, GLM con distribución de Poisson, y en gris aparecen los intervalos de confianza.

Si bien el modelo que incluye caragual es significativo, al analizar la inclusión de esta variable pudimos observar un efecto mayor en los cuerpos de agua no invadidos, el cual finalmente no pareció ser importante en los cuerpos de agua con mayor tiempo de invasión (Figura 3.3).

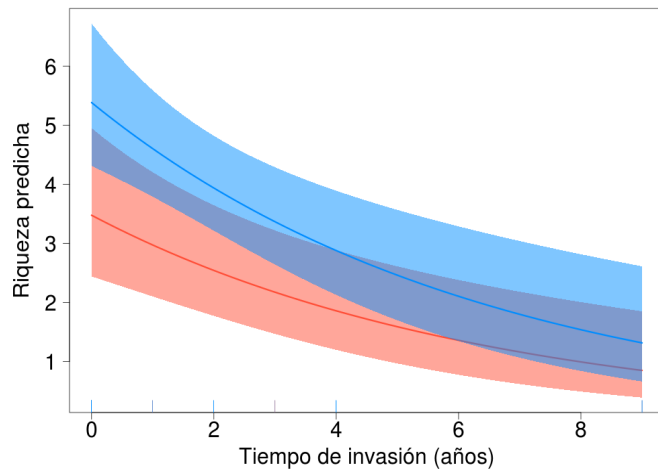


Figura 3.3. Riqueza de anfibios nativos predicha por el modelo lineal generalizado seleccionado en función del tiempo de invasión de rana toro en los 36 cuerpos de agua evaluados en la localidad de Aceguá, Cerro Largo. La curva en azul incluye el efecto de la variable caraguatal, mientras que la roja no.

Al analizar la presencia de cada una de las especies más frecuentes en relación al tiempo de invasión, encontramos que no en todos los casos existió una relación estadísticamente significativa con el tiempo de invasión de rana toro. Por tanto, los modelos logísticos a nivel de especie mostraron que si bien varias de estas especies disminuyeron su probabilidad de ocurrencia en los charcos más antiguamente invadidos, únicamente para dos de ellas el tiempo resultó la variable explicativa estadísticamente significativa. Estas especies fueron *D. sanborni* y *P. minuta*, las cuales serían un fuerte componente del patrón observado a nivel del ensamble completo. Finalmente, la variable caraguatal jugó en cambio un rol estadísticamente significativo o marginal únicamente para los pequeños hylidos (Tabla 3.1, Figura 3.4).

Tabla 3.1. Presencia de las especies nativas más comunes en función del tiempo de invasión de rana toro en los 36 cuerpos de agua evaluados en la localidad de Aceguá, Cerro Largo. Se incluye el efecto de la variable caraguatal, que había sido previamente seleccionado por afectar la riqueza del ensamble. Para ambas variables se incluye el grado de libertad (gl) el valor de devianza de los residuos y el P-valor. Con asterisco se indican las especies cuya presencia se vio afectada por el tiempo de invasión de la rana toro.

	Tiempo de invasión			Caraguatal		
	gl	Devianza de residuos	P-valor	gl	Devianza de residuos	P-valor
<i>D. minutus</i>	34	1,76	0,18	33	5,85	<0,05
<i>D. sanborni</i> *	34	8,78	<0,005	33	3,57	0,058
<i>H. pulchellus</i>	34	0,027	0,87	33	3,11	0,078
<i>P. iheringii</i>	34	0,96	0,33	33	1,53	0,21
<i>P. minuta</i> *	34	20,57	<0,00001	33	0,92	0,34
<i>L. latrans</i>	34	1,86	0,17	33	0,012	0,91
<i>L. latinasus</i>	34	0,028	0,86	33	0,59	0,44

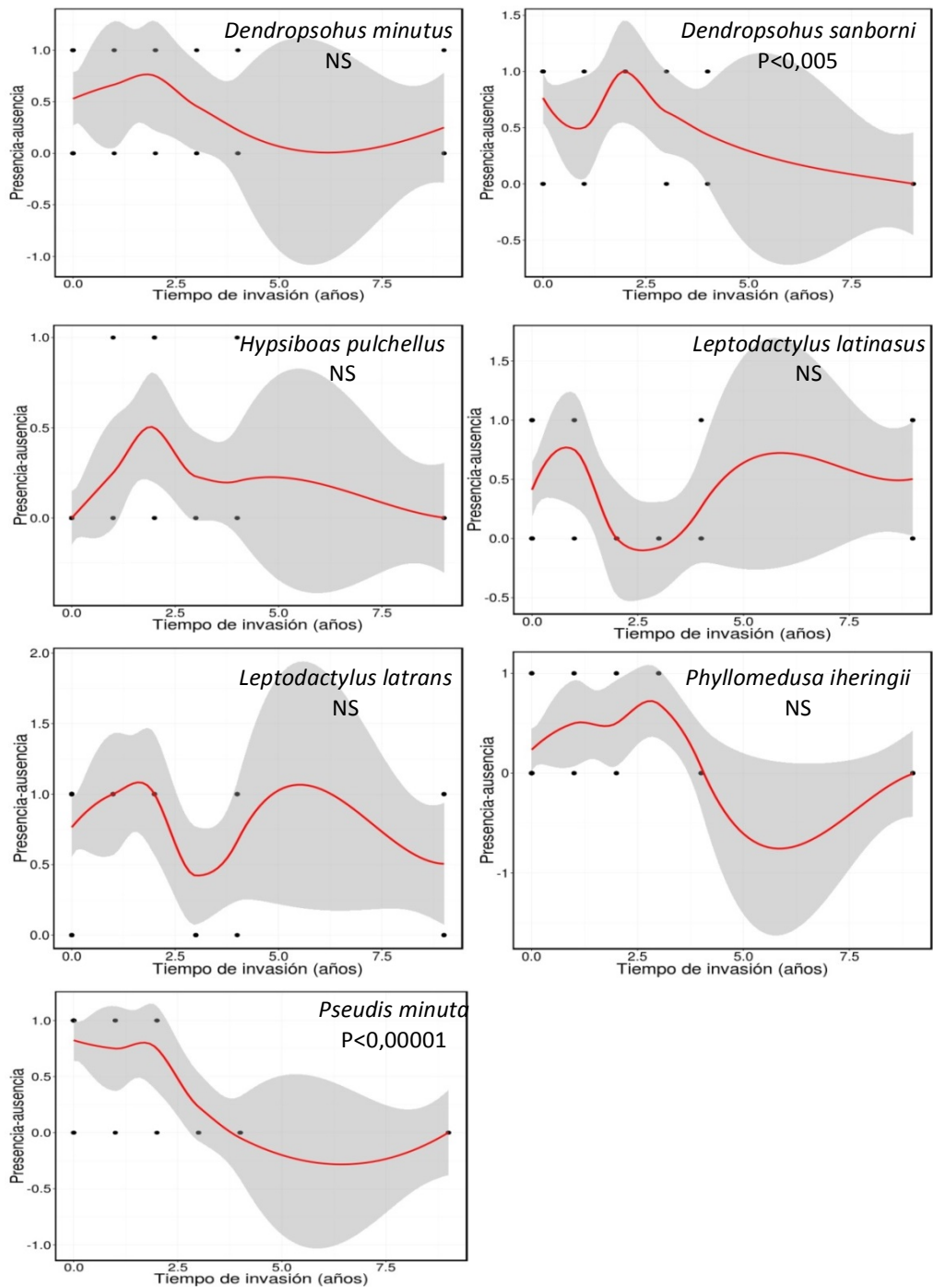


Figura 3.4. Presencia de las especies de anfibios nativos más frecuentes en función del tiempo de invasión de rana toro en los 36 cuerpos de agua evaluados en la localidad de Aceguá, Cerro Largo. En cada caso se incluye un modelo lineal generalizado, con distribución binomial. Los datos de los resultados de estos modelos se presentan en la tabla 3.1. De estas siete especies, únicamente responden en forma significativa al modelo *Dendropsopus sanbornii* y *Pseudis minuta*.

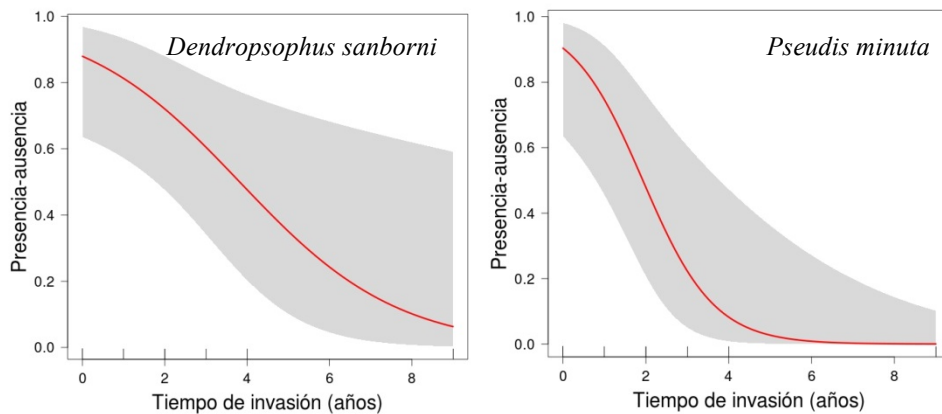


Figura 3.5. Predicciones de los modelos lineales generalizados binomiales, de presencia de *Dendropsophus sanborni* y *Pseudis minuta* en relación al tiempo de invasión de rana toro en los 36 cuerpos de agua evaluados en la localidad de Aceguá, Cerro Largo.

La predicción de los modelos para ambas especies no fue igual. Mientras que *D. sanborni* bajó notoriamente su presencia en relación al tiempo de invasión de rana toro, lo hace mucho más atenuadamente que *P. minuta* (Figura 3.5). De hecho, el modelo para esta especie predijo un rápido descenso en la probabilidad de su ocurrencia, llegando a cero luego del cuarto año. Estas dos especies se caracterizan por una importante asociación con el medio acuático. Mientras que *P. minutus* adulto es acuático, el adulto de *D. sanborni* aparece muy relacionado a la vegetación emergente de los charcos. Además ambas especies no presentan ningún mecanismo de protección de huevos o larvas (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Resumen de atributos ecológicos de las especies más frecuentes en la zona invadida por rana toro en Aceguá, Cerro Largo. Para cada especie se incluyó una categorización del tamaño de la larva (pequeña, mediana y grande), el lugar de la columna de agua que ocupa (especificando si existe protección de huevos o larvas), el tamaño del adulto (pequeña, mediana y grande), el microambiente más frecuentemente utilizado por el adulto, el sitio de puesta de huevos y las referencias bibliográficas. En negrita aparecen las especies que presentan una significativa disminución de presencia ante la invasión de la rana toro.

Especie	Tamaño larva	Micro ambiente larva	Tamaño adulto	Micro ambiente adulto	Puesta huevos	Referencias
<i>D. minutus</i>	mediana	nectónica	pequeño	caraguatales, vegetación emergente	charco	(Afonso and Eterovick, 2007; Brasileiro et al., 2005; Maneyro and Carreira, 2012)
<i>D. sanborni</i>	mediana	nectónica	pequeño	caraguatales, vegetación emergente	charco	(Brasileiro et al., 2005; Maneyro and Carreira, 2012)
<i>H. pulchellus</i>	grande	bentónica	mediano	chircales y vegetación periférica	charco	(Kolenc et al., 2008; Maneyro and Carreira, 2012)
<i>P. iheringii</i>	grande	nectónica protección (huevos en hojas)	grande	arboles y arbustos periféricos	nido externo	(Iop et al., 2015; Langone, 1993; Maneyro and Carreira, 2012)
<i>P. minuta</i>	grande	nectónica	mediano	acuática	charco	(de Sa and Lavilla, 1997; Gobel et al., 2012; Maneyro and Carreira, 2012; Zank et al., 2010)
<i>L. latrans</i>	grande	bentónica protección (cuidado parental)	grande	pastizal y periferia cuerpos de agua	nido en charco	(Laufer et al., 2014; Laufer and Maneyro, 2008; Maneyro et al., 2004; Vaz-Ferreira and Gehrau, 1975)
<i>L. latinasus</i>	mediana	bentónica protección (huevos en cuevas)	mediano	cuevas en periferia del charco	agua cueva	(Maneyro and Carreira, 2012)

Discusión

Las actividades humanas han aumentado en gran medida la extinción de especies a nivel global, con una tasa que se incrementa rápidamente con respecto a la histórica (Ceballos et al. 2015). Si bien la pérdida de hábitat sigue siendo la primer causa, cada vez es más aceptada la idea del rol preponderante de las invasiones biológicas, especialmente para los animales vertebrados (Clavero y Garcia-Berthou 2005; Clavero et al. 2009; Blackburn et al. 2014; Bellard et al. 2016). De allí surge la necesidad de evaluar rápidamente los efectos que están generando las diferentes especies sobre la biodiversidad local, lo que le muestra una importancia de nuestros resultados. Se trata de la primer evaluación del efecto de un invasor biológico sobre todo un ensamble de anuros nativos de Uruguay.

La fuerte caída observada en riqueza del ensamble de anuros nativos de Aceguá parece ser consecuencia de la invasión de rana toro, tal como se ha reportado para otras regiones (Adams y Pearl 2007; Kiesecker y Blaustein 2008; Kraus 2009; Silva et al. 2011). Esta evidencia se sustenta en el hecho de que se evaluó un sistema de 36 charcos, cubriendo un buen gradiente de condiciones, donde no aparece ninguno con alteraciones particulares. Simplemente podemos decir que la rana toro está gradualmente invadiendo los cuerpos de agua más próximos al antiguo criadero, su punto de introducción (Capítulo 2). No parece haber un patrón de selección de charcos alterados a ser invadidos, pero sí aparece un patrón de estructura del ensamble con una pérdida de riqueza y una rápida desaparición de ciertas especies (Figuras 3.4 y 3.5). Entendemos por esto que la rana toro no está actuando como un simple pasajero del cambio, sino como un conductor (Didham et al. 2005), tal como se espera para un depredador de gran tamaño corporal (Davis 2003; Kats y Ferrer 2003). Los depredadores exóticos tienen generalmente impactos mucho más importantes que los nativos (Salo et al. 2007) y resultan difíciles de identificar como tales por sus presas nativas (Polo-Cavia et al. 2010). La evidencia aquí reportada resulta coincidente con los patrones observados para las comunidades acuáticas de los mismos charcos en Aceguá (Gobel 2013) y los observados en Rincón de Pando (Laufer et al. 2008). En resumen, la evidencia que estamos registrando en este sitio de estudio sugiere que la rana toro es un conductor de los cambios y no simplemente un pasajero.

No todas las especies nativas tendrían igual tasa de encuentro con la rana toro y eso podría de alguna forma explicar las diferencias observadas a este nivel (Figura 3.4, Tabla 3.2). Pearl y colaboradores (2004) plantearon que las especies que comparten hábitos con la rana toro serían las más expuestas a depredación y competencia. Sin duda este es el caso de *Dendropsophus sanborni* (una rana pequeña muy asociada a la vegetación emergente) y *Pseudis minuta* (un anfibio muy asociado a la superficie del agua y vegetación flotante) (Tabla 3.2). Es especialmente preocupante la situación para esta última rana nativa que tiene muchos atributos ecológicos similares a la rana toro, pero que es de mucho menor tamaño (Zank et al. 2010; Huckembeck et al. 2012). Por tener un ciclo estrictamente acuático, *P. minuta* utiliza únicamente los ambientes lénticos permanentes, al igual que la rana toro. De hecho Both y Melo (2015) no encuentran la presencia de otra especie del mismo género en los cuerpos de agua invadidos por *L. catesbeianus* en la Mata Atlántica. El interesante y diverso grupo de pseudidos sudamericanos tiene una distribución muy coincidente con lo que predicen los modelos de nicho para la rana toro y por tanto deberían ser especialmente considerados en planes de conservación (Aguiar et al. 2007; Garda et al. 2010; Santana et al. 2016).

Un mecanismo no evaluado hasta el momento que también podría estar actuando es la exclusión de determinadas especies por la alta abundancia de larvas de rana toro, las cuales son importantes consumidoras de huevos (Laufer et al. 2008; Ruibal y Laufer 2012). Es posible que aunque cierta especie escape a la depredación de las ranas toro adultas y logre reproducirse en un charco invadido, sufra una alta depredación de sus huevos. Este tipo de interacciones resultan importantes para las especies de ciclo complejo que deberían ser evaluadas (Wilbur 1997).

En resumen, si bien la población de rana toro es aún muy pequeña, ya plantea un importante desafío para la biodiversidad de anuros nativos. La rana toro parece estar afectando a la biodiversidad, a medida que avanza en su tiempo de invasión. Esta justificación empírica del efecto de una especie invasora sobre las comunidades nativas es también escaso para la mayor parte de los invasores en Uruguay (salvo aquellas que causan perjuicios económicos notorios, e.g. Brugnoli et al. 2011). La evidencia aquí presentada refuerza la necesidad de implementar en forma urgente acciones de control y manejo a nivel nacional y regional.

Parte II. Ecología trófica de la rana toro

Introducción

Los impactos negativos de las especies invasoras sobre la biodiversidad nativa pueden ser directos, como la depredación y la competencia, o indirectos, como la transmisión de patógenos o la alteración del ambiente (Crooks 2002; Davis 2009). Ante una invasión en una nueva región, resulta fundamental conocer rápidamente la historia natural de la población invasora. Uno de los aspectos más relevantes para el caso de los vertebrados depredadores como la rana toro, es el conocer su dieta. Esto nos permite conocer como está realizando este invasor la adquisición de recursos alimenticios, que sustentan a sus poblaciones y explorar sobre la susceptibilidad de las especies nativas a las que podría afectar (Kats y Ferrer 2003).

La evaluación del contenido estomacal es una herramienta que puede brindar información esencial para entender la historia de vida, las dinámicas poblacionales y el impacto de las especies invasoras. Las relaciones tróficas que emergen de estos estudios revelan las nuevas conexiones funcionales con los diferentes taxa y con el flujo de energía y redes tróficas nativas. Estos estudios brindan información que no puede ser directamente inferida de estudios comportamentales observacionales o de evaluaciones de estructuras comunitarias. Por lo tanto, la información de la dieta de una invasora es un componente necesario en la comprensión de sus efectos y en su gestión (Dick et al. 2013).

La dieta de la rana toro ha sido evaluada en diferente regiones, tanto de su distribución nativa como invasora (e.g. Hiari 2004; Wu et al. 2005; Boelter et al. 2007; de Pascual y Guerrero 2008; Wang et al. 2008; Jancowski y Orchard 2013; Quiroga et al. 2015). En la región neotropical existe una serie de reportes de dieta, mayormente para poblaciones establecidas en Brasil y la evaluación de las dietas de las larvas en Aceguá y Paraje Bizcocho, en Uruguay (Ruibal y Laufer 2012). No existe hasta el momento una evaluación de la dieta de los adultos de esta especie en las comunidades invadidas en Uruguay.

Los adultos de *L. catesbeianus* son depredadores voraces, con gran plasticidad, capaces de consumir cualquier animal vivo que sean capaces de ingerir, incluyendo sus conspecíficos y

otros anfibios (Bury y Whelan 1984; Adams y Pearl 2007). El objetivo del presente estudio es evaluar la dieta de adultos la rana toro, como forma de ampliar el conocimiento de su historia natural en Uruguay. Para esto se analizó el contenido estomacal de un número importante de ejemplares colectados en dos poblaciones, la de Paraje Bizcocho (Soriano) y la de Aceguá (Cerro Largo).

Metodología

Muestreo de campo

Los individuos analizados provienen de colectas no sistematizadas de dos localidades Paraje Bizcocho (del año 2007) y Aceguá (del año 2007 al 2013). Estas colectas fueron realizadas mayormente en muestreos nocturnos con captura manual, pero algunos ejemplares salieron en redes de arrastre durante muestreos diurnos de comunidades acuáticas. Una vez colectados los ejemplares fueron sacrificados con una sobredosis de Eugenol y fijados en formol. Una vez en el laboratorio, los ejemplares fueron sexados por el tamaño relativo del tímpano (Howard, 1981), medidos con calibre digital desde el hocico hacia la cloaca (LHC) y clasificados en grupos demográficos. Estos grupos demográficos fueron: Machos, Hembras y Juveniles. Los individuos sin caracteres de dimorfismo sexual evidente, menores de 50 mm fueron considerados Juveniles.

Análisis de contenido estomacal

Se realizó el análisis de contenido estomacal de todos los individuos disponibles de las diferentes colectas, mediante la disección y extracción del estómago. Los contenidos fueron extendidos en una placa de Petri para luego ser analizado bajo lupa binocular. Los ítems alimenticios encontrados se identificaron al mayor nivel taxonómico posible, con la ayuda de claves regionales de identificación (Ziegler y Maneyro 2008; Mugnai et al. 2010; Teixeira de Mello et al. 2011). Se registró el número de cada ítem alimenticio encontrado en todos los individuos analizados. Para cada presa se tomaron medidas de largo y de ancho con un calibre digital para luego calcular su volumen mediante la ecuación de un elipsoide: $V=4/3\pi*(l/2)*a*a$, donde l es el largo y a el ancho de la presa. En el caso de las presas de menor tamaño se trabajó

bajo lupa binocular.

Análisis de datos

Se comparó el tamaño corporal (LHC) entre grupos demográficos mediante un análisis de varianza ANOVA. Los datos el contenido estomacal fueron explorados en el número, riqueza y volumen de presas, mediante un test de co-varianza ANCOVA, utilizando el LHC como covariable. Las diferencias entre pares de grupos demográficos se realizaron mediante el test a posteriori de Tukey (Logan 2011). Luego, se obtuvo para cada uno el valor de riqueza de presas (cantidad de ítems registrados por estómago, S). La riqueza en la dieta fue comparada entre grupos demográficos mediante el procedimiento de rarefacción usando el paquete estadístico iNEXT del software libre R (Hsieh et al. 2016). Este análisis es un método robusto para comparar diferencia entre muestras dispares (Chao y Jost 2012), y permite evaluar la completitud de los datos.

Las presas encontradas en contenido estomacal fueron clasificadas según su relación con el medio acuático en “acuáticas” y “no acuática”, en base a nuestras observaciones de campo y las claves utilizadas. Para cada grupo demográfico se obtuvo la proporción de ítems de presas acuáticas y de volumen de presas acuáticas sobre el total de la ingesta por individuo y se comparó entre grupos demográficos por ANOVA y ANCOVA, y luego Tukey. Lo mismo se realizó para la proporción de canibalismo, entendido como el número de conspecíficos consumidos sobre el total de presas (Logan 2011).

Finalmente, para evaluar la relación del canibalismo con el tamaño corporal (LHC) se realizó una modelación mediante un GLM (modelo lineal generalizado) binomial, utilizando la presencia-ausencia de canibalismo. Como variable explicativa se utilizó el LHC. El mismo procedimiento estadístico se realizó para analizar la relación de la binomial presas acuáticas-no acuáticas mediante un GLM, en relación al LHC. Todos los análisis fueron realizados utilizando el software libre R (Logan 2011).

Resultados

Nuestras observaciones muestran que la rana toro tuvo una amplia dieta compuesta de decápodos, gasterópodos, arácnidos, insectos y vertebrados. Entre las principales presas en cantidad, destacaron los ortópteros, himenópteros, coleópteros, efemerópteros y anfípodos. La muestra analizada se compuso por 75 juveniles, 11 de los cuales tenían el estómago vacío y 51 adultos, 2 de los cuales tenían el estómago vacío (Tabla 3.3). Los tamaños corporales de los machos (LHC media de 116,83 mm) y las hembras (LHC media de 119,10 mm) no difirieron entre sí, pero fueron significativamente mayores que los de los juveniles (LHC media de 35,39 mm), en unas tres veces (Figura 3.6A, $F_2=157,7$ $p<0,001$). En cuanto al número de presas, encontramos que en promedio los machos consumieron el doble de ejemplares presas por individuo que las hembras y juveniles, que no difirieron entre sí (Figura 3.6B, $F_2=5,208$ $p<0,01$). Para este análisis el LHC no fue estadísticamente significativo ($F=0,903$ $p=0,344$).

Considerando la identidad de las presas, no encontramos diferencias significativas entre los grupos demográficos en la riqueza media de la ingesta (Figura 3.6C, $F_2=1,563$ $p=0,21$). Para este análisis el LHC no fue estadísticamente significativo ($F=0,580$ $p=0,448$). De todas formas, el análisis de rarefacción, de mayor sensibilidad para buscar diferencias entre muestras de diferentes tamaños, si arrojó diferencias en riqueza de ingesta de los machos y juveniles, cuyos intervalos de confianza no se solapan ni en el punto de corte, ni en la extrapolación (Figura 3.7A). La riqueza de las hembras queda en un lugar intermedio, solapando sus intervalos de confianza tanto con los machos, como con los juveniles. Resulta notable de estos resultados el hecho que las curvas de los tres grupos demográficos se asintotizan, mostrando una adecuada completitud de las muestras analizadas. Lo mismo sucede para la riqueza total de la población considerada (Figura 3.7B).

Tabla 3.3. Dieta de rana toro en las poblaciones de Bizcocho, Soriano y Aceguá, Cerro Largo. Se describe para cada ítem encontrado, su identidad, la cantidad de individuos, la frecuencia de los mismos y el volumen estimado. Esto se desagrega para juveniles y adultos, especificándose los tamaños muestrales y la cantidad de estómagos vacíos. Los datos de volumen que no se pudieron obtener por el estado de las presas figuran como sd (sin dato).

	Juveniles	Adultos
Presas en contenido estomacal de rana toro	N=75	N=51

			11 estómagos vacíos			2 estómagos vacíos		
			n	frec	vol (mm ³)	n	frec	vol (mm ³)
Malacostraca	Amphipoda		32	0,50	188,73	23	0,47	102,29
Malacostraca	Decapoda	Trychodactylidae				3	0,06	6854,58
Malacostraca	Isopoda					1	0,02	37,75
Branchiopoda	Cladocera					8	0,16	sd
Crustacea	Ostracoda					2	0,04	sd
Diplopoda			3	0,05	140,63			
Gastropoda	Pulmonata	Ancylidae				1	0,02	0,18
Gastropoda	Pulmonata	Lymnaeidae	1	0,02	20,23			
Arachnida	Acari		1	0,02	0,15	2	0,04	0,03
Arachnida	Araneae		18	0,28	62,45	10	0,20	262,25
Arachnida	Opiliones					1	0,02	247,49
Insecta	Coleoptera	(larva)	1	0,02	48,35			
Insecta	Coleoptera	Bostrichidae	1	0,02	8,72			
Insecta	Coleoptera	Carabidae	14	0,22	106,03			
Insecta	Coleoptera	Curculionidae	3	0,05	26,74	12	0,24	147,51
Insecta	Coleoptera	Dytiscidae (adulto)	33	0,52	71,03	9	0,18	4856,41
Insecta	Coleoptera	Dytiscidae (larva)	2	0,03	4,96	1	0,02	0,03
Insecta	Coleoptera	Hydrophilidae (adulto)	14	0,22	452,90	20	0,41	12271,01
Insecta	Coleoptera	Staphylinidae	3	0,05	2,03			
Insecta	Coleoptera	Tenebrionidae				1	0,02	413,85
Insecta	Coleoptera		8	0,13	127,33	6	0,12	1644,28
Insecta	Collembola					1	0,02	sd
Insecta	Dermaptera					3	0,06	865,04
Insecta	Diptera	(pupa)				2	0,04	0,18
Insecta	Diptera	Chironomidae (larva)	1	0,02	0,11			
Insecta	Diptera	Cyclorrapha	14	0,22	65,93	1	0,02	5,86

Insecta	Diptera	Nematosera	16	0,25	36,31			
Insecta	Diptera	Tabanidae (larva)				1	0,02	sd
Insecta	Diptera		7	0,11	25,97	1	0,02	3,96
Insecta	Ephemeroptera	(adulto)	19	0,30	61,82	1	0,02	105,84
Insecta	Hemiptera	Cercopidae	3	0,05	5,09			
Insecta	Hemiptera	Reduviidae	2	0,03	0,71	2	0,04	326,75
Insecta	Heteroptera	Belostomatidae	2	0,03	21,23	27	0,55	13412,30
Insecta	Heteroptera	Corixidae	1	0,02	25,99			
Insecta	Heteroptera	Notonectidae	1	0,02	2,43	5	0,10	122,39
Insecta	Heteroptera		4	0,06	5,79			
Insecta	Homoptera	Cicadellidae	3	0,05	7,40			
Insecta	Homoptera		1	0,02	27,00	6	0,12	83,02
Insecta	Hymenoptera	Apidae	2	0,03	72,89	11	0,22	776,01
Insecta	Hymenoptera	Formicidae	11	0,17	52,63	25	0,51	99,09
Insecta	Hymenoptera	Formicidae	2	0,03	1,09			
Insecta	Hymenoptera	Formicidae	19	0,30	29,78	4	0,08	4,60
Insecta	Hymenoptera	Formicidae	1	0,02	2,01			
Insecta	Hymenoptera	Formicidae	1	0,02	0,36	2	0,04	2,27
Insecta	Hymenoptera	Formicidae	6	0,09	0,64	2	0,04	4,85
Insecta	Hymenoptera	Vespidae				2	0,04	333,64
Insecta	Hymenoptera		1	0,02	5,81	1	0,02	1,20
Insecta	Isoptera	Termitidae	1	0,02	6,09			
Insecta	Lepidoptera	(adulto)	1	0,02	4,74			
Insecta	Lepidoptera	(larva)				2	0,04	483,98
Insecta	Lepidoptera	Pyralidae (larva)	1	0,02	0,24			
Insecta	Lepidoptera					1	0,02	103,03
Insecta	Odonata	(adulto)	2	0,03	6,26	2	0,04	sd
Insecta	Odonata	Anisoptera (adulto)	1	0,02	5,13			
Insecta	Odonata	Anisoptera (larva)	1	0,02	477,53	9	0,18	3086,43

Insecta	Odonata	Zigoptera (adulto)				4	0,08	71,80
Insecta	Orthoptera	Gryllidae	3	0,05	102,38	11	0,22	1968,60
Insecta	Orthoptera	Gryllotalpidae	1	0,02	279,33	4	0,08	749,96
Insecta	Orthoptera		4	0,06	203,81	1	0,02	459,40
Insecta	Thysanoptera	Thysanura				1	0,02	170,09
Insecta			20	0,31	0,77	4	0,08	sd
Osteichthyes	Characiformes	<i>Astyanax sp.</i>				6	0,12	8459,49
Osteichthyes	Characiformes					1	0,02	3320,26
Osteichthyes						1	0,02	404,41
Amphibia	Anura	<i>H. pulchellus</i> (larva)				2	0,04	4337,06
Amphibia	Anura	<i>L. catesbeianus</i> (adulto)				11	0,22	77421,66
Amphibia	Anura	<i>L. catesbeianus</i> (larva)				23	0,47	74906,63
Amphibia	Anura					1	0,02	2526,60
		Huevos	5	0,08	0,16			

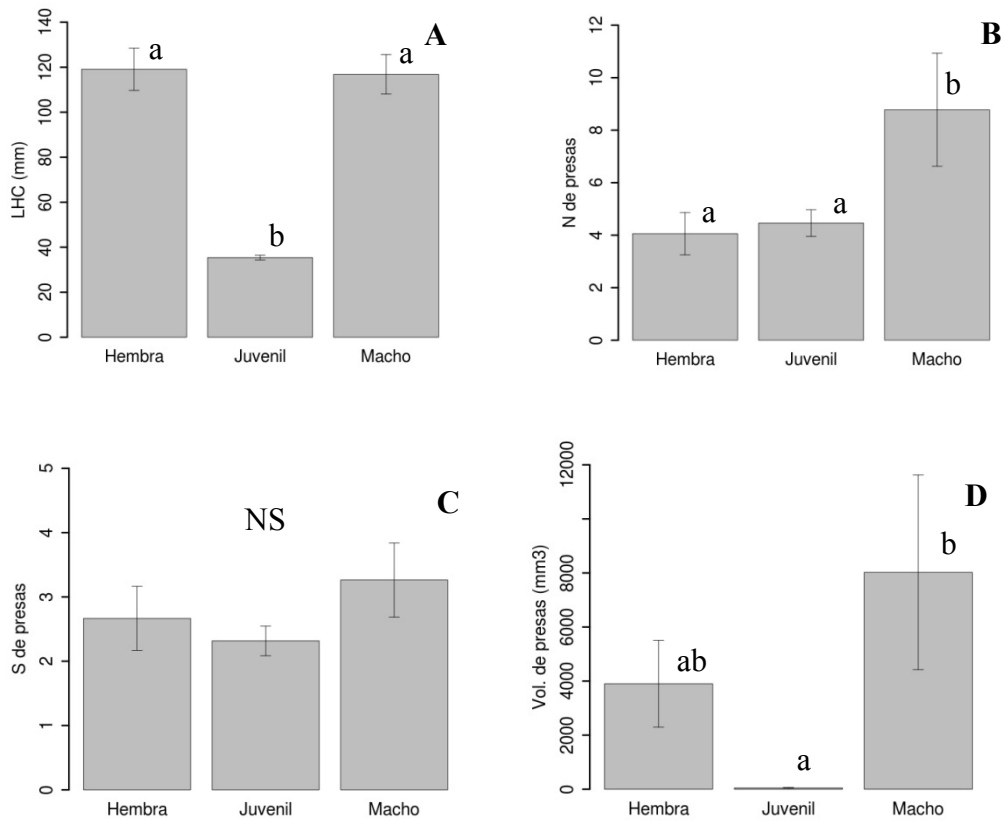


Figura 3.6. Muestras de estómagos de rana toro analizadas y diferencias entre grupos demográficos (hembras, juveniles y machos) en tamaño corporal medio medido como longitud hocico cloaca LHC (A), número de presas promedio (B), riqueza media de presas S (C) y volumen medio de presas (D). Las barras tienen desvío estándar y se indican con la misma letra minúscula aquellas que no tienen diferencias estadísticamente significativas. NS indica el caso en que no existe ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos demográficos.

En cuanto al volumen de presas ingeridas, observamos diferencias significativas entre los diferentes grupos demográficos ($F_2=10,68$ $p<0,001$). En este caso la covariable LHC fue estadísticamente significativa ($F=10,06$ $p<0,01$). Las hembras consumieron un volumen intermedio, de 3900 mm^3 , que no difirió estadísticamente por el test de Tukey de los otros dos grupos. La diferencia se encontró en el volumen que ingirieron en promedio los machos, que fue de 8022 mm^3 , mucho mayor que los 47 mm^3 que ingirieron los juveniles (Figura 3.6D).

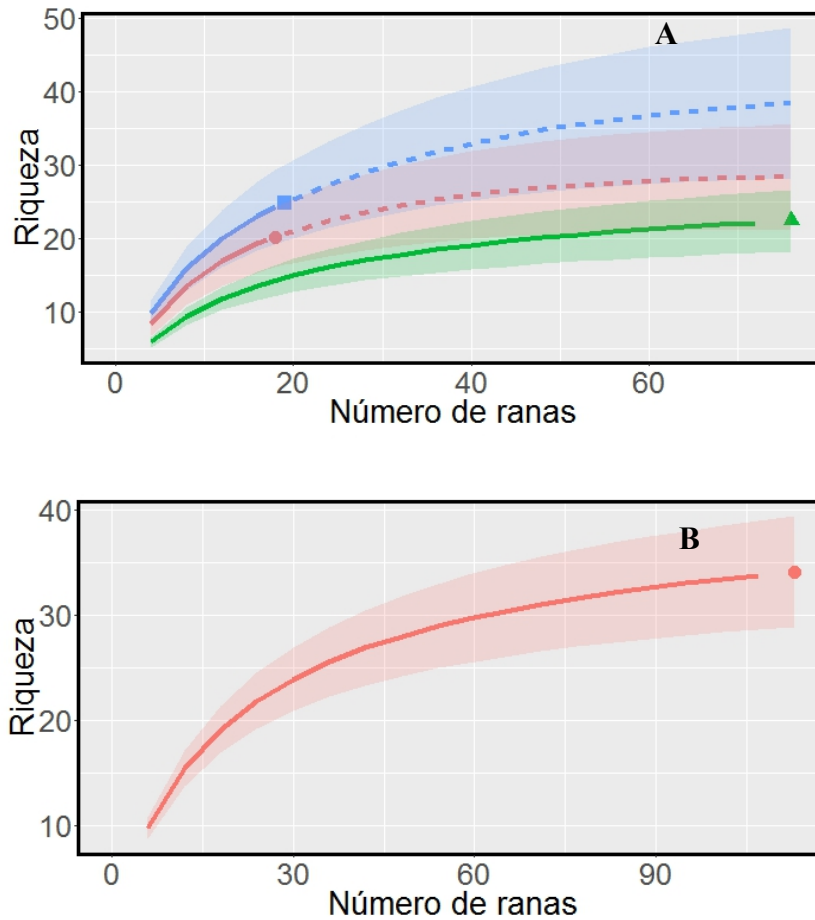


Figura 3.7. Riqueza de especies analizado por procedimiento de rarefacción para la muestra de estómagos de ranas toro de Uruguay. Se muestra el resultado de la rarefacción para los diferentes grupos demográficos (A): hembras (rojo), juveniles (verde) y machos (azul) y para el total de la muestra analizada (B). Las líneas continuas son el resultado de la interpolación realizada por el análisis de rarefacción, mientras que las punteadas son la extrapolación para poder comparar los números diferentes de ranas toro analizadas. El área sombreada en el mismo color que las líneas representa los intervalos de confianza al 95%.

A partir de la clasificación de las presas por su ambiente de origen, encontramos que tanto en número ($F_2=5,239$ $p<0,05$) como en volumen ($F_2=4,613$ $p<0,05$), la ingesta de los adultos de rana toro se compone en un poco más de la mitad de ítems del medio acuático. En cambio los juveniles integran presas acuáticas únicamente como un tercio de su ingesta (Figura 3.8 A y B). Finalmente, encontramos que la incidencia del canibalismo también fue mucho mayor en adultos, de hecho no se encontró evidencia de ingesta de conspecíficos en ninguno de los juveniles (Figura 9, $F_2=13,57$ $p<0,001$). La fracción de presas de conspecíficos, tanto larvas como juveniles, fue de 0,277 en hembras y 0,200 en machos (Figura 3.9). Mediante un modelo

GLM binomial pudimos encontrar la relación de la proporción de canibalismo y la LHC (Figura 3.10A, Devianza explicada 55,61%, AIC 105,31). Dicho modelo predice que el canibalismo ocurre en individuos con más de 130 mm de longitud y crece fuertemente con el tamaño (Figura 3.10B).

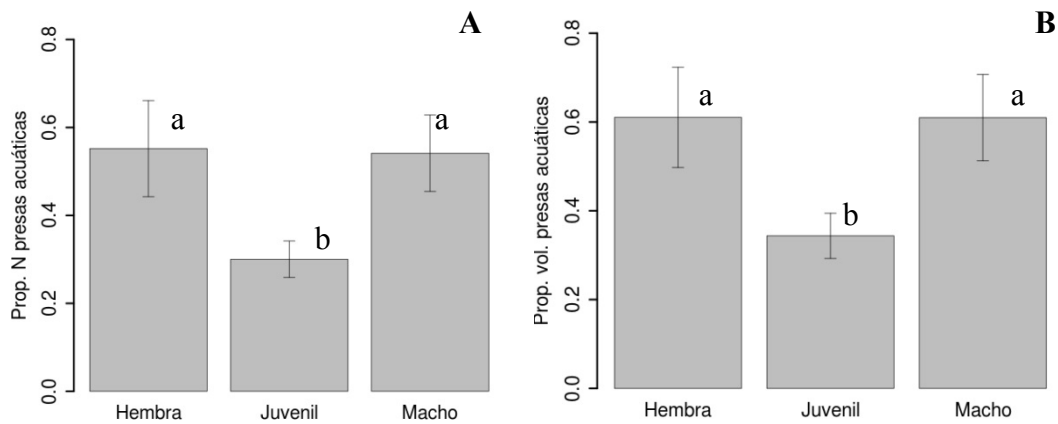


Figura 3.8. Proporción de presas acuáticas encontradas en las muestras de estómagos de rana toro analizadas y diferencias entre grupos demográficos (hembras, juveniles y machos) en número total medio (A) y volumen total medio (B). Las barras tienen desvío estándar y se indican con la misma letra minúscula aquellas que no tienen diferencias estadísticamente significativas.

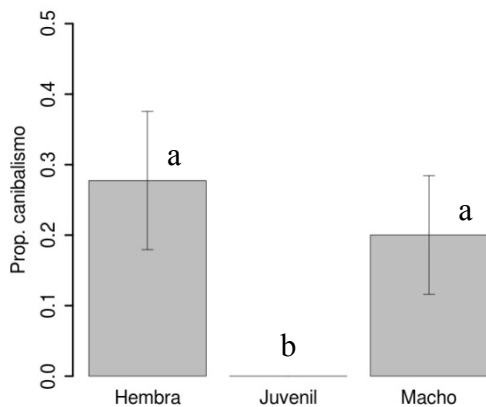


Figura 3.9. Proporción de canibalismo encontrado en las muestras de estómagos de rana toro analizadas y diferencias entre grupos demográficos (hembras, juveniles y machos) en número total medio. Las barras tienen desvío estándar y se indican con la misma letra minúscula aquellas que no tienen diferencias estadísticamente significativas.

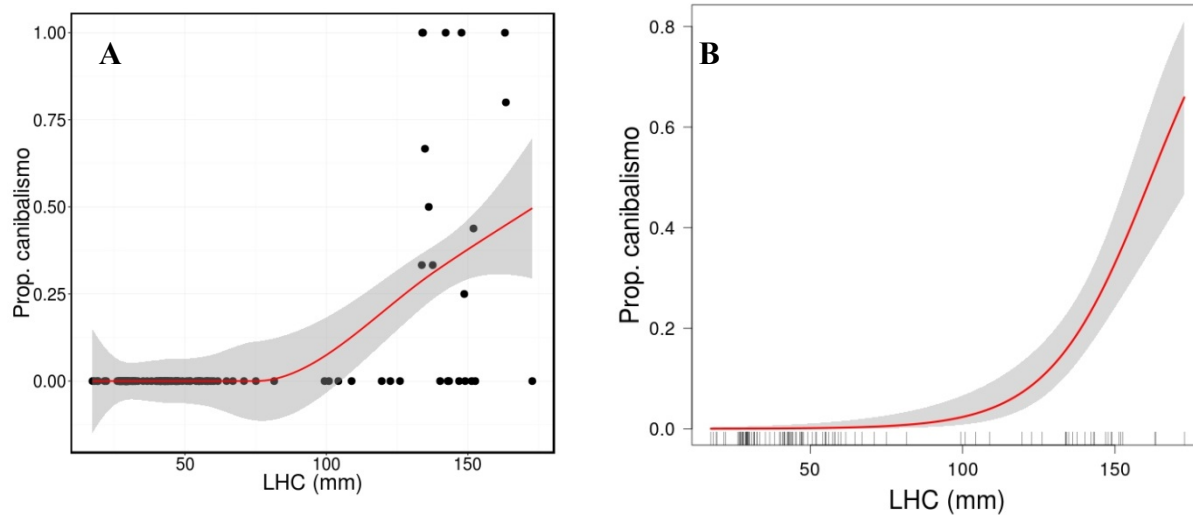


Figura 3.10. Proporción de canibalismo en las muestras de estómagos de rana toro analizado, en relación a la longitud hocico-cloaca (LHC) de cada individuo, mediante un modelo lineal generalizado, con distribución binomial. Se presenta el ajuste de los datos (A) y la predicción del modelo (B).

Discusión

El presente es el primer estudio de dieta de *L. catesbeianus* en Uruguay, a partir de ejemplares proveniente de dos poblaciones en fase de establecimiento. De hecho este estudio incluye datos de individuos de la población de Bizcocho, la cual hasta el momento no parece haber logrado establecerse, ya que desde hace ocho años no se encuentran allí ranas toro (Capítulo 2). Resulta importante obtener datos de la historia natural de las especies invasoras en nuestro país y la dieta de los depredadores es muy informativa al respecto (Solé y Rödder 2010).

Tanto la amplitud de dieta, como la variedad de presas de diferentes niveles tróficos y grupos taxonómicos indican que la rana toro está actuando como un depredador tope generalista en los sistemas invadidos. Congruentemente con la literatura, la rana toro es un depredador muy voraz y come prácticamente todo lo que entre en su boca (e.g. Brooks 1964; Bruggers 1973; Bury y Whelan 1984; Beringer y Johnson 1995; Hiari 2004; de Pascual y Guerrero 2008; Wang et al. 2008; Jancowski y Orchard 2013; Quiroga et al. 2015).

Todas nuestras observaciones marcan fuertes cambios en la ontogenia, con grandes diferencias en la composición y volumen de la dieta entre juveniles y adultos. Estos cambios son frecuentes en anuros que alcanzan tamaños corporales relativamente importantes, pasando por

una dieta con un gran componente de herbívoría con pequeñas presas animales en larvas (Ruibal y Laufer 2012) a una dieta depredadora de pequeñas presas en postmetamorfos, que se va alterando hacia presas mayores con el crecimiento (Hirai 2002). A pesar de ser muy acuáticas, las ranas toro están sustentadas en una buena proporción, de presas del medio terrestre, siendo esto incluso mayor en juveniles. De hecho, ha sido documentado el que las ranas toro pueden utilizar diferentes ambientes como sitios de alimentación (Gahl et al. 2009) y lo pueden estar haciendo en los pastizales o pequeños bañados aledaños a los cuerpos de agua lénticos permanentes donde habitan. Los juveniles además aparecen frecuentemente en estas zonas, probablemente para dispersar, escapar de la depredación o el canibalismo e incluso para termo-regular (Lillywhite 1970).

Sin duda el tamaño es un determinante en la dieta de cualquier especie y eso es notorio en nuestras observaciones (Woodward y Hildrew 2002). Para sustentarse, los adultos necesitan integrar diferentes vías tróficas, lo que se observa en nuestros datos en que suman presas de mayor tamaño (i.e. vertebrados), lo que lo pone en mayores posiciones tróficas (Arim et al. 2010).

Un aspecto interesante es el bajo número de anfibios nativos encontrados en contenido estomacal de los adultos. Los reportes del sur de Brasil muestran que la rana toro está consumiendo una mayor diversidad de anuros (Boelter et al. 2007; Silva et al. 2011; Silva et al. 2016). Esta diferencia se podría deber a la etapa temprana de invasión, en la que las poblaciones de rana toro estaban confinadas a ciertos cuerpos de agua, que se encontraban muy alterados. Concretamente no había mucha presencia de anuros nativos en ellos. Es de esperar que esta situación varíe durante el proceso de expansión que está ocurriendo en Aceguá (Capítulo 2).

Otro aspecto bien notorio de nuestras observaciones es el canibalismo de larvas y juveniles por parte de los individuos de mayores tamaños (un fenómeno densodependiente). Esto ha sido evidenciado en varios estudios de dieta (Bury y Whelan 1984 y citas arriba), comprendiendo sus congéneres una fracción importante de la dieta (Stuart y Painter 1993), y puede ser una estrategia tanto de regulación poblacional como de integración de mayores vías energéticas de las redes tróficas (Mayntz y Toft 2006). El canibalismo es un fenómeno muy reportado en anfibios, que a nivel individual genera una aceleración del crecimiento con

beneficios en la supervivencia o la reproducción (Fox, 1975; Polis, 1981). Por otro lado, el canibalismo actúa como una fuerza de depredación intraespecífica, generando una importante regulación de la estructura y la dinámica poblacional (Fox, 1975, Ziemba y Collins , 1999, Park et al. 2005). Esta regulación tiene un impacto tan significativo en las poblaciones invasoras de rana toro, que Govindarajulu y colaboradores (2005), mediante un análisis de opciones de control en un modelo matricial, llegan a la conclusión de que la eliminación de adultos puede conducir a una mayor supervivencia de las etapas tempranas postmetamórficas, a través de la reducción del canibalismo. De hecho, los juveniles normalmente ven afectado su comportamiento por el canibalismo de los adultos, generando un mayor uso de refugios, lo que incluso podría afectar su dieta (Foster et al. 1988).

Debemos considerar que el canibalismo resulta preocupante para las especies invasoras, por generar la dispersión de los juveniles (DeAngelis et al. 1980). Sin duda este tipo de comportamiento debe ser considerado a la hora de aplicar planes de manejo y control de la especie. En resumen, los adultos caníbales, que están regulando la población, deberían ser los últimos en ser removidos (Govindarajulu et al. 2005). Considerando que encontramos que los machos son tan caníbales como las hembras, podrían ser los grandes machos los últimos en removerse.

Comprender más y mejor de la historia natural y las interrelaciones de las especies exóticas invasoras es una herramienta fundamental para su control. La dieta nos informa acerca de cómo se sustenta y como se coloca en la nueva red trófica un depredador exótico, por tanto parece ser un insumo necesario que el país debería contar para todos los invasores.

Referencias

- Adams M, Pearl C (2007) Problems and opportunities managing invasive Bullfrogs: is there any hope? In: Gherardi F (ed) Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats. Springer Netherlands.
- Afonso LG, Carvalho R, Santos FM dos, et al (2010) Reprodução da exótica rã-touro *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Amphibia, Anura, Ranidae) em riachos de Mata Atlântica no estado de Minas Gerais, Brasil. Biotemas 23:85–91.
- Afonso LG, Eterovick PC (2007) Microhabitat choice and differential use by anurans in forest

- streams in southeastern Brazil. *J Nat Hist* 41:937–948.
- Aguiar O, Bacci M, Lima AP, et al (2007) Phylogenetic relationships of *Pseudis* and *Lysapsus* (Anura, Hylidae, Hylinae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Cladistics* 23:455–463.
- Akmentins MS, Pereyra LC, Lescano JN (2009) Primer registro de una población asilvestrada de rana toro (*Lithobates catesbeianus*) en la provincia de Córdoba, Argentina: Notas sobre la biología de la especie. *Cuad Herpetol* 23:25–32.
- Arim M, Abades SR, Laufer G, et al (2010) Food web structure and body size: trophic position and resource acquisition. *Oikos* 119:147–153.
- Batista M, Silva M, Barreto C (2015) Effects of introduction and decline of a Bullfrog population (*Lithobates catesbeianus*) in a community of amphibians in the Cerrado from Central Brazil. *Herpetol Notes* 8:263–265.
- Bauer JT (2012) Invasive species: “back-seat drivers” of ecosystem change? *Biol Invasions* 14:1295–1304.
- Bellard C, Cassey P, Blackburn TM (2016) Alien species as a driver of recent extinctions. *Biol Lett* 12:20150623.
- Beringer J, Johnson TR (1995) *Rana catesbeiana* (bullfrog): diet. *Herpetol Rev* 26:98.
- Blackburn TM, Essl F, Evans T, et al (2014) A Unified Classification of Alien Species Based on the Magnitude of their Environmental Impacts. *PLoS Biol* 12:e1001850.
- Boelter RA, Cechin SZ, others (2007) Impact of the Bullfrog diet (*Lithobates catesbeianus*-Anura, Ranidae) on native fauna: case study from the region of Agudo-RS-Brazil. *Nat Conserv* 5:115–123.
- Both C, Grant T (2012) Biological invasions and the acoustic niche: the effect of bullfrog calls on the acoustic signals of white-banded tree frogs. *Biol Lett* 8:714–716.
- Both C, Lingnau R, Santos-Jr A, et al (2011) Widespread Occurrence of the American Bullfrog, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura: Ranidae), in Brazil. *South Am J Herpetol* 6:127–134.
- Both C, Madalozzo B, Lingnau R, Grant T (2014) Amphibian richness patterns in Atlantic Forest areas invaded by American bullfrogs. *Austral Ecol* 39:864–874.
- Both C, Melo AS (2015) Diversity of anuran communities facing bullfrog invasion in Atlantic Forest ponds. *Biol Invasions* 17:1137–1147.
- Brazeiro A (2015): Biodiversidad, conservación y desarrollo en Uruguay. En: Brazeiro A. (ed.). *Eco-Regiones de Uruguay: Biodiversidad, Presiones y Conservación. Aportes a la Estrategia Nacional de Biodiversidad.* Facultad de Ciencias, CIEDUR, VS-Uruguay, SZU. Montevideo.
- Brasileiro CA, Sawaya RJ, Kiefer MC, Martins M (2005) Amphibians of an open cerrado fragment in southeastern Brazil. *Biota Neotropica* 5:93–109.
- Brooks Jr GR (1964) An analysis of the food habits of the bullfrog, *Rana catesbeiana*, by body size, sex, month, and habitat. *Va J Sci New Ser* 15:173–186.
- Bruggers RL (1973) Food habits of bullfrogs in northwest Ohio. *Ohio J Sci* 73:185-188.
- Brunoli E, Dabiezies MJ, Clemente JM, Muniz P (2011) *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) en el sistema de embalses del Rio Negro, Uruguay. *Oecologia Aust* 15:576–592.
- Bury RB, Whelan JA (1984) Ecology and management of the bullfrog. U.S. Fish and Wildlife Service 155.
- Ceballos G, Ehrlich PR, Barnosky AD, et al (2015) Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Sci Adv* 1:e1400253.
- Chao A, Jost L (2012) Coverage-based rarefaction and extrapolation: standardizing samples by

- completeness rather than size. *Ecology* 93:2533–2547.
- Clavero M, Brotons L, Pons P, Sol D (2009) Prominent role of invasive species in avian biodiversity loss. *Biol Conserv* 142:2043–2049.
- Clavero M, Garcia-Berthou E (2005) Invasive species are a leading cause of animal extinctions. *Trends Ecol Evol* 20:110–110.
- Cortizas S (2014) Respuestas asimétricas de los anuros nativos ante la invasión de rana toro. Tesina de Grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.
- Crooks JA (2002) Characterizing ecosystem-level consequences of biological invasions: the role of ecosystem engineers. *Oikos* 97:153–166.
- Davis MA (2003) Biotic globalization: does competition from introduced species threaten biodiversity? *Bioscience* 53:481–489.
- Davis MA (2009) *Invasion Biology*. Oxford University Press, USA
- de Pascual AD, Guerrero C (2008) Diet composition of bullfrogs, *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae) introduced into the Venezuelan Andes. *Herpetol Rev* 39:425.
- de Sa RO, Lavilla EO (1997) The tadpole of *Pseudis minuta* (Anura: Pseudidae), an apparent case of heterochrony. *Amphib-Reptil* 18:229–240.
- DeAngelis DL, Cox DK, Coutant CC (1980) Cannibalism and size dispersal in young-of-the-year largemouth bass: experiment and model. *Ecol Model* 8:133–148.
- Dick JT, Gallagher K, Avlijas S, et al (2013) Ecological impacts of an invasive predator explained and predicted by comparative functional responses. *Biol Invasions* 15:837–846.
- Didham RK, Tylianakis JM, Hutchison MA, et al (2005) Are invasive species the drivers of ecological change? *Trends Ecol Evol* 20:470–474.
- Dodd CK (2010) *Amphibian ecology and conservation: a handbook of techniques*. Oxford University Press
- Ficetola GF, Thuiller W, Miaud C (2007) Prediction and validation of the potential global distribution of a problematic alien invasive species—the American bullfrog. *Divers Distrib* 13:476–485.
- Foster SA, Garcia VB, Town MY (1988) Cannibalism as the cause of an ontogenetic shift in habitat use by fry of the threespine stickleback. *Oecologia* 74:577–585.
- Fox LR (1975) Cannibalism in natural populations. *Annu Rev Ecol Syst* 6: 87–106.
- Gahl MK, Calhoun AJ, Graves R (2009) Facultative use of seasonal pools by American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Wetlands* 29:697–703.
- Galli L, Pereira A, Márquez A, Mazzoni R (2006) Ranavirus detection by PCR in cultured tadpoles (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) from South America. *Aquaculture* 257:78–82.
- Garda AA, Santana DJ, São-Pedro VA (2010) Taxonomic characterization of Paradoxical frogs (Anura, Hylidae, Pseudae): geographic distribution, external morphology, and morphometry. *Zootaxa* 2666:1–28.
- Gobel N (2013) Efectos comunitarios de la invasión de rana toro *Lithobates catesbeianus* en Aceguá, Cerro Largo. Tesina de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.
- Gobel N, Cortizas S, Mautone JM, et al (2012) Predation of *Pseudis minuta* Günther 1858, by *Lethocerus annulipes* (Heteroptera: Belostomatidae). *Cuad Herpetol* 27:63–63.
- Govindarajulu P, Altwegg R, Anholt BR (2005) Matrix model investigation of invasive species control: bullfrogs on Vancouver Island. *Ecol Appl* 15:2161–2170.
- Gurevitch J, Padilla DK (2004) Are invasive species a major cause of extinctions? *Trends Ecol Evol* 19:470–474.

- Heyer R, Donnelly MA, Foster M, McDiarmid R (2014) Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians. Smithsonian Institution
- Hiari T (2004) Diet composition of introduced bullfrog, *Rana catesbeiana*, in the Mizorogaike Pond of Kyoto, Japan. *Ecol Res* 19:375–380.
- Hirai T (2002) Ontogenetic change in the diet of the pond frog, *Rana nigromaculata*. *Ecol Res* 17:639–644.
- Howard RD (1981) Sexual dimorphism in bullfrogs. *Ecology* 62:303–310.
- Hsieh TC, Ma KH, Chao A (2016) iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods Ecol. Evol.*
- Huckembeck S, Claudino M, Correa F, et al (2012) The activity patterns and microhabitat use of *Pseudis minuta* Günther, 1858 (Anura, Hylidae) in the Lagoa do Peixe National Park, a biosphere reserve of the Brazilian subtropics. *Braz J Biol* 72:331–336.
- Iñiguez CA, Morejón FJ (2012) Potential Distribution of the American Bullfrog (*Lithobates Catesbeianus*) in Ecuador. *South Am J Herpetol* 7:85–90.
- Iop S, Lipinski VM, Madalozzo B, et al (2015) Re-description of the external morphology of *Phyllomedusa iheringii* Boulenger, 1885 larvae (Anura: Hylidae), with comments on the external morphology of tadpoles of the *P. burmeisteri* group. *Acta Herpetol* 10:67–72.
- Jancowski K, Orchard S (2013) Stomach contents from invasive American bullfrogs *Rana catesbeiana* (= *Lithobates catesbeianus*) on southern Vancouver Island, British Columbia, Canada. *NeoBiota* 16:17-37.
- Kafer ÁL, Boelter RA, Cechin SZ (2007) Reproductive biology of the invasive bullfrog *Lithobates catesbeianus* in southern Brazil. *Ann. Zool. Fennici* 44:435–444.
- Kats LB, Ferrer RP (2003) Alien predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. *Divers Distrib* 9:99–110.
- Kiesecker JM, Blaustein AR (2008) Effects of Introduced Bullfrogs and Smallmouth Bass on Microhabitat Use, Growth, and Survival of Native Red-Legged Frogs (*Rana aurora*). *Conserv Biol* 12:776–787.
- Kolenc F, Borteiro C, Alcalde L, et al (2008) Comparative larval morphology of eight species of *Hypsiboas* Wagler (Amphibia, Anura, Hylidae) from Argentina and Uruguay, with a review of the larvae of this genus. *Zootaxa* 1927:1–66.
- Kraus F (2009) Alien reptiles and amphibians: a scientific compendium and analysis. Springer Verlag
- Langone JA (1993) Notas sobre *Phyllomedusa iheringii* Boulenger, 1885 (Amphibia, Anura, Hylidae). *Comun Zool Mus Hist Montev* 12:1–7.
- Laufer G, Canavero A, Núñez D, Maneyro R (2008) Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) invasion in Uruguay. *Biol Invasions* 10:1183–1189.
- Laufer G, Gobel N, Mautone JM, et al (2014) First report of satellite males during breeding in *Leptodactylus latrans* (Amphibia, Anura). *Cuad Herpetol* 28:37-38.
- Laufer G, Maneyro R (2008) Experimental Test of Intraspecific Competition Mechanisms Among Tadpoles of *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). *Zoolog Sci* 25:286–290.
- Laufer G, Piñeiro-Guerra JM, Pereira-Garbero R, et al (2009) Distribution extension of *Scinax aromothyella* (Anura, Hylidae). *Biota Neotropica* 9:275–277.
- Leivas PT, Leivas FWT, Moura MO (2012) Diet and trophic niche of *Lithobates catesbeianus* (Amphibia: Anura). *Zool Curitiba* 29:405–412.
- Lillywhite HB (1970) Behavioral temperature regulation in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Copeia* 1970:158–168.

- Logan M (2011) Biostatistical design and analysis using R: a practical guide. John Wiley & Sons
- Lowe S, Browne M, Boudjelas S, De Poorter M (2000) 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database. Invasive Species Specialist Group Auckland, New Zealand
- Maneyro R, Carreira S (2012) Guía de Anfibios del Uruguay. Ediciones de la Fuga
- Maneyro R, Naya DE, Rosa I, et al (2004) Diet of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura, Leptodactylidae) in Uruguay. *Iheringia Sér Zool* 94:57–61.
- Mayntz D, Toft S (2006) Nutritional value of cannibalism and the role of starvation and nutrient imbalance for cannibalistic tendencies in a generalist predator. *J Anim Ecol* 75:288–297.
- Mazzoni R, Cunningham AA, Daszak P, et al (2003) Emerging Pathogen in Wild Amphibians and Frogs (*Rana catesbeiana*) Farmed for International Trade. *Emerg Infect Dis* 9:995–998.
- Mazzoni R, de Mesquita AJ, Fleury LFF, et al (2009) Mass mortality associated with a frog virus 3-like Ranavirus infection in farmed tadpoles *Rana catesbeiana* from Brazil. *Dis Aquat Organ* 86:181–191.
- Medeiros CI, Both C, Kaefer IL, et al (2016) Reproductive phenology of the American Bullfrog in subtropical Brazil: photoperiod as a main determinant of seasonal activity. *An Acad Bras Ciênc* 88.
- Mugnai R, Nessimian JL, Baptista DF (2010) Manual de identificação de macroinvertebrados aquáticos do Estado do Rio de Janeiro: para atividades técnicas, de ensino e treinamento em programas de avaliação da qualidade ecológica dos ecossistemas lóticos. Technical Books Editora
- Nori J, Akmentins M, Ghirardi R, et al (2011a) American bullfrog invasion in Argentina: where should we take urgent measures? *Biodivers Conserv* 20:1125–1132.
- Nori J, Urbina-Cardona JN, Loyola RD, et al (2011b) Climate change and American Bullfrog invasion: what could we expect in South America? *PloS One* 6:e25718.
- Park, S. R., Jeong, J. Y., & Park, D. (2005). Cannibalism in the Korean salamander (*Hynobius leechii*: Hynobiidae, caudata, amphibia) larvae. *Integrative Biosciences*, 9: 13-18.
- Pearl CA, Adams MJ, Bury RB, McCreary B (2004) Asymmetrical effects of introduced bullfrogs (*Rana catesbeiana*) on native ranid frogs in Oregon.
- Polis GA (1981) The evolution and dynamics of intraspecific predation. *Annu Rev Ecol Syst* 12: 225-251.
- Polo-Cavia N, Gonzalo A, López P, Martín J (2010) Predator recognition of native but not invasive turtle predators by naïve anuran tadpoles. *Anim Behav* 80:461–466.
- Prigioni C, Borteiro C, Kolenc F (2011) Amphibia and Reptilia, Quebrada de los Cuervos, Departamento de Treinta y Tres, Uruguay. *Check List* 7:763–767.
- Quiroga LB, Moreno MD, Cataldo AA, et al (2015) Diet composition of an invasive population of *Lithobates catesbeianus* (American Bullfrog) from Argentina. *J Nat Hist* 49:1703–1716.
- Ruibal M, Laufer G (2012) Bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Amphibia: Ranidae) tadpole diet: description and analysis for three invasive populations in Uruguay. *Amphib-Reptil* 33:355–363.
- Salo P, Korpimäki E, Banks PB, et al (2007) Alien predators are more dangerous than native predators to prey populations. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 274:1237–1243.
- Sanabria E, Ripoll Y, Jordan M, et al (2011) Nuevo registro de rana toro americana (*Lithobates catesbeianus*) en San Juan, Argentina. *Rev Mex Biodivers* 82:311–313.
- Santana DJ, de Medeiros Magalhães F, de Avelar São Pedro V, et al (2016) Calls and tadpoles of

- the species of *Pseudis* (Anura, Hylidae, Pseudae). *Herpetol J* 26:139–151.
- Scalera R (2007) An overview of the natural history of non-indigenous amphibians and reptiles. In: Gherardi F (ed) *Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats*. Springer Netherlands, pp 141–160.
- Schloegel LM, Ferreira CM, James TY, et al (2010) The North American bullfrog as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. *Anim Conserv* 13:53–61.
- Schloegel LM, Toledo LF, Longcore JE, et al (2012) Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Mol Ecol* 21:5162–5177.
- Silva ET da, Both C, Filho OPR (2016) Food Habits of Invasive Bullfrogs and Native Thin-Toed Frogs Occurring in Sympatry in Southeastern Brazil. *South Am J Herpetol* 11:25–33.
- Silva ETD, Filho OPR, Feio RN (2011) Predation of Native Anurans by Invasive Bullfrogs in Southeastern Brazil: Spatial Variation and Effect of Microhabitat use by Prey. *South Am J Herpetol* 6:1–10.
- Solé M, Rödder D (2010) Dietary assessments of adult amphibians. *Amphib Ecol Conserv Handb Tech Oxf Univ Press Oxf* 167–184.
- Stuart JN, Painter CW (1993) *Rana catesbeiana* (bullfrog) cannibalism. *Herpetol Rev* 24:103.
- Teixeira de Mello F, González-Bergonzoni I, Loureiro M (2011) *Peces de agua dulce del Uruguay*. PPR-MGAP, Montevideo.
- Vaz-Ferreira R, Gehrau A (1975) Comportamiento epimelético de la rana común *Leptodactylus ocellatus* (L.) (Amphibia, Leptodactylidae) I. Atención de la cría y actividades alimentarias y agresivas relacionadas. *Physis* 34:1–14.
- Wang Y, Wang Y, Lu P, et al (2008) Diet composition of post-metamorphic bullfrogs (*Rana catesbeiana*) in the Zhoushan archipelago, Zhejiang Province, China. *Front Biol China* 3:219–226.
- Wilbur HM (1997) Experimental ecology of food webs: complex systems in temporary ponds. *Ecology* 78:2279–2302.
- Woodward G, Hildrew AG (2002) Body-size determinants of niche overlap and intraguild predation within a complex food web. *J Anim Ecol* 71:1063–1074.
- Wu Z, Li Y, Wang Y, Adams MJ (2005) Diet of introduced Bullfrogs (*Rana catesbeiana*): predation on and diet overlap with native frogs on Daishan Island, China. *J Herpetol* 39:668–674.
- Zank C, Di-Bernardo M, Maneyro R, et al (2010) Spatial and temporal distribution of *Pseudis minuta* (Anura, Hylidae, Hylinae) and environmental variables related to its reproductive activity in Reserva Biológica do Lami, southern Brazil. *Iheringia Sér Zool* 100:145–150.
- Ziegler L, Maneyro R (2008) Clave para la identificación de los anfibios de Uruguay:(chordata: amphibia). Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Instituto de Biología, Sección Zoología Vertebrados
- Ziemba RE, Collins JP (1999) Development of size structure in tiger salamanders: the role of intraspecific interference. *Oecologia* 120: 524-529.
- Zuur AF, Ieno EN, Smith GM (2007) *Analysing Ecological Data*. Springer New York, New York, NY

Capítulo 4: Quitridiomicosis en el ensamble de anfibios nativos invadido por la rana toro en Aceguá.

Resumen

El hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), un desafío a la conservación de anfibios, se conoció inicialmente en asociación a eventos de mortalidad masiva, pero actualmente se sabe que persiste en prácticamente todo el mundo con efectos no siempre notorios. La idea del presente estudio fue el de realizar el relevamiento de este patógeno en el ensamble de anuros adultos de Aceguá, invadida por la rana toro *Lithobates catesbeianus* (vector global de Bd). Se realizaron colectas en primavera y verano de la temporada 2012-2013 en siete charcos, con diferentes tiempos de invasión (desde fuertemente invadidos a no invadidos). Estos anuros fueron hisopados, medidos, pesados y se analizó su contenido estomacal. En las 11 especies analizadas la prevalencia promedio (determinada por PCR de punto final) fue elevada, más de un 40%, aunque descendió fuertemente en verano, con el incremento de la temperatura. Una sola de las especies nativas, *Hypsiboas pulchellus*, presentó un menor estado corporal (peso/largo) en los individuos infectados por Bd. Además, a nivel de ensamble se observó un decaimiento del volumen de ingesta de los individuos de mayores tallas infectados por Bd. Notoriamente los charcos con menores prevalencias fueron los invadidos por rana toro, seguramente debido a una disminución en la riqueza y abundancia de las comunidades. Las altas persistencias y la evidencia de efectos no letales de Bd, marcan que esta enfermedad podría estar afectando a las comunidades nativas.

Introducción

El hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* Longcore et al., 1999 (Bd) tiene una distribución global, afectando a un amplio espectro de anfibios y las predicciones a futuro plantean que incluso experimentará una mayor expansión (Xie et al. 2016). Mucho ha cambiado la forma de ver a este patógeno, desde los registros iniciales asociados con declinaciones poblacionales, hasta la idea actual del quitridio como un patógeno global con cada vez más hospederos (Fisher et al. 2009; Voyles et al. 2011; Lips 2016). Hoy sabemos que si bien este patógeno tiene una larga historia de coexistencia con los anfibios, la quitridiomycosis es una enfermedad emergente que probablemente haya aumentado recientemente su virulencia con la aparición de nuevas cepas (James et al. 2015). En un número limitado de especies y comunidades los efectos del ingreso del quitridio fueron evidentemente catastróficos, pero hoy tenemos un panorama complejo de interpretar con la enfermedad distribuida a nivel global en más de 700 especies con efectos no tan notorios (Olson et al. 2013). Esto ha modificado el foco inicial de respuesta, donde el único objetivo parecía ser el extirpar a las especies de anfibios de un medio hostil para criarlas *ex situ*, lejos de esta amenaza (Berger et al. 1999; Pounds et al. 2006), hasta una idea actual de un patógeno extendido, cuyos efectos resultan necesarios de entender y manejar en las comunidades nativas (Lips 2016).

Varios factores, como la identidad, la virulencia, el origen y los modos de dispersión global de la quitridiomycosis siguen siendo un tema sin resolver, por la existencia de evidencia contradictoria. Se está describiendo una diversidad de cepas poco comprendida hasta el momento, incluyendo una especie específica de las salamandras, que podrían tener diferentes orígenes y modos de dispersión (Crawford et al. 2010; Berger et al. 2016). De hecho, aparecen diferentes modos de dispersión y persistencia en los distintos ecosistemas (e.g. Kolby et al. 2015) y posiblemente otros sustratos o estrategias donde Bd podría persistir (McMahon et al. 2013; James et al. 2015). Todo esto pone en cuestionamiento el marco teórico existente, pero existe un consenso que se ha mantenido en cuanto al rol del tráfico internacional de especies como vector global de la enfermedad (Weldon et al. 2004; Fisher y Garner 2007; Gratwicke et al. 2009; Schloegel et al. 2009). La rana toro, el anfibio más extendido a nivel global por la acción del hombre, es el mayor candidato para este mecanismo de dispersión (Mazzoni et al. 2003; Schloegel et al. 2009; Schloegel et al. 2010; Schloegel et al. 2012; Greenspan et al. 2012; Miaud

et al. 2016). Esta idea se apoya en que *L. catesbeianus* está globalmente infectada por quitridio (Garner et al. 2006; Bai et al. 2010a; Kadekaru et al. 2016) y es resistente a la enfermedad (Daszak et al. 2004; Gervasi et al. 2013). La evidencia empírica indica que esta especie tiene una variada prevalencia de infección, que puede ser desde muy baja (Athán et al. 1998; Garner et al. 2006; Bai et al. 2010a), pasando por valores intermedios (Bai et al. 2010a) y hasta casos donde se ha encontrado una proporción muy alta de individuos infectados (Hanselmann et al. 2004; Garner et al. 2006; Schloegel et al. 2009). En este sentido, un trabajo reciente de Miaud y colaboradores (2016) propone que remover a la rana toro de los ecosistemas naturales sería una forma efectiva de luchar contra el avance de la quitridiomycosis.

En Uruguay y la región sabemos poco de la historia del ingreso del quitridio, su distribución y efectos, la información disponible se remite a unos pocos casos reportados (Borteiro et al. 2009; Bardier et al. 2011). Recientemente Borteiro (2016) revisa y amplía significativamente el conocimiento acerca de las especies afectadas por esta enfermedad en Uruguay, por lo que a la fecha conocemos que Bd afecta a *Dendropsophus sanborni*, *Hypsiboas pulchellus*, *Scinax squalirostris*, *Julianus uruguayus*, *Pseudis minutus*, *Leptodactylus latrans*, *Limnomedusa macroglossa*, *Melanophryniscus sanmartini*, *Physalaemus henselii*, *Pleurodema bibroni*, *Odontophrynus maisuma* y a la invasora *L. catesbeianus*. Bd parece estar distribuido por todo el país, tal como lo predicen los modelos de adecuación de nicho (Olson et al. 2013). A pesar del avance que implica este trabajo en relación a los nuevos datos de prevalencias y distribución del quitridio, no presenta un foco de análisis comunitario, concentrándose mayormente en especies de interés (por problemas de conservación o por presentar otras patologías asociadas), con colectas dispersas. A pesar del rol que la rana toro tendría como vector, no contamos al momento con una evaluación de quitridiomycosis en las comunidades uruguayas invadidas por esta especie.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia, persistencia y los costos a nivel de huésped de la infección de *B. dendrobatidis* en un ensamble de anuros nativos de Aceguá, Cerro Largo, un sitio invadido por rana toro. Esto se realizó mediante un estudio prospectivo de individuos adultos de las comunidades de siete charcos durante la primavera-verano de 2012-2013.

Hipótesis y predicciones: Considerando la evidencia existente, planteamos que la rana toro estaría jugando un rol de vector y amplificador de la quitridiomycosis en los cuerpos de agua invadidos en Aceguá. Sus hábitos acuáticos (medio de Bd) y su tolerancia a la quitridiomycosis generarían una alta disponibilidad de esporas en forma permanente en los cuerpos de agua invadidos, donde las comunidades nativas tendrán una mayor prevalencia de la enfermedad. Las comunidades no invadidas por la rana toro deberían tener una menor prevalencia de quitridio. Esta prevalencia se acentuará en las estaciones frías (condiciones óptimas para Bd) y en las especies más dependientes del medio acuático. Finalmente, a nivel de individuos del ensamble nativo el portar a Bd generaría un costo metabólico (de contrarrestar los efectos negativos de la enfermedad, especialmente la osmo-regulación), por lo que deberían verse perjudicados en el acceso a los recursos, lo que finalmente tendrá un efecto en su tamaño o estado corporal.

Metodología

Sitio de estudio

Se realizaron dos muestreos, uno del 18 al 22 de octubre de 2012 y el otro del 4 al 7 de febrero de 2013 en siete charcos en la zona invadida por rana toro en la localidad de Aceguá, Departamento de Cerro Largo (ver sitio de estudio Capítulo 3). El número de cuerpos de agua muestreados estuvo determinado por el reducido número de charcos invadidos por rana toro en 2012. En base al seguimiento anual que se ha realizado en el área desde el año 2007, se pudo categorizar a los charcos estudiados por grado de invasión. Esta clasificación considera el tiempo de invasión de rana toro a la fecha de los muestreos, en tres categorías: los invadidos con más de cinco años, los recientemente invadidos (considerando que en esa fecha se inicia la detección del proceso de expansión) y los no invadidos (Figura 4.1). Esta categorización se vió reflejada en que en los cuerpos de agua invadidos con más de cinco años aparecían adultos, larvas y puestas, mientras que los recientemente invadidos tenían solamente adultos en densidades menores.

Los diferentes estudios que se han realizado en el área nos permitieron conocer las comunidades estudiadas. En dichos charcos no se observa una diferencia significativa en las densidades del plancton, ni en el ensamble de macroinvertebrados acuáticos, en relación al grado e invasión de rana toro. Los efectos de esta invasión se observaron mayormente en una disminución en riqueza y abundancia de los diferentes estadios ontogénicos de anfibios y un

aumento en las densidades y tallas de peces (Laufer et al. 2008; Ruibal and Laufer 2012; Gobel 2013; Capítulo 3; Cortizas 2014).

En cuanto a las variables ambientales, se realizó un registro estacional de pH en cada uno de los cuerpos de agua en los meses de mayo, julio y octubre de 2012 y febrero de 2013. Además se relevó la temperatura máxima y mínima mediante los registros disponibles en la web del Instituto Nacional de Meteorología de la estación meteorológica más próxima disponible en Melo, Cerro Largo (Figura 4.2).

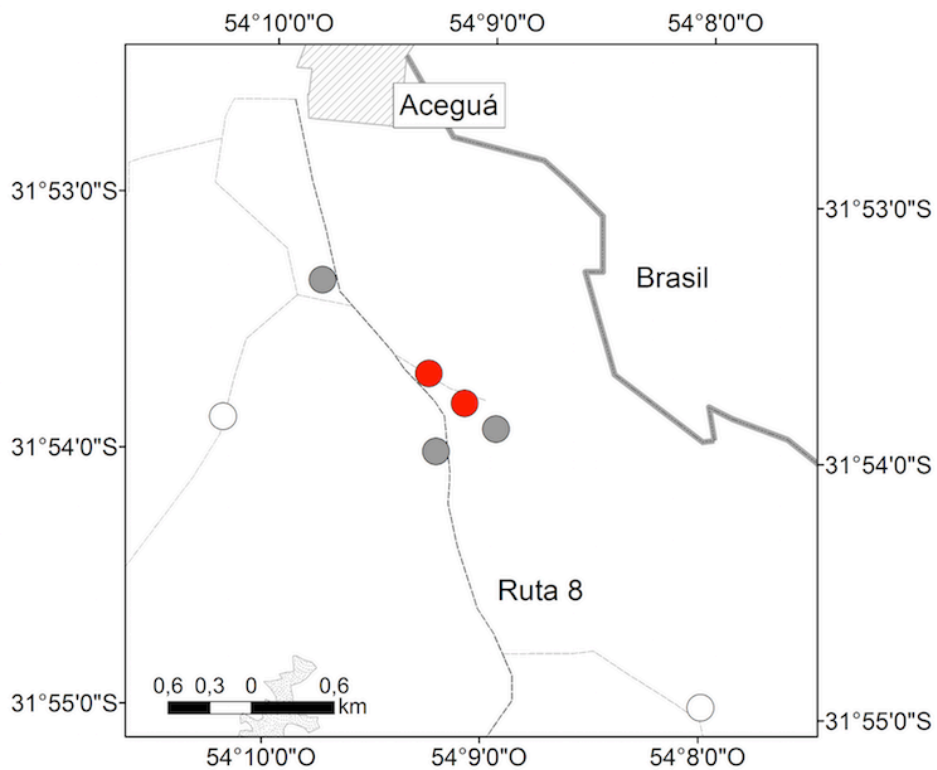


Figura 4.1: Sistema de charcos estudiados en la localidad de Aceguá, Cerro Largo, en 2012 y 2013. En rojo aparecen los cuerpos de agua invadidos al menos desde 2007, en gris los recientemente invadidos y en blanco los no invadidos por rana toro.

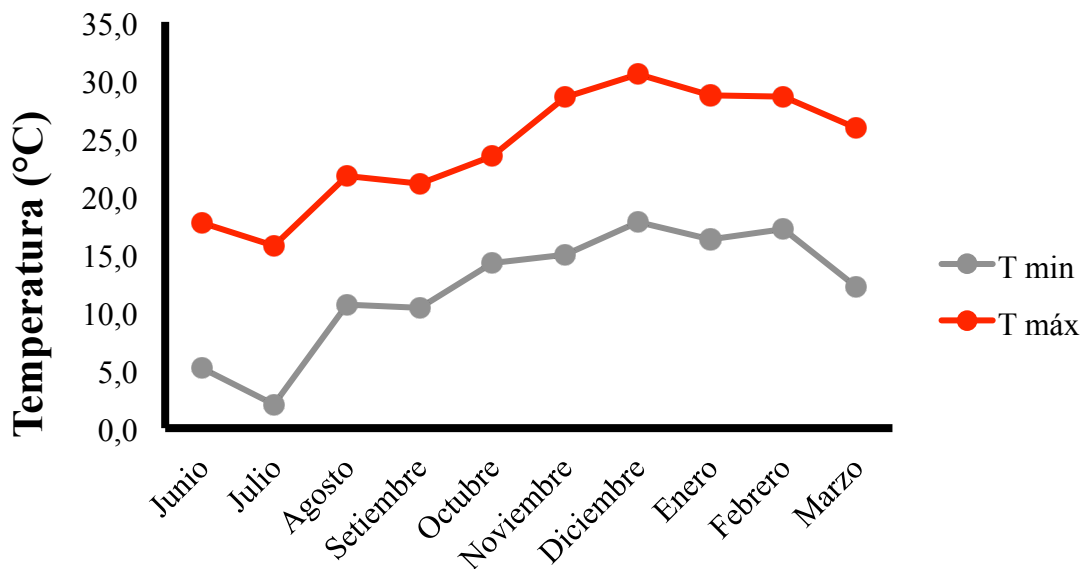


Figura 4.2: Temperaturas ambiente máximas (rojo) y mínimas (gris) mensuales para el período junio de 2012 a marzo de 2013. Datos del Instituto Nacional de Meteorología para la estación meteorológica de Melo, Cerro Largo.

Muestreo de campo

Los muestreos consistieron en recorridas a paso lento, de 20 minutos, por cada uno de los siete charcos entre las 20 y las 23 horas, el momento de mayor actividad de anfibios (Heyer et al. 2014). Durante este muestreo se colectó individuos adultos de las diferentes especies en forma manual, teniendo especial cuidado en aislar cada individuos en bolsas independientes, de forma de evitar contaminación (Brem et al. 2007). Luego del muestreo se montó un laboratorio de campo, donde se realizó la determinación específica y la extracción de muestras de quitridio. Se trabajó con sumo cuidado, cambiando guantes y esterilizando instrumental entre individuos, para realizar el hisopado (Medical Wire and Equipment, code MW113; método descrito en Capítulo 2), luego medirlos con calibre (longitud hocico cloaca, LHC) y pesarlos en balanza digital. A partir de los datos de campo, se obtuvo a nivel individual el estado corporal como la relación peso-largo. Dicho parámetro es un indicador de la disponibilidad de presas y/o de la calidad del hábitat (Sztatecsny y Schabetsberger 2005; Amo et al. 2007), de la vulnerabilidad a la depredación (Murray 2002) y de la probabilidad de sobrevivencia (Hoey y McCormick 2004).

Los hisopados siguieron una metodología intensiva para evitar falsos negativos (Simpkins et al. 2015). Una vez tomadas las muestras, los ejemplares fueron sacrificados con una sobredosis de Eugenol y fijados en formol comercial al 10%. Los hisopos fueron enfriados en campo y mantenidos a -20°C hasta el momento de su procesamiento en laboratorio.

Determinación de infección por PCR convencional

A partir de los hisopados se realizó la extracción de ADN mediante kits comerciales (Quiagen DNeasy Blood & Tissue Kit, Cat No./ID: 69504) para luego amplificar un segmento del gen 18S RNA característico de *B. dendrobatidis*, de 300 pares de bases por PCR convencional (Annis et al. 2004). Para esto se utilizaron los primers Bd1a (5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3') y Bd2a (5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3'), bajo las condiciones recomendadas por estos autores, consistentes en una desnaturalización inicial a 93°C durante 10 min, seguida por 30 ciclos de 93°C en 45 s, 61°C en 45 s y 72°C en 1 min, finalizando con una extensión de 72°C durante 10 min. Los productos de amplificación por PCR fueron analizados en geles de poliacrilamida 12 %, considerando positivos los casos en que se encontraba la banda correspondiente al fragmento del tamaño especificado.

Se utilizó como control negativo agua purificada y ADN extraído de hígado de un anfibio nativo (*Melanophryniscus montevidensis* de la colección privada BKT 2427). Como control positivo se utilizó una muestra de la cepa de la colección del laboratorio de School of Biology & Ecology, de la University of Maine de Estados Unidos (*Bd* JEL 423), donde Joyce E. Longcore describió este patógeno (Longcore et al. 1999). Además varios casos positivos fueron secuenciados y analizados por cortes histológicos para confirmar el diagnóstico (Borteiro 2016).

Análisis de contenido estomacal

En el laboratorio se realizó el análisis de contenido estomacal de todos los anuros adultos colectados durante el muestreo. El estudio se realizó mediante la disección de cada individuo fijado en formol, en la cual se extrajo el estómago y su contenido fue extendido en una placa de Petri para análisis bajo lupa binocular. Los ítems alimenticios encontrados fueron identificados al mayor nivel taxonómico posible, con la ayuda de claves regionales de identificación (Heckman 2006; Heckman 2008; Ziegler y Maneyro 2008; Bentancourt Pérez et al. 2009; Mugnai et al.

2010; Heckman 2011; Heckman 2012). Se registró el número de cada ítem alimenticio encontrado en todos los individuos analizados. Para cada presa encontrada se midió el largo y de ancho con un calibre digital para luego calcular su volumen mediante la ecuación de un elipsoide: $V=4/3\pi*l*a*a$, donde l es el largo y a el ancho de la presa.

Análisis de datos

La prevalencia, entendida como la proporción de individuos infectados con quitridio (positivos en el PCR de punto final) en el total de la población, fue obtenida para todo el ensamble en ambos muestreos, pero también a nivel de cada uno de los siete charcos y por especie. Las comparaciones estacionales, se hicieron para el ensamble completo y para las tres especies más comunes del sistema, de las que se contaba con un mayor número de muestras. Los intervalos de confianza (IC) al 95% que se presentaron en las tablas, se estimaron mediante la fórmula de Wilson, la cual es adecuada para muestra más pequeñas y no requiere mínimos de casos positivos ni negativos (Brown et al. 2001). Las diferencias en las proporciones de la prevalencia fueron testeadas mediante la prueba de Chi cuadrado, con un α de 0,05 (Sokal y Rohlf 2009).

Para evaluar el costo de la quitridiomycosis a nivel de individuo se modeló el estado corporal para el ensamble completo de anuros nativos (excluyendo los individuos de rana toro) mediante un modelo lineal con las variables infección (0 y 1), grado de invasión de rana toro (0: no invadido, 1: solo adultos, 2: adultos y larvas), fecha y la interacción entre dichas variables: $\ln(\log \text{ estado corporal} \sim \text{quitridiomycosis} * \text{grado invasión rana toro} * \text{fecha})$. Dado que la variable de estado corporal no presentó una distribución normal, se trabajó con su logaritmo natural (el cual si siguió una distribución normal).

Posteriormente se evaluó el costo de la infección a nivel de individuo, dentro de cada especie. Para cada uno de los anuros nativos que estuvo representado por más de 6 ejemplares se evaluó si su estado corporal variaba en relación la presencia de quitridiomycosis. Para esto se realizó un ANOVA de una vía que incluye como variable independiente la presencia de quitridiomycosis en dos niveles: 0 para no infectados y 1 para infectados.

Finalmente se exploró la ocurrencia de diferencias en la ingesta individual, en relación a la presencia de quitridiomycosis. Como posibles variables de respuesta que indicaran un efecto en la dieta, se utilizó la riqueza específica (entendida como el número de presas diferentes consumidas), el número de presas y el volumen de presas. Se exploró la existencia de relación entre cada una de estas variables con el tamaño corporal (LHC), la fecha de muestreo, el grado de invasión de rana toro y la quitridiomycosis. Se fueron probando los posibles modelos lineales con las diferentes combinaciones de estas variables y sus interacciones. Luego, mediante un análisis de co-varianza ANCOVA se probó si existían diferencias en número, volumen y riqueza de presas a nivel de especie en función de la quitridiomycosis, utilizando el LHC como co-variable (Zuur et al. 2007; Logan 2011).

Resultados

Prevalencias de quitridio

El total de la muestra analizada fue de 195 individuos, correspondientes a 10 especies de anuros nativos y la exótica rana toro (Tabla 4.1). La prevalencia de quitridio en la comunidad nativa evaluada en Aceguá fue de 41,6 %, para el total de la muestra. Esta prevalencia fue relativamente alta para la mayor parte del ensamble estudiado, pero ocurrió cierta variación entre especies estadísticamente significativa (Figura 3; $X^2=25,64$; $gl=10$; $p<0,01$). Las diferencias observadas no estuvieron asociadas a ninguna familia ni género, ni tipo de hábitos, ni modos reproductivos (Capítulo 3). Al contrario, se observaron los mayores niveles de prevalencia repartidos entre las diferentes especies presentes (Figura 4.3), de forma tal que, por ejemplo una especie acuática (*P. minuta*) presentó niveles de infección similares a las ranas arborícolas como *H. pulchellus* o *S. granulatus*.

Entre las especies en que observamos menores niveles de individuos afectados se destacan dos, *D. minutus* y la invasora *L. catesbeianus*. Otras tres especies con prevalencias menores a un 40% fueron *D. sanborni*, *P. falcipes* y *L. latrans*. Luego, las restantes seis especies presentaron prevalencias mayores, entre las que destacan por su intensidad *P. biligonigerus*, *S. granulatus* y *P. minuta* (Figura 4.3, Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Especies de anuros relevadas en la localidad de Aceguá, Cerro Largo, en búsqueda de quitridiomycosis, mediante hisopado y análisis de PCR convencional. Se presenta la prevalencia, entendida como la proporción de individuos infectados en el total de la muestra (n), por especie. Se incluyen los intervalos de confianza al 95%, determinados por el método de Wilson.

Especie	Prevalencia	n	IC 95% inferior	IC 95% superior
<i>D. minutus</i>	0	3	0	0,65
<i>D. sanborni</i>	0,33	18	0,16	0,56
<i>H. pulchellus</i>	0,48	21	0,28	0,68
<i>L. catesbeianus</i>	0,05	20	0,01	0,24
<i>L. latrans</i>	0,39	59	0,28	0,52
<i>P. falcipes</i>	0,30	3	0,11	0,6
<i>P. biligonigerus</i>	0,77	13	0,5	0,92
<i>P. iheringii</i>	0,43	7	0,16	0,75
<i>P. minuta</i>	0,56	32	0,39	0,72
<i>S. granulatus</i>	0,60	10	0,31	0,83
<i>S. squalirrostris</i>	0,44	9	0,19	0,73

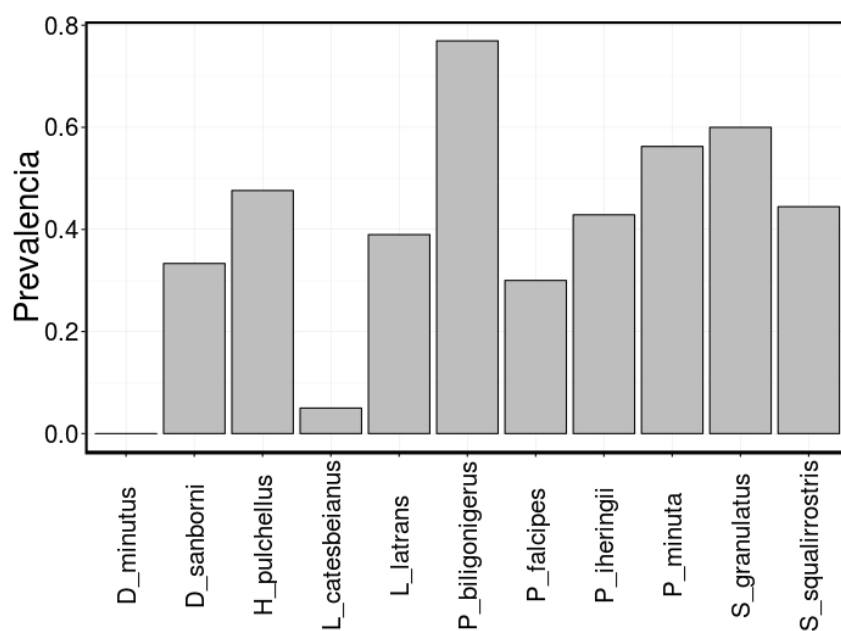


Figura 4.3. Prevalencia específica de quitridiomycosis en el ensamble de anuros de siete charcos estudiados en la localidad de Aceguá, Cerro Largo.

A nivel de los charcos evaluados, observamos que la prevalencia de quitridio varió significativamente (Tabla 2; $X^2=23,89$; $gl=6$; $p<0,001$). Observamos una importante variación, desde un 14% a un 65% de individuos infectados. Los dos charcos con más de cinco años de invasión de *L. catesbeianus* fueron los que presentaron menor prevalencia, seguidos por los recientemente invadidos, finalmente los no invadidos fueron los de mayor prevalencia (Figura 4.4).

El relevamiento de pH de los diferentes sistemas no arrojó resultados que puedan ser asociados con estas prevalencias (Tabla 4.3), para los datos estacionales o la media anual. De hecho, los charcos que se ubicaron fuera del rango óptimo de Bd—con niveles de pH entre 6 y 7 (Piotrowski et al. 2004)—fueron los que tuvieron mayores prevalencias.

Tabla 4.2. Cuerpos de agua relevadas en la localidad de Aceguá, Cerro Largo, en búsqueda de quitridiomycosis, mediante hisopado y análisis de PCR convencional. Se presenta la prevalencia, entendida como la proporción de individuos infectados en el total de la muestra de cada charco (n). Se incluyen los intervalos de confianza inferior y superior al 95%, determinados por el método de Wilson.

Sistema	Prevalencia	n	IC 95% inf	IC 95% sup
Charco 1	0,31	35	0,19	0,48
Charco 2	0,14	21	0,05	0,35
Charco 3	0,25	16	0,1	0,49
Charco 4	0,51	49	0,37	0,64
Charco 5	0,56	27	0,37	0,72
Charco 6	0,65	34	0,48	0,79
Charco 7	0,22	18	0,09	0,45

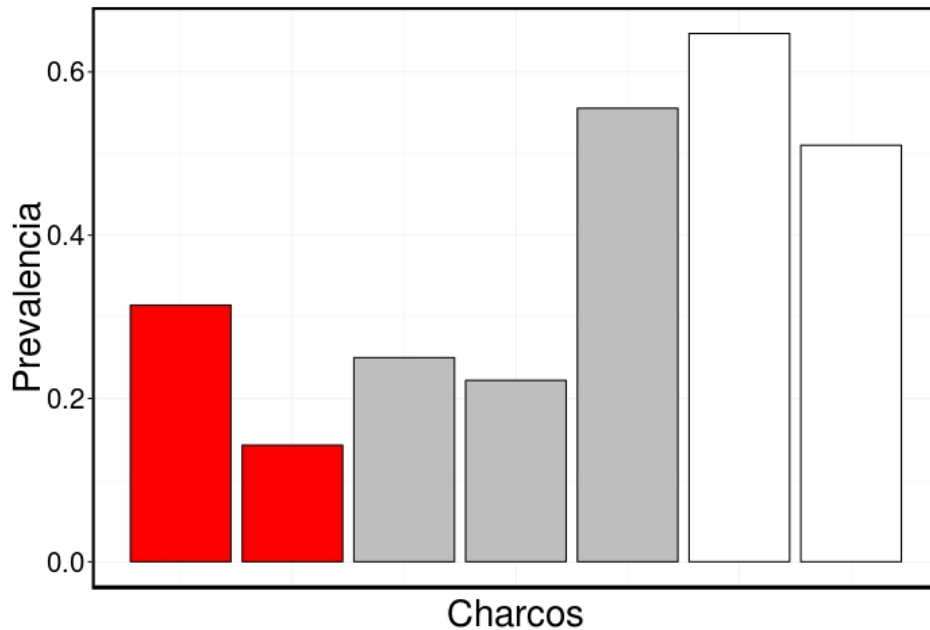


Figura 4.4. Número de individuos infectados, sobre el total de analizados (prevalencia de quitridiomycosis) a nivel del ensamble de anuros de los siete charcos relevados en la localidad de Aceguá, Cerro Largo. En rojo aparecen los cuerpos de agua invadidos al menos de 2007, en gris los recientemente invadidos y en blanco los no invadidos por rana toro.

Tabla 4.3. Registros de pH en los cuerpos de agua relevadas en la localidad de Aceguá, Cerro Largo. Se presencia la prevalencia total detectada de quitridiomycosis y los valores de pH tomados en muestreos de campo en las cuatro estaciones consecutivas, y el promedio anual para cada cuerpo de agua.

Sistema	Prevalencia	Registros de pH 2012 – 2013				
	observada	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Media anual
Charco 1	0,31	7	7,6	7,4	5,3	6,8
Charco 2	0,14	7,6	7,5	8,9	6,8	7,7
Charco 3	0,25	7,7	8	7,3	7,8	7,7
Charco 4	0,51	6,5	6,4	5,7	4,6	5,8
Charco 5	0,56	7,3	7,5	7,8	6,5	7,3
Charco 6	0,65	9	10,1	9,9	8,7	9,4
Charco 7	0,22	sd	7,9	7,4	7,8	7,7

En cuanto a la prevalencia estacional, observamos que fue mucho mayor en el primer muestreo que en el segundo para el ensamble completo (Figura 4.5). De hecho, se observa un fuerte descenso en la proporción de individuos infectados del ensamble, desde un 60% a un 20% aproximadamente. Dos de las especies más comunes (*L. latrans* y *P. minuta*) presentaron el mismo patrón, con una fuerte caída en la prevalencia en el segundo muestreo. En cambio, la rana *H. pulchellus* presentó un patrón diferente, con un pequeño incremento de los individuos infectados en el segundo muestreo (Figura 4.5).

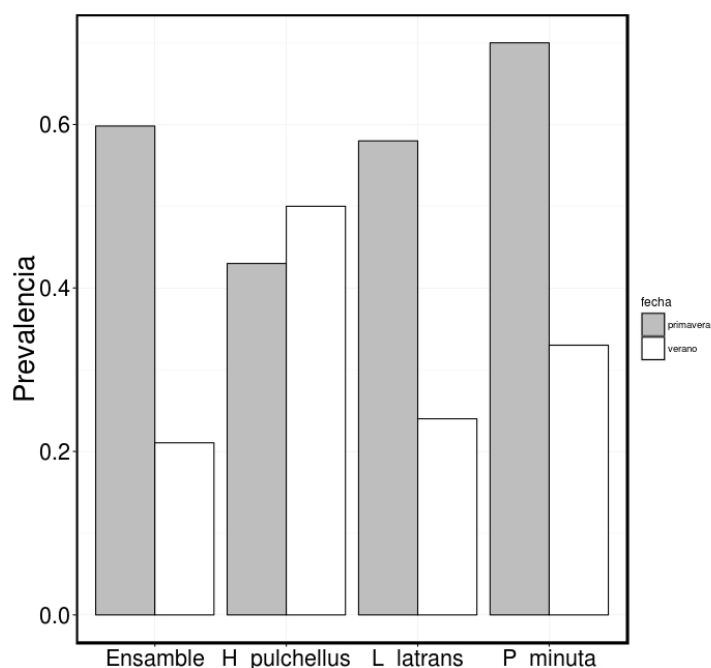


Figura 4.5. Prevalencia específica de quitridiomycosis a nivel del ensamble de anuros de los siete charcos relevados en la localidad de Aceguá, Cerro Largo, en el muestreo de primavera (gris) y verano (blanco). Los datos de proporción de individuos infectados de ambas temporadas se presentan para el ensamble completo de anuros y para las tres especies más colectadas, que fueron *H. pulchellus*, *L. latrans* y *P. minuta*.

Costos a nivel de individuo

El estado corporal de los individuos del ensamble completo y el de la mayoría de las especies no pudo ser explicado por la infección con quitridio. Explorando los datos obtenidos mediante el análisis de varianza, no se pudo encontrar diferencias significativas en las variables de condición individual (tamaño corporal LHC, ni estado corporal) asociadas a la infección con quitridio. La única especie en que se encontró una diferencia significativa en el tamaño corporal entre los individuos infectados y los no infectados por quitridiomycosis, fue *H. pulchellus*

($F_1=7,65$; p-valor 0,013). En esta especie, el estado corporal de los individuos infectados es realmente inferior a los no infectados, registrándose una diferencia promedio de un 20% aproximadamente (Figura 4.6).

El análisis comparativo de la dieta del ensamble y las diferentes especies en relación a la quitridiomycosis no arrojó diferencias significativas. No se detectaron diferencias, en el número de presas ($F_{1,175}=2,065$; p-valor=0,152), ni la riqueza ($F_{1,175}=1,344$; p-valor=0,247) de la ingesta en el análisis de ANCOVA (con LHC como co-variable) entre individuos infectados y no infectados por Bd.

El único fenómeno en dieta que pudimos detectar a través de nuestro análisis de modelo lineales fue un efecto sobre el volumen de presas consumido por individuo del ensamble completo, asociado a la interacción del LHC con la quitridiomycosis ($F_{1,174}=4,04$; p-valor=0,046). Si bien el ajuste de nuestras observaciones no fue muy alto ($R^2=0,26$), se trata de un efecto estadísticamente significativo. En los individuos sin quitridio, el volumen aumenta asociado a la talla, siendo los individuos más grandes los que consumen un mayor volumen de presas. Sin embargo, en los individuos infectados con quitridio, se observa un decaimiento en el volumen de ingesta el las tallas mayores a 70 mm, correspondiente mayormente a *P. iheringii* y *L. latrans* (Figura 4.7).

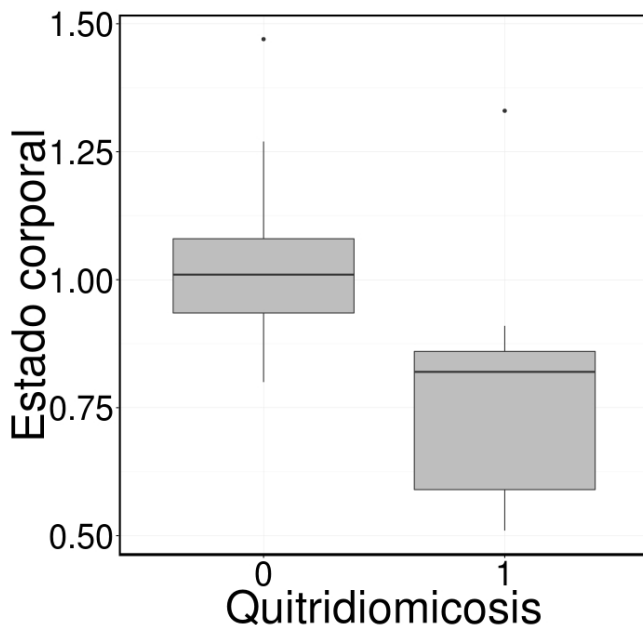


Figura 4.6. Estado corporal a nivel individual de *H. pulchellus* en relación a la presencia de quitridiomycosis (0=no infectado, 1=infectado), en de los siete charcos relevados en la localidad de Aceguá, Cerro Largo.

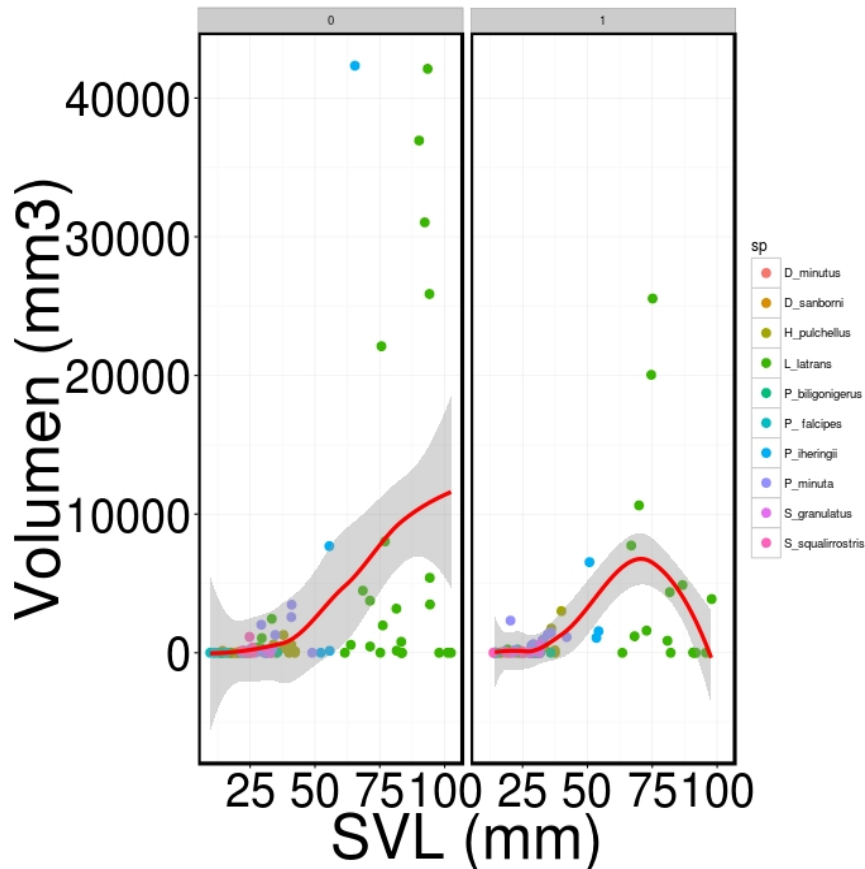


Figura 4.7. Volumen de ingesta promedio del ensamble de anuros estudiado en Aceguá, Cerro Largo, en relación a su tamaño corporal, medido por la longitud hocico cloaca. Se presenta dicha relación para individuos con y sin quitridio (0=no infectado, 1=infectado).

Discusión

El presente es el primer estudio a nivel de un ensamble completo, de presencia y efectos de la quitridiomycosis en anuros nativos de Uruguay y también el primero para una sitio invadido por rana toro de la región. Nuestro estudio revela la existencia de una amplia presencia de Bd en la comunidad estudiada, afectando prácticamente a todas las especies presentes y con altas prevalencias, condicionadas por la estacionalidad. Además, si bien revela un bajo costo a nivel individual de la infección, en estado corporal e ingesta, aparece un efecto sobre el volumen de ingesta de los individuos de mayores tamaños corporales del ensamble.

Prevalencias de quitridio

A partir de nuestros resultados y de un estudio reciente (Borteiro 2016) se amplia significativamente el conocimiento de la presencia del quitridio en Uruguay. Entre nuestras observaciones se agregan a la lista de huéspedes conocidos del quitridio en nuestro país, a tres

nuevas especies de anuros: *Scinax granulatus*, *Phyllomedusa iheringii* y *Physalaemus biligonigerus*. Esto indica que el quitridio está ampliamente distribuido entre las especies nativas, sugiriendo que su presencia debería estar mayormente asociada a las condiciones ambientales que a las especies. Los niveles de individuos infectados no parecen estar asociados a los hábitos o la filogenia de los anuros, si bien dentro del ensamble que relevamos existe una relativamente importante diversidad de especies y hábitos no aparece ningún patrón de prevalencia que pueda asociarse a las predicciones del marco teórico. Por ejemplo, no hay una afección mayor de las especies más relacionadas con el medio acuático, ni en sitios de mayor temperatura como se puede predecir a partir de la evidencia de otras regiones (Ocock et al. 2013; Rowley y Alford 2013; Berger et al. 2016). La única especie en la que no se encontró presencia de quitridio fue *Dendropsophus minutus*, pero su baja representación en la muestra, únicamente con tres individuos, hace difícil sacar conclusiones (Figura 4.3). De todas formas se hace necesario relevar si esta especie es afectada, ya que ha sido calificada recientemente como una especie en peligro, con riesgo de extinción en las listas rojas nacionales (Carreira y Maneyro 2015).

Los valores que observamos de prevalencia y de especies infectadas se encuentran en un nivel elevado con respecto a lo que se conoce a nivel internacional. Sin embargo la evidencia existente muestra una gran variación de niveles de prevalencia del patógeno (Grant et al. 2008; Bai et al. 2012; Richards-Hrdlicka et al. 2013; Agostini y Burrowes 2015). En un estudio de la base de datos global de quitridio, Olson y colaboradores (2013) encontraron que de 4281 individuos hisopados para análisis molecular, en más de 50 países, el 48% fueron positivos para infección de quitridio. Ante el conocimiento existente al momento, resulta muy difícil interpretar el significado o las implicancias en conservación de los altos niveles de quitridiomycosis que encontramos en Aceguá. En una reciente revisión, Lips (2016) concluye que, más allá de los eventos puntuales de retrocesos numéricos probados que llamaron fuertemente la atención de la comunidad internacional de investigadores, las interacciones huésped-patógeno resultan mucho más complejas de lo que inicialmente se pensó y que la larga co-ocurrencia podría haber permitido el desarrollo de resistencia en los anfibios o incluso la pérdida de virulencia del patógeno. De todas formas, los antecedentes globales nos deben poner alerta frente a la importante presencia de esta infección en especies nativas, por su potencial negativo y por su interacción con otras amenazas (Fisher et al. 2009; Collins et al. 2009). Lo interesante sería

poder comenzar a generar información regional acerca de las cepas presentes, sus efectos y su dinámica dentro de las comunidades nativas. En este sentido, resulta fundamental evaluar el rol de cada especie en la transmisión de Bd. El interés radica en encontrar cuáles especies están actuando como amplificadoras de la enfermedad; ya que además de la rana toro, alguna nativa podría también estar teniendo este rol (Fernández-Beaskoetxea et al. 2016; Scheele et al. 2016).

Nuestro estudio comunitario estacional, resulta útil para analizar los determinantes ambientales de la ocurrencia de Bd, fundamentalmente la temperatura y el pH. Si bien el número de charcos relevado fue reducido, nuestras observaciones de prevalencias no parecen estar determinadas por el pH (Tabla 4.3), pero sí estarían relacionadas con la temperatura (Berger et al. 2005; Voyles et al. 2011; Gründler et al. 2012). Estos resultados muestran que la prevalencia de quitridio disminuyó en el muestreo con mayores temperaturas ambiente durante los meses previos, información que no estaba hasta el momento relevada para ensambles de anuros de la región (Figura 4.5). El descenso en prevalencia con el incremento de la temperatura es un fenómeno ampliamente reportado y responde a las condiciones de tolerancia de las esporas de quitridio (McDonald et al. 2005; Phillott et al. 2013). Existe evidencia de una relación importante de la prevalencia de quitridio con la temperatura del aire en los 30 días previos, reportando una fuerte caída hacia el verano, en un anuro en Australia (Kriger y Hero 2007). La temperatura ambiente determina la dinámica poblacional de Bd, y por tanto es fundamental considerarla en programas de conservación y ante las predicciones de cambio climático (Kriger y Hero 2007). La enfermedad resulta mitigada en las temperaturas altas y se ve beneficiada de temperaturas frías (Skerratt et al. 2010; Aziz et al. 2011). Este hecho resulta interesante ya que varias de las especies que han mostrado retrocesos numéricos en Uruguay en las últimas décadas presentan picos de actividad reproductiva durante los meses fríos del invierno (e.g. Kolenc et al. 2009).

Un aspecto interesante que surgió del análisis de la prevalencia estacional en las especies más frecuentes fue que, a diferencia de lo que sucede con el ensamble y las otras especies más comunes (i.e. *L. latrans* y *P. minuta*), *H. pulchellus* no exhibió este descenso en el porcentaje de individuos infectados con el aumento de la temperatura (Figura 4.5). Dicho resultado resulta contrastante con lo reportado para la misma especie en el Departamento de Rocha por Borteiro (2016), donde sí ocurre un descenso notorio en los niveles de infección con Bd durante los meses

cálidos. Justamente, Ghirardi (2012) plantea que los hábitos de actividad invernal de *H. pulchellus* la hacen más susceptible a la quitridiomycosis. Sin embargo nuestras observaciones nos hacen pensar nuevamente en que se trata de un sistema más complejo de lo que sospechamos y que a nivel de especie podrían actuar otros factores como determinantes de la prevalencia, como el uso de micro hábitat. De hecho, ciertas especies cuya actividad es marcadamente mayor en verano como *P. iheringii* (Langone 1993) aparecieron igualmente infectadas por quitridio en porcentajes importantes. Sin duda se requerirá de más investigación para poder aclarar las causas de las diferentes prevalencias entre especies y en diferentes condiciones ambientales (Lips 2016).

Costos del quitridio

Los costos de la infección de quitridiomycosis pueden ser tan variables, que van desde la extinción de especies a un efecto neutral (Kilpatrick et al. 2010; Voyles et al. 2011). Sin embargo, tal como es de esperar, la mayoría de los estudios se han centrado en los casos de efectos severos y es poco lo que se conoce acerca de los efectos no letales del Bd (Berger et al. 1999; Crawford et al. 2010). La mayor parte de este conocimiento de costos de la infección se ha generado de estudios con renacuajos, principalmente en condiciones experimentales. Por ejemplo, algunos estudios encontraron que la infección con Bd puede afectar el forrajeo de las larvas (Venesky et al. 2009; Hanlon et al. 2015), efecto que fue ulteriormente explicado por el daño visible en sus estructuras de queratina del disco oral (Venesky et al. 2010). Basados en esto, nuestra hipótesis consistía en que deberíamos encontrar un efecto de la infección en el estado corporal de los anfibios nativos, asociado a la respuesta inmunitaria o comportamental desplegada ante la enfermedad. Sin embargo, entre las diez especies analizadas únicamente encontramos un efecto del quitridio en el estado corporal de la rana trepadora *H. pulchellus*, paradójicamente una de las especies más comunes y frecuentes en todo el Uruguay (Nunez et al. 2004). Efectivamente, el estado corporal (entendido como la relación largo-peso) de los individuos infectados de esta especie fue inferior al de los no infectados (Figura 4.6). De todas formas, este resultado puede ser cuestionado por tratarse de un análisis de varias especies, en el que se podía considerar un α menor (por ejemplo de 0,025). En un estudio reciente, Poorter y Ronsenblum (2016) lograron asociar el detrimento en estado corporal de una especie susceptible a Bd, con una mayor cantidad de daño histológico a nivel de la epidermis. Una vez que sabemos

que el quitridio está tan presente en nuestro país, resulta prioritario identificar las especies nativas más afectadas, su status de conservación y sus mayores amenazas.

El otro atributo que exploramos en relación a los costos de Bd fue la ecología trófica, a través del análisis del contenido estomacal. Nuestra hipótesis planteaba que debería existir un efecto de la quitridiomycosis en la capacidad de adquisición de recursos de los individuos. Esto debería haberse reflejado mayormente en la riqueza de la ingesta, ya que los individuos infectados podrían perder la capacidad e acceso a ciertos recursos o cambiar su conducta de forrajeo. Si bien esto ha sido demostrado para larvas de anuros infectadas en condiciones experimentales (Hanlon et al. 2015), y para algunas especies en adultos (Searle et al. 2011b), nosotros no logramos identificar ningún efecto de Bd en la riqueza ni en el número de presas ingeridas. En cambio, sí encontramos un efecto significativo, aunque leve, en el volumen de la ingesta individual (Figura 4.7). Según el modelo seleccionado, los individuos de mayores tallas infectados con quitridio, consumen un menor volumen de presas que los no infectados. Esto tiene la lógica de un detrimento en la actividad por la infección y un mayor efecto en los individuos de mayor tamaño (DeMarchi et al. 2015; An y Waldman 2016). Este efecto los ejemplares de mayores tamaños, pertenecientes mayormente a las especies *L. latrans* y *P. iheringii*, puede resultar importante por lo que debe ser relevado en futuros estudios. Los individuos infectados tendrían una dificultad de acceso a las presas de mayores tamaños, transformando su dieta en composición hacia presas más pequeñas, de menor valor energético.

Entendiendo que los individuos infectados tendrían un costo por la actividad inmunitaria y osmótica, podría ocurrir un aumento en el consumo de los individuos infectados, para obtener mayor energía. En salamandras se ha encontrado evidencia de un efecto en el consumo de una presa en laboratorio, el cual se ha atribuido a un mecanismo compensatorio de los costos inmunológicos de la infección (Hess et al. 2015). Si bien esto es discordante con nuestros resultados, lo interesante es estos autores tampoco encuentra una alteración en el estado corporal por la infección, por lo que es probable que muchas especies sean capaces en condiciones normales de tolerar y contrarrestar los costos de la infección (Hess et al. 2015). Probablemente esto sea un mayor problema para los individuos de mayores tallas, quienes si parecen tener un efecto negativo en el volumen de ingesta.

Finalmente corresponde tomar estos resultados con prudencia por el bajo ajuste del modelo de volumen y por no poder detectar esas diferencias en ninguna especie en particular (incluyendo a las de gran talla como *L. latrans* o *P. iheringii*). Si bien nuestros resultados sugieren que podría existir un efecto en el volumen, entendemos que corresponde realizar una aproximación más profunda porque no logramos evidenciar claramente efectos importantes de Bd en la ecología del ensamble nativo.

El rol de la rana toro

A más de 30 años de la introducción de la rana toro en Uruguay, se hace muy difícil el relevar su rol como vector de introducción de la quitridiomycosis. Además, hoy conocemos que los mecanismos de dispersión de esta enfermedad son diversos en asociación al medio acuático (Johnson and Speare 2003; Berger et al. 2005; Kolby et al. 2015), lo que nos hace pensar en que sus esporas deberían haber sido diseminadas muy tempranamente, a través de los efluentes de los sistemas de acuicultura abiertos en los que se alojó originalmente las ranas (Carnevia 2008). De esta forma entendemos que aún si la rana toro hubiese estado actuado como vector del quitridio, esta enfermedad se debería haber adelantado mucho en su momento de invasión con una alta presión de propágulos por sus zoosporas móviles. Seguramente esto haya sucedido, ya que la rana toro se encuentra globalmente infectada (Garner et al. 2006; Fisher y Garner 2007) y la infección de Bd fue identificada dentro de los criaderos de Uruguay (Mazzoni et al. 2003). El problema es que seguramente este patógeno estaba presente en las comunidades nativas antes de la introducción e invasión de la rana toro (Lips 2014; Borteiro 2016). La forma de resolver esta interrogante es a través de estudios de cepas con varias secuencias mayores a las que nosotros analizamos.

El hecho de haber encontrado una baja prevalencia de Bd en nuestras muestras de hisopados de rana toro no nos dice nada acerca de su rol en el sistema; como es de esperar que las poblaciones de rana toro introducidas en Uruguay sean resistentes a la enfermedad, como sucede en otras regiones. Los niveles de prevalencia en esta especie son variables en diferentes estudios y regiones (Garner et al. 2006; Bai et al. 2010b; Kadkaru et al. 2016), aunque parecen ser altos en su distribución nativa (Richards-Hrdlicka et al. 2013) y en Brasil (Schloegel et al. 2012). En una revisión reciente a escala global, se reveló que las enfermedades introducidas por invasores

tienen en la mayoría de los casos una mayor virulencia en los huéspedes nativos que en los exóticos (Lymbery et al. 2014).

Lo que resulta interesante de nuestras observaciones es la baja prevalencia de los ensambles de anuros de los charcos invadidos por *L. catesbeianus* (Figura 4.4). Contrariamente a lo esperado, encontramos un menor número relativo de anfibios infectados por Bd en dichos sistemas que en los recientemente invadidos y aún menor que en los no invadidos. Esto nos hace pensar que si bien a gran escala ambas invasiones (rana toro y Bd) actúan negativamente sobre la biodiversidad de anfibios, a escala local puede estar sucediendo algo diferente.

Sin duda los charcos invadidos por rana toro en Uruguay presentan una estructura comunitaria fuertemente alterada (Laufer et al. 2008). Una característica de estos charcos más invadidos es la menor riqueza de especies nativas (Capítulo 3), con menores abundancias de larvas y adultos (Gobel 2013; Cortizas 2014). Esta alteración en la estructura comunitaria podría ser la causa de la disminución de la prevalencia del patógeno. Esta idea es diferente a lo esperado para otras enfermedades (LoGiudice et al. 2003; e.g. Johnson et al. 2013), donde la riqueza estaría generando un efecto de dilución de los patógenos (Schmidt y Ostfeld 2001). Searle y colaboradores (2011a) y Venesky y colaboradores (2014) encontraron que a riqueza del ensamble atenúa la prevalencia de Bd en sistemas experimentales. Posteriormente se reporta que si bien existe un efecto de dilución, la identidad de las especies presentes puede afectar mucho las prevalencias comunitarias (Becker et al. 2014).

Sin embargo la evidencia del rol de la riqueza en la persistencia y prevalencia de Bd es controversial. Contrariamente a la idea de la dilución, en comunidades naturales se ha reportado una serie de evidencias que indican que las comunidades muy degradadas y de baja diversidad, presentan una menor prevalencia de quitridio (Kriger y Hero 2007; Richards-Hrdlicka et al. 2013). La amplia diversidad de huéspedes Bd podría tener un efecto diferente al de la dilución, generando un mecanismo de persistencia de la enfermedad en las comunidades, ya que esta diversidad asegura la ocurrencia de especies con diferentes fenologías y estrategias, y por tanto diferentes momentos del año en contacto con el medio acuático, tanto de adultos como de larvas (Skerratt et al. 2007; Fisher et al. 2009). Esto aseguraría la persistencia de zoosporas de la enfermedad durante todo el año en el sistema y por tanto generaría mayores prevalencias.

Esta menor prevalencia ha sido reportada hasta el momento en sistemas fuertemente alterados por la degradación de hábitat (Becker y Zamudio 2011), la agricultura intensiva (Lips et al. 2003; Bielby et al. 2008; Sluys and Hero 2010; Agostini and Burrowes 2015), los sistemas urbanos (Saenz et al. 2015) y los sistemas naturales luego de fuertes disturbios (Scheele et al. 2014; Roznik et al. 2015). Si bien esto no había sido explorado hasta el momento en relación a las especies invasoras, probablemente la respuesta sea la misma (Figura 4.8).

La rana toro está actuando como un depredador tope, y a la idea propuesta se debe agregar la evidencia que demuestra que la exposición a un depredador puede reducir la infección por quitridio (Groner y Relyea 2015). Seguramente esta caída en la prevalencia se pueda asociar a la caída en la riqueza y la abundancia de los hospederos nativos por depredación (Torchin et al. 2005; Colwell et al. 2012). Además la presencia de la rana toro podría incluso alterar el uso del hábitat por las especies nativas, acortando el período larval (Kiesecker y Blaustein 1998; Boone et al. 2004) y disminuyendo el tiempo de contacto de los adultos con el agua (Chivers et al. 2001).

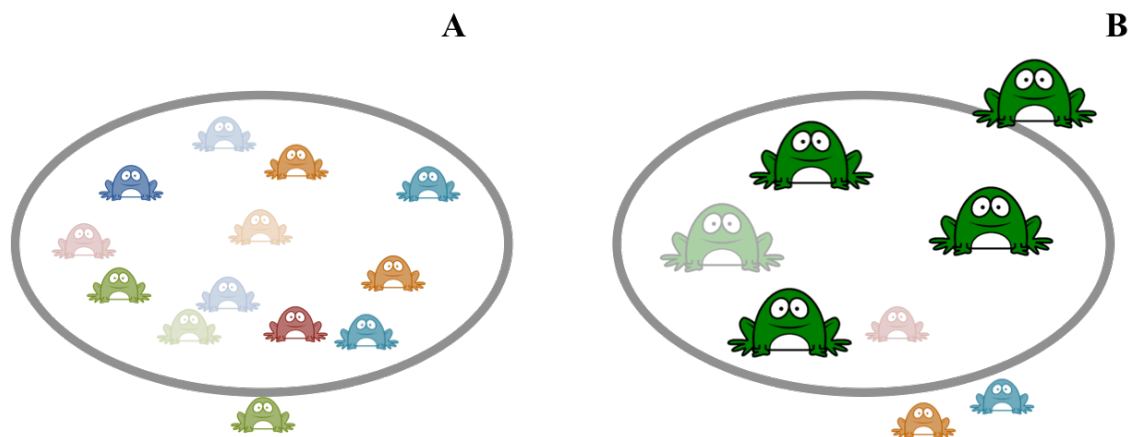


Figura 4.8. Posible respuesta del ensamblaje de especies nativas en un charco a la presencia de quitridio (A, las infectadas son más claras) y su alteración ante la invasión de rana toro como un depredador voraz de gran tamaño (B, *L. catesbeianus* representada por ranas verdes grandes). La invasión de rana toro puede generar una disminución en riqueza y abundancia de hospederos nativos (de colores claros) y alterar el uso del medio acuático.

Este sería el primer caso en que se relaciona la invasión de la rana toro con un decrecimiento en la prevalencia de la quitridiomycosis. Sin duda se hace necesario ampliar la evidencia a otros sistemas para poder confirmar esta idea. Un caso interesante en este sentido

sería evaluar la introducción de otros depredadores acuáticos que no sean afectados por Bd, tal como sucede con los salmónidos (Kats y Ferrer 2003). Sin duda existe la creciente necesidad de integrar el estudio de las enfermedades al conocimiento de invasiones para entender estos mecanismos y actuar en medidas de conservación, manejo y restauración (Young et al. 2016). A escala local entraría en contraste la idea de promover la biodiversidad con la de controlar a Bd, tal como sucede con restaurar el contexto periférico del ambiente de los cuerpos de agua (Scheele et al. 2015). Las decisiones en materia de conservación resultan muy complicadas en sistemas complejos, sobre los que aún conocemos muy poco. Este será uno de los mayores desafíos a futuro en la conservación de anfibios a nivel internacional.

Referencias

- Agostini MG, Burrowes PA (2015) Infection patterns of the chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, on anuran assemblages in agro-ecosystems from Buenos Aires Province, Argentina. *Phyllomedusa J Herpetol* 14:113–126.
- Amo L, Lopez P, Martín J (2007) Habitat deterioration affects body condition of lizards: a behavioral approach with *Iberolacerta cyreni* lizards inhabiting ski resorts. *Biol Conserv* 135:77–85.
- An D, Waldman B (2016) Enhanced call effort in Japanese tree frogs infected by amphibian chytrid fungus. *Biol Lett* 12:20160018.
- Annis SL, Dastoor FP, Ziel H, et al (2004) A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *J Wildl Dis* 40:420–428.
- Athan E, Allworth AM, Engler C, et al (1998) Chytrid fungus in Europe. *Pathology (Phila)* 30:62–4.
- Aziz A, Bin MN, Skerratt LF, McCallum HH (2011) Dynamics of chytridiomycosis in a Tasmanian frog community. *Herpetol Rev* 42:53–57.
- Bai C, Garner T, Li Y (2010a) First Evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in China: Discovery of Chytridiomycosis in Introduced American Bullfrogs and Native Amphibians in the Yunnan Province, China. *EcoHealth* 7:127–134.
- Bai C, Garner TW, Li Y (2010b) First evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in China: discovery of chytridiomycosis in introduced American bullfrogs and native amphibians in the Yunnan Province, China. *EcoHealth* 7:127–134.
- Bai C, Liu X, Fisher MC, et al (2012) Global and endemic Asian lineages of the emerging pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* widely infect amphibians in China. *Divers Distrib* 18:307–318.
- Bardier C, Ghirardi R, Levy M, Maneyro R (2011) First case of chytridiomycosis in an adult specimen of a native anuran from Uruguay. *Herpetol Rev* 42:65–66.
- Becker CG, Rodriguez D, Toledo LF, et al (2014) Partitioning the net effect of host diversity on an emerging amphibian pathogen. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 281:20141796.
- Becker CG, Zamudio KR (2011) Tropical amphibian populations experience higher disease risk in natural habitats. *Proc Natl Acad Sci* 108:9893–9898.
- Bentancourt Pérez CM, Morelli Mazzeo ER, Scatoni IB, Iris Beatriz Scatoni EM (2009) Insectos del Uruguay. BENi, Montevideo.

- Berger L, Hyatt AD, Speare R, Longcore JE (2005) Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis Aquat Organ* 68:51–63.
- Berger L, Roberts AA, Voyles J, et al (2016) History and recent progress on chytridiomycosis in amphibians. *Fungal Ecol* 19:89–99.
- Berger L, Speare R, Hyatt A (1999) Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. *Declines Disappearances Aust Frogs Environ Aust Canberra* 1999:23–33.
- Bielby J, Cooper N, Cunningham AA, et al (2008) Predicting susceptibility to future declines in the world's frogs. *Conserv Lett* 1:82–90.
- Boone MD, Little EE, Semlitsch RD, Fox SF (2004) Overwintered bullfrog tadpoles negatively affect salamanders and anurans in native amphibian communities. *Copeia* 2004:683–690.
- Borteiro C (2016) Enfermedades de la piel en anfibios de Uruguay y sureste de Brasil: nuevos diagnósticos y posibles efectos. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.
- Borteiro C, Cruz JC, Kolenc F, et al (2009) Chytridiomycosis in frogs from Uruguay. *Dis Aquat Organ* 84:159–162.
- Brem F, Mendelson III JR, Lips KR (2007) Field-sampling protocol for *Batrachochytrium dendrobatidis* from living amphibians, using alcohol preserved swabs. Version 1:18.
- Brown LD, Cai TT, DasGupta A (2001) Interval estimation for a binomial proportion. *Stat Sci* 16:101–117.
- Carnevia D (2008) Análisis de las oportunidades de cultivo de especies acuáticas en Uruguay. DINARA – FAO, Montevideo.
- Carreira S, Maneyro R (2015) Lista Roja de los Anfibios y Reptiles del Uruguay. Dirección Nacional de Medio Ambiente, Montevideo
- Chivers DP, Wildy EL, Kiesecker JM, Blaustein AR (2001) Avoidance Response of Juvenile Pacific Treefrogs to Chemical Cues of Introduced Predatory Bullfrogs. *J Chem Ecol* 27:1667–1676.
- Collins JP, Crump ML, III TEL (2009) *Extinction in Our Times: Global Amphibian Decline*, 1st edn. Oxford University Press, USA
- Colwell RK, Dunn RR, Harris NC (2012) Coextinction and persistence of dependent species in a changing world. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 43:183–203.
- Cortizas S (2014) Respuestas asimétricas de los anuros nativos ante la invasión de rana toro. Tesina de Grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.
- Crawford AJ, Lips KR, Bermingham E (2010) Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama. *Proc Natl Acad Sci* 107:13777–13782.
- Daszak P, Strieby A, Cunningham AA, et al (2004) Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetol J* 14:201–207.
- DeMarchi JA, Gaston JR, Spadaro AN, et al (2015) Tadpole Food Consumption Decreases with Increasing *Batrachochytrium dendrobatidis* Infection Intensity. *J Herpetol* 49:395–398.
- Fernández-Beaskoetxea S, Bosch J, Bielby J (2016) Infection and transmission heterogeneity of a multi-host pathogen (*Batrachochytrium dendrobatidis*) within an amphibian community. *Dis Aquat Organ* 118:11–20.
- Fisher MC, Garner TW (2007) The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biol Rev* 21:2–9.
- Fisher MC, Garner TW, Walker SF (2009) Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. *Annu Rev Microbiol* 63:291–310.

- Garner TW, Perkins MW, Govindarajulu P, et al (2006) The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biol Lett* 2:455–459.
- Gervasi SS, Urbina J, Hua J, et al (2013) Experimental evidence for American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) susceptibility to chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *EcoHealth* 10:166–171.
- Ghirardi R (2012) Estudio de quitridiomycosis por *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios anuros del Litoral, Cuyo y Patagonia Argentina. Facultad de Ciencias Naturales y Museo.
- Gobel N (2013) Efectos comunitarios de la invasión de rana toro *Lithobates catesbeianus* en Aceguá, Cerro Largo. Tesina de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.
- Grant EHC, Bailey LL, Ware JL, Duncan KL (2008) Prevalence of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in stream and wetland amphibians in Maryland, USA. *Appl Herpetol* 5:233–241.
- Gratwicke B, Evans MJ, Jenkins PT, et al (2009) Is the international frog legs trade a potential vector for deadly amphibian pathogens? *Front Ecol Environ* 8:438–442.
- Greenspan SE, Calhoun AJK, Longcore JE, Levy MG (2012) Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* to Wood Frogs (*Lithobates sylvaticus*) Via a Bullfrog (*L. catesbeianus*) Vector. *J Wildl Dis* 48:575–582.
- Groner ML, Relyea RA (2015) Predators reduce *Batrachochytrium dendrobatidis* infection loads in their prey. *Freshw Biol* 60:1699–1704.
- Gründler MC, Toledo LF, Parra-Olea G, et al (2012) Interaction between breeding habitat and elevation affects prevalence but not infection intensity of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazilian anuran assemblages. *Dis Aquat Organ* 97:173–184.
- Hanlon SM, Lynch KJ, Kerby J, Parris MJ (2015) *Batrachochytrium dendrobatidis* exposure effects on foraging efficiencies and body size in anuran tadpoles. *Dis Aquat Organ* 112:237–242.
- Hanselmann R, Rodríguez-Alp M et al (2014) Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in Venezuela. *Biol Conserv* 120:115–119.
- Heckman CW (2006) *Encyclopedia of South American Aquatic Insects: Odonata-Anisoptera: Illustrated Keys to Known Families, Genera, and Species in South America*. Springer Science & Business Media.
- Heckman CW (2008) *Encyclopedia of South American aquatic insects: Odonata-Zygoptera: Illustrated keys to known families, genera, and species in South America*. Springer Science & Business Media
- Heckman CW (2011) *Encyclopedia of South American Aquatic Insects: Hemiptera-Heteroptera: Illustrated Keys to Known Families, Genera, and Species in South America*. Springer Science & Business Media
- Heckman CW (2012) *Encyclopedia of South American aquatic insects: Ephemeroptera: illustrated keys to known families, genera, and species in South America*. Springer Science & Business Media
- Hess A, McAllister C, DeMarchi J, et al (2015) Salamanders increase their feeding activity when infected with the pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis Aquat Organ* 116:205–212.
- Heyer R, Donnelly MA, Foster M, McDiarmid R (2014) *Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians*. Smithsonian Institution New York.
- Hoey AS, McCormick MI (2004) Selective predation for low body condition at the larval-juvenile transition of a coral reef fish. *Oecologia* 139:23–29.

- James TY, Toledo LF, Rödder D, et al (2015) Disentangling host, pathogen, and environmental determinants of a recently emerged wildlife disease: lessons from the first 15 years of amphibian chytridiomycosis research. *Ecol Evol* 5:4079–4097.
- Johnson ML, Speare R (2003) Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and disease control implications. *Emerg Infect Dis* 9:922–925.
- Johnson PT, Preston DL, Hoverman JT, Richgels KL (2013) Biodiversity decreases disease through predictable changes in host community competence. *Nature* 494:230–233.
- Kadekaru S, Tamukai K, Tominaga A, et al (2016) Spontaneous oral chytridiomycosis in wild bullfrog tadpoles in Japan. *J Vet Med Sci* 78:573–577.
- Kats LB, Ferrer RP (2003) Alien predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. *Divers Distrib* 9:99–110.
- Kiesecker JM, Blaustein AR (1998) Effects of introduced bullfrogs and smallmouth bass on microhabitat use, growth, and survival of native red-legged frogs (*Rana aurora*). *Conserv Biol* 12:776–787.
- Kilpatrick AM, Briggs CJ, Daszak P (2010) The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends Ecol Evol* 25:109–118.
- Kolby JE, Ramirez SD, Berger L, et al (2015) Presence of amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in rainwater suggests aerial dispersal is possible. *Aerobiologia* 31:411–419.
- Kolenc F, Borteiro C, Baldo D, et al (2009) The tadpoles and advertisement calls of *Pleurodema bibroni* Tschudi and *Pleurodema kriegi* (Muller), with notes on their geographic distribution and conservation status (Amphibia, Anura, Leiuperidae). *Zootaxa* 1969:1–35.
- Kruger KM, Hero J-M (2007) Large-scale seasonal variation in the prevalence and severity of chytridiomycosis. *J Zool* 271:352–359.
- Langone JA (1993) Notas sobre *Phyllomedusa iheringii* Boulenger, 1885 (Amphibia, Anura, Hylidae). *Comun Zool Mus Hist Montev* 12:1–7.
- Laufer G, Canavero A, Núñez D, Maneyro R (2008) Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) invasion in Uruguay. *Biol Invasions* 10:1183–1189.
- Lips K (2014) A tale of two lineages: unexpected, long-term persistence of the amphibian-killing fungus in Brazil. *Mol Ecol* 23:747–749.
- Lips KR (2016) Overview of chytrid emergence and impacts on amphibians. *Phil Trans R Soc B* 371:20150465.
- Lips KR, Reeve JD, Witters LR (2003) Ecological traits predicting amphibian population declines in Central America. *Conserv Biol* 17:1078–1088.
- Logan M (2011) Biostatistical design and analysis using R: a practical guide. John Wiley & Sons
- LoGiudice K, Ostfeld RS, Schmidt KA, Keesing F (2003) The ecology of infectious disease: Effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. *Proc Natl Acad Sci* 100:567–571.
- Longcore JE, Pessier AP, Nichols DK (1999) *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91:219–227.
- Lymbery AJ, Morine M, Kanani HG, et al (2014) Co-invaders: The effects of alien parasites on native hosts. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 3:171–177.
- Mazzoni R, Cunningham AA, Daszak P, et al (2003) Emerging Pathogen in Wild Amphibians and Frogs (*Rana catesbeiana*) Farmed for International Trade. *Emerg Infect Dis* 9:995–998.
- McDonald KR, Mendez D, Müller R, et al (2005) Decline in the prevalence of

- chytridiomycosis in frog populations in North Queensland, Australia. *Pac Conserv Biol* 11:114–120.
- McMahon TA, Brannelly LA, Chatfield MWH, et al (2013) Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* has nonamphibian hosts and releases chemicals that cause pathology in the absence of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:210–215.
- Miaud C, Dejean T, Savard K, et al (2016) Invasive North American bullfrogs transmit lethal fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* infections to native amphibian host species. *Biol Invasions* 18:2299–2308.
- Mugnai R, Nessimian JL, Baptista DF (2010) Manual de identificação de macroinvertebrados aquáticos do Estado do Rio de Janeiro: para atividades técnicas, de ensino e treinamento em programas de avaliação da qualidade ecológica dos ecossistemas lóticos. Technical Books Editora
- Murray DL (2002) Differential body condition and vulnerability to predation in snowshoe hares. *J Anim Ecol* 71:614–625.
- Núñez D, Maneyro R, Langone J, de Sa RO (2004) Distribución geográfica de la fauna de anfibios del Uruguay. *Smithsonian Herpetological Information Service* 134:1–34.
- Ocock JF, Jodi J, Rowley L, et al (2013) Amphibian chytrid prevalence in an amphibian community in arid Australia. *EcoHealth* 10:77–81.
- Olson DH, Aanensen DM, Ronnenberg KL, et al (2013) Mapping the Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the Amphibian Chytrid Fungus. *PLoS ONE* 8:e56802.
- Phillott AD, Grogan LF, Cashins SD, et al (2013) Chytridiomycosis and Seasonal Mortality of Tropical Stream-Associated Frogs 15 Years after Introduction of *Batrachochytrium dendrobatidis*: Seasonal Mortality in Chytridiomycosis. *Conserv Biol* 27:1058–1068.
- Piotrowski JS, Annis SL, Longcore JE (2004) Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96:9–15.
- Poorten TJ, Rosenblum EB (2016) Comparative study of host response to chytridiomycosis in a susceptible and a resistant toad species. *Mol Ecol* 25:5663–5679.
- Pounds JA, Bustamante MR, Coloma LA, et al (2006) Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 439:161–167.
- Richards-Hrdlicka KL, Richardson JL, Mohabir L (2013) First survey for the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Connecticut (USA) finds widespread prevalence. *Dis Aquat Organ* 102:169–180.
- Rowley JJJ, Alford RA (2013) Hot bodies protect amphibians against chytrid infection in nature. *Sci Rep* 3:1515.
- Roznik EA, Sapsford SJ, Pike DA, et al (2015) Natural disturbance reduces disease risk in endangered rainforest frog populations. *Sci Rep* 5: 13472.
- Ruibal M, Laufer G (2012) Bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Amphibia: Ranidae) tadpole diet: description and analysis for three invasive populations in Uruguay. *Amphib-Reptil* 33:355–363.
- Saenz D, Hall TL, Kwiatkowski MA (2015) Effects of urbanization on the occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis*: do urban environments provide refuge from the amphibian chytrid fungus? *Urban Ecosyst* 18:333–340.
- Scheele BC, Driscoll DA, Fischer J, et al (2015) Landscape context influences chytrid fungus distribution in an endangered European amphibian. *Anim Conserv* 18:480–488.
- Scheele BC, Hunter DA, Brannelly LA, et al (2016) Reservoir-host amplification of disease impact in an endangered amphibian. *Conserv Biol In Press*.

- Scheele BC, Hunter DA, Grogan LF, et al (2014) Interventions for Reducing Extinction Risk in Chytridiomycosis - Threatened Amphibians. *Conserv Biol* 28:1195–1205.
- Schloegel LM, Ferreira CM, James TY, et al (2010) The North American bullfrog as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. *Anim Conserv* 13:53–61.
- Schloegel LM, Picco AM, Kilpatrick AM, et al (2009) Magnitude of the US trade in amphibians and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus infection in imported North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Biol Conserv* 142:1420–1426.
- Schloegel LM, Toledo LF, Longcore JE, et al (2012) Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Mol Ecol* 21:5162–5177.
- Schmidt KA, Ostfeld RS (2001) Biodiversity and the Dilution Effect in Disease Ecology. *Ecology* 82:609–619.
- Searle CL, Biga LM, Spatafora JW, Blaustein AR (2011a) A dilution effect in the emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proc Natl Acad Sci* 108:16322–16326.
- Searle CL, Gervasi SS, Hua J, et al (2011b) Differential host susceptibility to *Batrachochytrium dendrobatidis*, an emerging amphibian pathogen. *Conserv Biol* 25:965–974.
- Simpkins C, Van Sluys M, Hero J-M (2015) Swabber effect: Swabbing technique affects the detectability of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Herpetol Rev* 45:1-5.
- Skerratt LF, Berger L, Speare R, et al (2007) Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth* 4:125–134.
- Skerratt LF, McDonald KR, Hines HB, et al (2010) Validation of the mapping protocol for *Batrachochytrium dendrobatidis* in Queensland, Australia. *Dis Aquat Organ* 92:117–129.
- Sluys MV, Hero J-M (2010) How Does Chytrid Infection Vary Among Habitats? The Case of *Litoria wilcoxii* (Anura, Hylidae) in SE Queensland, Australia. *EcoHealth* 6:576–583.
- Sokal RR, Rohlf FJ (2009) Introduction to Biostatistics: Second Edition, 2nd edn. Dover Publications
- Sztatecsny M, Schabetsberger R (2005) Into thin air: vertical migration, body condition, and quality of terrestrial habitats of alpine common toads, *Bufo bufo*. *Can J Zool* 83:788–796.
- Torchin ME, Byers JE, Huspeni TC (2005) Differential parasitism of native and introduced snails: replacement of a parasite fauna. *Biol Invasions* 7:885–894.
- Venesky MD, Liu X, Sauer EL, Rohr JR (2014) Linking manipulative experiments to field data to test the dilution effect. *J Anim Ecol* 83:557–565.
- Venesky MD, Parris MJ, Storfer A (2009) Impacts of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection on tadpole foraging performance. *EcoHealth* 6:565–575.
- Venesky MD, Wassersug RJ, Parris MJ (2010) How Does a Change in Labial Tooth Row Number Affect Feeding Kinematics and Foraging Performance of a Ranid Tadpole (*Lithobates sphenoccephalus*)? *Biol Bull* 218:160–168.
- Voyles J, Rosenblum EB, Berger L (2011) Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity. *Microbes Infect* 13:25–32.
- Weldon C, Du Preez LH, Hyatt AD, et al (2004) Origin of amphibian chytrid fungus. *Emerg Infect Dis* 10:2100–2105.
- Xie GY, Olson DH, Blaustein AR (2016) Projecting the Global Distribution of the Emerging Amphibian Fungal Pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*, Based on

IPCC Climate Futures. PLOS ONE
11:e0160746.

Young HS, Parker IM, Gilbert GS, et al (2016)
Introduced Species, Disease Ecology, and
Biodiversity–Disease Relationships. Trends
Ecol Evol. *In Press*.

Ziegler L, Maneyro R (2008) Clave para la
identificación de los anfibios de

Uruguay:(chordata: amphibia). Universidad
de la República, Facultad de Ciencias,
Instituto de Biología, Sección Zoología
Vertebrados

Zuur AF, Ieno EN, Smith GM (2007) Analysing
Ecological Data. Springer New York, New
York, NY

Capítulo 5: Prevalencia y efecto de quitridiomycosis en larvas de anuros de Aceguá

Resumen

Las fases larvales de los anuros son las más expuestas a las esporas acuáticas de *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), pero a su vez parecen ser menos afectadas que los adultos ya que tiene queratina únicamente en las piezas de su disco oral. Por esto resulta importante explorar su rol en relación a la dinámica de esta enfermedad. En este estudio se evaluó el nivel de infección (representado por el ciclo umbral), mediante PCR en tiempo real, de un ensamble de larvas invadido por rana toro en siete charcos de la localidad de Aceguá. Se encontró un nivel de infección muy alto en todo el ensamble (91%), con diferencias significativas entre especies y estadios. No se encontraron diferencias entre charcos que puedan ser atribuibles al tiempo de invasión por rana toro. La exótica *Lithobates catesbeianus* y la nativa *Pseudis minuta*, especies de gran tamaño y prolongado periodo larval, presentaron un mayor nivel de infección. El nivel de infección en las larvas nativas presentó una asociación positiva con el estadio de desarrollo. Además el daño en las piezas de disco oral estuvo asociado al nivel de infección. Sin embargo, las larvas de rana toro presentaron un patrón diferente, con el nivel de infección no asociado al estadio ni al daño en disco oral. Esto sugiere un posible rol de las larvas de rana toro en la persistencia de Bd en los sistemas. Este aspecto resulta fundamental ya que la introducción de rana toro en un sistema, además de implicar la introducción de quitridio, aseguraría su persistencia por sus larvas. Este aspecto debe ser considerado en planes de conservación y control de la rana toro.

Introducción

Batrachochytrium dendrobatidis (Bd) tiene una fuerte dependencia del agua en todas las fases de su ciclo de vida (Longcore et al. 1999; Van Rooij et al. 2015). De hecho, la humedad ambiental es un fuerte condicionante de su persistencia y severidad en un ecosistema (Lips

2016). La dispersión y persistencia de esta enfermedad en un ensamble de anuros está estrechamente asociada a la relación que este tenga con el medio acuático (Johnson y Speare 2003). Es por esto que desde un principio se ha considerado la idea de que las larvas jueguen un importante rol en la persistencia de Bd (Rachowicz et al. 2004).

A diferencia de los adultos que la tienen en toda su piel, las larvas presentan queratina únicamente en las estructuras de su disco oral (Knapp y Morgan 2006; Padgett-Flohr y Goble 2007). Por esto, los efectos de la quitridiomycosis en larvas no parecen ser tan severos como en adultos. En larvas se observa una desaparición de las piezas queratinizadas del disco oral: las filas de dientes labiales y las fundas de las mandíbulas (Knapp y Morgan 2006; Drake et al. 2007). Si bien esta desaparición de piezas de queratina podría no tener importantes efectos, existe evidencia que demuestra que las larvas infectadas por quitridio pueden tener un costo no letal, en interacciones tróficas como competencia y depredación (Parris y Cornelius 2004; Parris et al. 2006; Venesky et al. 2009; Han et al. 2011; DeMarchi et al. 2015). Además, esta enfermedad puede hacer que las larvas sean más vulnerables a determinados factores ambientales como la presencia de contaminantes (Buck et al. 2015). De todas formas, quedan aún muchas interrogantes acerca de los diferentes efectos de Bd y del rol que cada una de las especies jugaría en la su persistencia en el ambiente. La evidencia contradictoria en relación a la riqueza específica de un sistema y la persistencia de la enfermedad han llevado al planteo de que lo importante es la identidad de las especies, ya que no todas jugarían el mismo rol (James et al. 2015). Las especies más tolerantes y con períodos larvales más prolongados jugarían un rol de reservorio y amplificación de Bd en un ambiente (Medina et al. 2015).

La rana toro, *Lithobates catesbeianus* es resistente a la infección de quitridiomycosis tanto en adultos como en sus larvas (Daszak et al. 2004; Blaustein et al. 2005). Si bien se ha encontrado que la quitridiomycosis produce en esta especie un daño en las piezas del disco oral, también aparecen otros causantes de daño como pueden ser los contaminantes químicos (Altig 2007). Experimentalmente se ha demostrado que las larvas de rana toro son capaces de mantener y transmitir la quitridiomycosis a otras especies (Schloegel et al. 2010; Kadekaru et al. 2016). La importante abundancia y duración del periodo larval (hasta tres años), así como su alto nivel de actividad a lo largo de todo el año, hacen a las larvas de rana toro un importante candidato a especie amplificadora de Bd (Bury y Whelan 1984; Adams y Pearl 2007). Sin embargo, el rol de

las larvas de rana toro en ensambles de anuros de sistemas naturales invadidos no ha sido estudiado.

El objetivo del presente estudio es evaluar el nivel de infección y los costos de la quitridiomycosis en las diferentes especies del ensamble de larvas de anuros de Aceguá. Se pondrá especial énfasis en comprender el rol de las larvas de rana toro en la persistencia de Bd en dicho sistema.

Hipótesis y predicciones

Las diferentes especies de larvas del ensamble tendrán diferente susceptibilidad a la infección de quitridio, por poseer diferentes atributos. Esto se explica tanto por la inmunidad de la piel, como por los hábitos y fenología de las diferentes especies del ensamble. Si bien no sabemos nada de la inmunidad de las especies nativas, podemos predecir que aquellas con un periodo larval más prolongado y adultos más relacionados al medio acuático tendrán un mayor nivel de infección. Dado que Bd consume la queratina del disco oral de las larvas, esperamos encontrar una asociación entre este nivel de infección y el daño en las estructuras de su disco oral. Dicha asociación será diferente entre especies.

En particular, la rana toro es una especie con larvas más resistentes a la infección con quitridio que las nativas. Su resistencia y su persistencia en forma larval hacen que esta especie invasora contribuya al mantenimiento de Bd en los sistemas acuáticos. Por eso, podemos esperar que las larvas de rana toro tengan una importante prevalencia de quitridio y un escaso costo individual de esta enfermedad (tanto en el daño del disco oral, como en la composición de su dieta). Además la presencia de estas larvas en los sistemas invadidos estará asociada a una mayor prevalencia de la enfermedad en el ensamble de anuros.

Metodología

Muestreos de campo

Se trabajó a partir de muestras de larvas de anuros colectadas en la localidad de Aceguá, Cerro Largo. En dicha localidad se muestrearon siete cuerpos de agua en octubre de 2012, donde ocurre un gradiente de invasión de rana toro. Dichos sitios, sus características, ubicación y

gradiente de invasión son los descritos en el Capítulo 4 de la presente tesis. La colecta fue realizada entre las 10:00 y las 19:30 horas, utilizando una red de arrastre de 5 m de ancho, 1 m de altura y 0,5 cm de malla. En cada cuerpo de agua se realizaron dos arrastres, uno en el sentido del diámetro mayor y otro del menor, en ambos casos, el arrastre se realizó desde la zona más profunda al borde del charco. Cada arrastre cubrió entre 4 y 11 m, logrando una adecuada representatividad del sistema, cubriendo los diferentes tipos de micro-ambientes (bentónico, pelágico, borde y plantas).

Para realizar los análisis de quitridio, se tomó un máximo de 10 ejemplares por especie y por charco, seleccionados aleatoriamente. Dichos ejemplares fueron sacrificados con una sobredosis de Eugenol y fijados en alcohol al 95%. Una vez en el laboratorio, los ejemplares fueron determinados utilizando las descripciones locales de larvas como referencias (Langone 1989; Kolenc et al. 2003; Borteiro y Kolenc 2007; Kolenc et al. 2008; Laufer y Barreneche 2008; Laufer et al. 2009b; e.g. Baldo et al. 2010) y se determinó su estadio de desarrollo siguiendo a Gosner (1960). Luego, se analizó cada ejemplar bajo lupa binocular para determinar el grado de daño en las piezas queratinizadas de su disco oral. Dichas piezas son las diferentes filas de dientes labiales y las fundas de las mandíbulas (McDiarmid y Altig 2000; Figura 5.1).

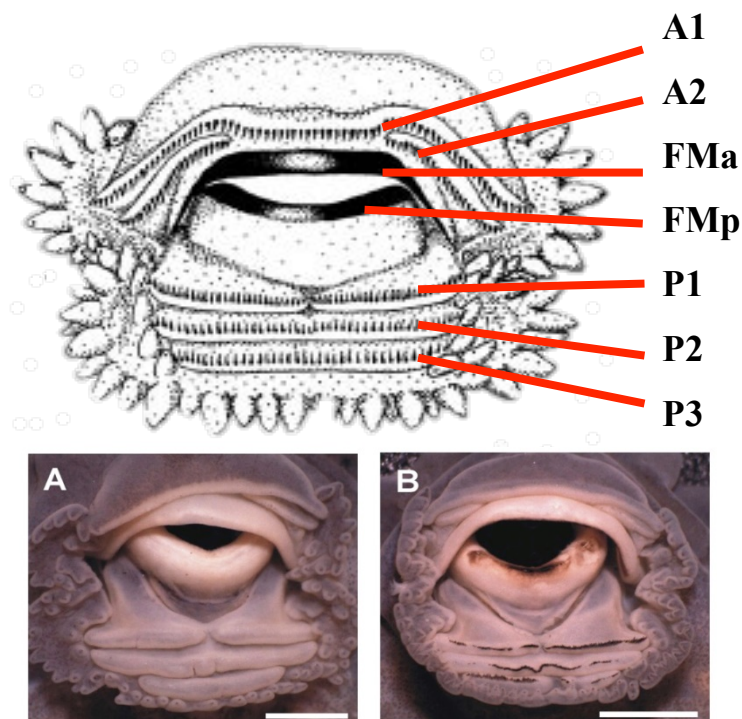


Figura 5.1. Piezas queratinizadas en el disco oral de una larva de anfibio conservado (*Lithobates catesbeianus*), siguiendo el criterio de Atlig y McDiarmid (2000). Las filas de dientes labiales anteriores se numeran siguiendo el orden A1, A2 y A3 y las filas de dientes labiales posteriores P1, P2 y P3. Las fundas de las mandíbulas se componen de la pieza anterior (FMa) y la posterior (FMp). Abajo se ve una imagen de un disco oral completamente dañado, sin nada de queratina (A) y otro disco muy dañado, con algo de queratina en FMp, P1, P2 y P3 (B).

La categorización de daño en disco oral se realizó mediante inspección ocular de cada una de las estructuras del disco oral (Figura 5.1), en la cual se categorizó el daño en tres valores: 0 para aquellas piezas que estaban totalmente normales, 1 para las que tenían hasta un 50% de daño y 2 para las que tenían más de un 50% de daño. Luego, se construyó la variable del daño total en disco oral como la suma de los daños parciales de las diferentes piezas (Daño = A1 + A2 + FMa + FMp + P1 + P2 + P3). Finalmente, luego de realizar el diagnóstico, los discos orales fueron sometidos a un aislamiento de ADN mediante un kit comercial de Quiagen (DNeasy Blood & Tissue Kit, Cat No./ID: 69504), para posteriormente determinar la infección por quitridio mediante PCR en tiempo real.

Determinación de infección por PCR en tiempo real

Para determinar la quitridiomycosis se utilizó la metodología propuesta por Boyle y colaboradores (2004), una técnica muy eficaz y sensible para quitridio, capaz de detectar una única espora en una muestra (Kriger et al. 2006b; Kriger et al. 2006a). A diferencia del PCR convencional, esta técnica permite cuantificar la cantidad de ADN en la muestra analizada por el ciclo umbral, en el que empieza la amplificación. Es así que una muestra que amplifica antes debe tener mayor ADN de quitridio y por tanto un mayor nivel de infección. Dicha técnica se utilizó para diagnosticar la infección por quitridio y la determinación del nivel relativo de infección de cada muestra en relación al ciclo umbral de amplificación (el cual refleja la cantidad de ADN en la muestra).

Se trabajó con un volumen final para cada reacción de 25µL, de los cuales 12,5 µL fueron de Sybr Green, 5,4 µL de solución previamente de cada primer (ITS1-3 Chytr y 5.8S Chytr) y 5µL de muestra de ADN. El procedimiento fue corroborado por tener una alta capacidad de detección, en muestras de este tamaño a partir de ADN aislado de discos orales de larvas. Se realizaron 50 ciclos, como se describe a continuación: 2 min a 50 ° C, 10 min a 95 ° C), seguido de 15 s a 95 ° C y 1 min a 60 ° C. En todos los procedimientos se utilizó como control negativo

agua purificada y ADN extraído de hígado de un anfibio nativo (*Melanophryniscus montevidensis* de la colección privada BKT 2427). Como control positivo se utilizó una muestra de la cepa de la colección del laboratorio de School of Biology & Ecology, de la University of Maine de Estados Unidos (*Bd* JEL 423), donde Joyce E. Longcore describió este patógeno (Longcore et al. 1999). Se trabajó a partir de una muestra pura con una concentración de 121 mg/μL, obteniendo las tres soluciones para las PCR: 1/100, 1/1000, 1/10000. En todas las reacciones los controles negativos no amplificaron y los positivos amplificaron en orden, siguiendo las concentraciones de ADN puro que contenían. Además varios casos positivos fueron secuenciados y analizados por cortes histológicos para confirmar el diagnóstico (Borteiro 2016). Si bien se trabajó con una determinación única en PCR, tal como recomiendan Kriger y colaboradores (2006a), en los casos dudosos se repitió el procedimiento para confirmar el diagnóstico.

Al final del procedimiento de PCR en tiempo real se obtuvo para cada muestra analizada, la información de presencia de quitridio, asociada a la ocurrencia de una curva de amplificación, y la cantidad relativa de ADN de quitridio. Así es que se utilizó el valor del ciclo umbral como el indicador de densidad relativa de ADN de quitridio. Es así que una muestra con mucha densidad de ADN de quitridio amplifica rápidamente, en menos ciclos que una con menor densidad de quitridio, que amplifica más tardíamente. Por eso el valor del ciclo umbral se utilizó como una aproximación al nivel de infección. Para esto se categorizó los valores obtenidos en 12 clases, desde 0 correspondiente a los que no amplificaron, hasta 12, correspondiente a los primeros que amplificaron más tempranamente (menor ciclo umbral). Esto se utilizó como la variable de nivel de infección para los análisis posteriores.

Análisis de datos

Considerando la extrema sensibilidad del método y el origen de las muestras de un medio acuático con alta presencia de quitridio, se trabajó con niveles de infección en lugar de prevalencias. Dichos niveles de infección fueron evaluados a nivel de ensamble y comparados entre las especies y charcos. Para esto se realizaron modelos lineales generalizados. Se evaluó el nivel de infección de *B. dendrobatidis* (correspondiente al ciclo umbral de la amplificación en el PCR) a nivel de especie, y charco, utilizando como covariables el tamaño corporal o estadio de

desarrollo larval, nunca ambas por su alta correlación. Inicialmente por tratarse de una variable de conteo, se consideró una distribución de Poisson, pero luego por sobre-ajuste se terminó utilizando una binomial negativa. La distribución de las diferencias significativas entre especies y entre charco fue analizada por el test a posteriori de Tukey, considerando un $\alpha = 0.05$.

Para evaluar el daño en el disco oral en relación al nivel de infección de quitridio (correspondiente al ciclo umbral de la amplificación en el PCR), se utilizó un modelo lineal generalizado. En este caso también se consideró una distribución binomial negativa y debido al mejor ajuste se utilizó el estadio de Gosner como covariable. Las variables explicativas utilizadas fueron previamente testeadas para comprobar la no ocurrencia de correlación mediante el test de Pearson. La validez estadística los parámetros de cada modelo fue testada por la prueba de Chi-cuadrado (Zuur et al. 2007).

Análisis de daño y dieta

Para determinar el costo del daño en las estructuras queratinizadas del disco oral a nivel de individuo, se trabajó a partir de los datos recabado en el marco de la pasantía de grado de Mariana Ruibal (Ruibal 2008; Ruibal y Laufer 2012). De esta base se utilizó únicamente los datos de dieta de 25 larvas de *Lithobates catesbeianus* colectadas en 2007 en la localidad de Aceguá (Laufer et al. 2009a), ya que era el único lote que presentaba un significativo gradiente de daño en el disco oral. Dicha base incluía el registro de cada individuo, con su tamaño (longitud desde la punta del hocico a la punta de la cola), el daño de estructuras del disco oral (tal como se describe arriba, Figura 5.1) y la composición de la dieta. La dieta fue descripta a partir del análisis de sub-muestras del contenido de los primeros cuatro centímetros del tracto digestivo.

A partir del registro de daño en las piezas de las mandíbulas, se construyó la variable antes descripta de daño en el disco oral. Se exploró la variación en la riqueza de ingesta de cada individuo, en relación al daño en su disco oral, mediante un modelo lineal generalizado, con distribución una de Poisson, con el estadio de desarrollo como covariable. La validez estadística los parámetros de cada modelo fue testada por la prueba de Chi-cuadrado.

Resultados

Los niveles de infección con quitridiomycosis fueron altos en el ensamble estudiado, ya que el 91% de los individuos se encontraban en algún grado infectados con quitridio. El nivel de infección se distribuyó en forma relativamente equitativa dentro de la muestra relevada (Figura 5.2A). A nivel de las cuatro especies más frecuentes, observamos que el nivel de infección de las especies nativas tuvo su pico de distribución a niveles intermedios o bajos, mientras que *L. catesbeianus* tuvo su pico en valores altos de infección. Las muestras de *L. catesbeianus* fueron las que presentaron la mayor proporción de individuos con alta densidad de ADN de *B. dendrobatidis* (Figura 5.2B).

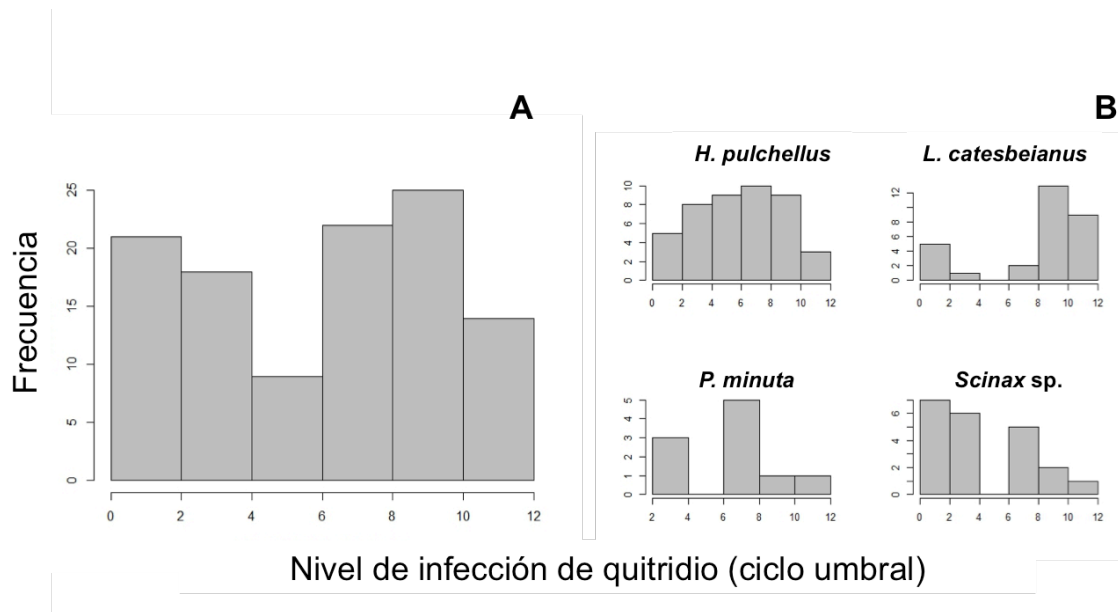


Figura 5.2. Distribuciones de frecuencia del nivel de infección de quitridio encontrado en los análisis de PCR en tiempo real de la muestra de larvas de anuros de siete charcos de Aceguá. Se presentan las frecuencias a nivel del ensamble completo (A) y a nivel de las cuatro especies más abundantes (B).

El nivel de infección observado presentó diferencias significativas a nivel de especie (nivel de infección = especie + estadio; Devianza explicada = 20%; calidad de ajuste = 1,36), pero no de charco. El modelo de la binomial negativa detectó un efecto significativo de la especie ($X^2=148$; $gl=104$; $P<0,001$) en el nivel de infección por quitridio. Al analizar el test de Tukey observamos que el mayor nivel de infección fue registrado en las larvas de *L.*

catesbeianus y *P. minuta*. El resto de las larvas presentó un nivel algo menor de infección, sin diferencias significativas entre especies. La única que presentó un valor menor fue *O. americanus*, cuya tamaño muestral fue muy reducido (Figura 5.3A).

La alta variabilidad en la infección por quitridio a nivel de charco no permitió detectar diferencias significativas. Entre los charcos con mayores niveles de infección encontramos a los dos que tenían un mayor tiempo de invasión (ver Capítulo 4), así como uno no invadido y uno de invasión reciente (Figura 5.3B).

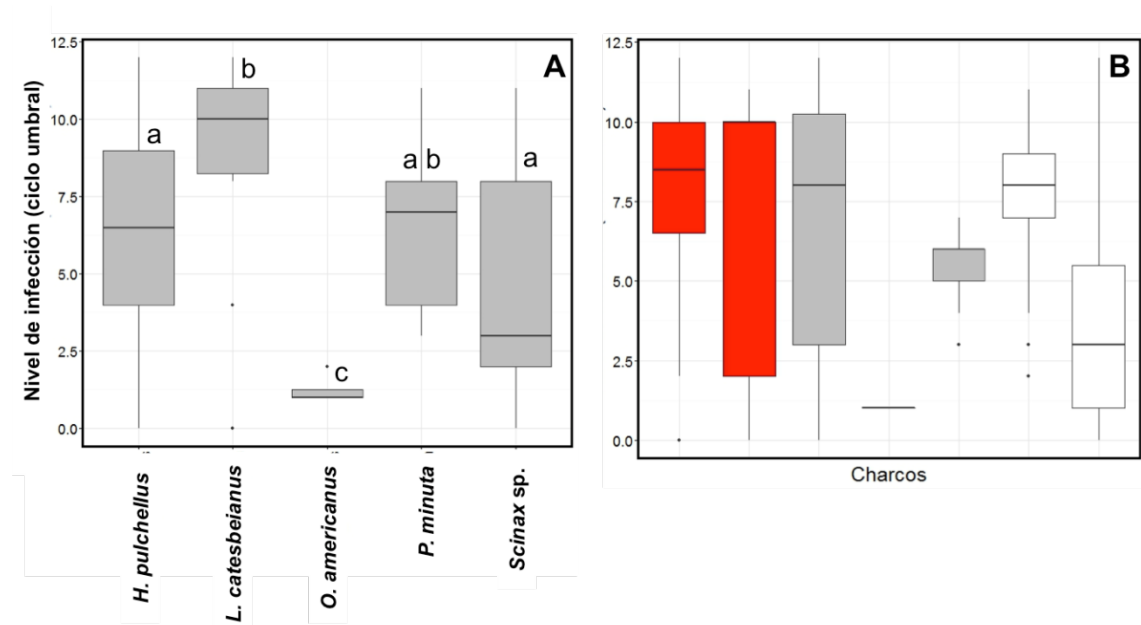


Figura 5.3. Nivel de infección de quitridiomycosis encontrado en los análisis de PCR en tiempo real de la muestra de larvas de anuros de siete charcos de Aceguá. Se presentan los valores medios y la dispersión a nivel de especie (A) y a nivel de charcos (B). Los charcos aparecen marcados en B según su historia de invasión de rana toro al momento del muestreo: rojo los antiguamente invadidos, gris los recientemente invadidos y blanco los no invadidos.

Al incluir las variables de tamaño corporal y desarrollo en el modelo binomial negativo de nivel de infección en relación a la especie, observamos diferencias significativas. El tamaño corporal, considerado como la longitud desde el hocico hasta la punta de la cola no fue significativo, mientras que lo contrario ocurrió con el estadio de desarrollo de Gosner ($\chi^2=140$; $gl=103$; $P<0,01$). Nuevamente observamos un patrón diferente entre las especies nativas y la invasora. Mientras que *H. pulchellus*, *P. minuta* y *Scinax* sp. aumentaron el nivel de infección

con el estadio, *L. catesbeianus* mantuvo una infección importante en todos los estadios larvales. El menor tamaño de muestra de *O. americanus* y su homogeneidad de estadios no nos permitió observar ningún patrón claro (Figura 5.4).

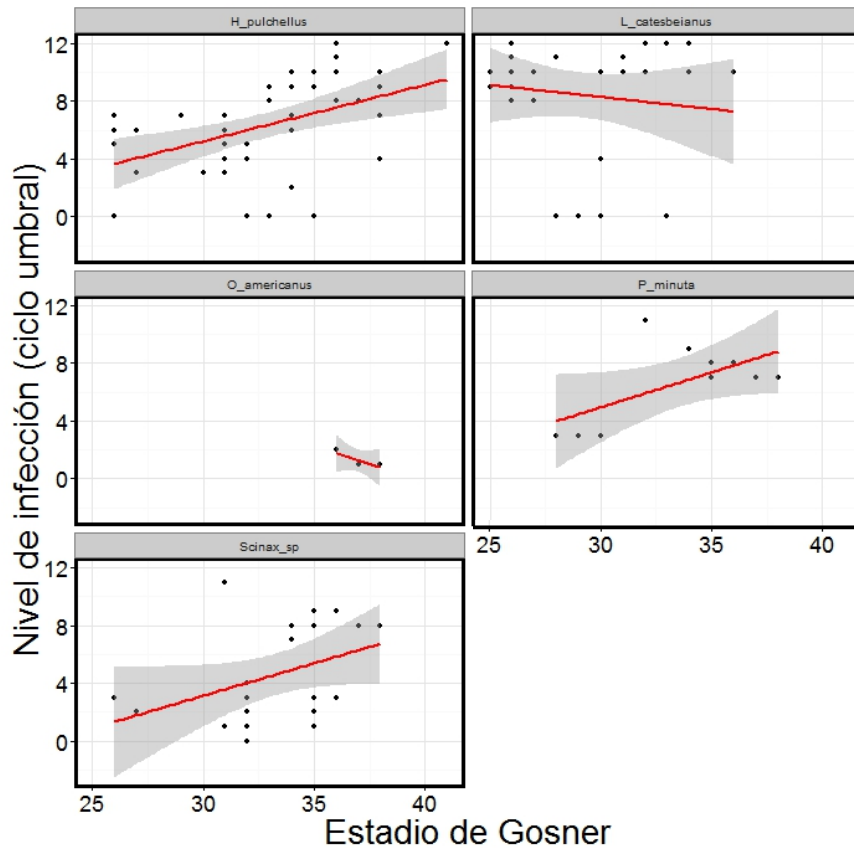


Figura 5.4. Nivel de infección de quitridiomycosis encontrado larvas de anuros de Aceguá, en relación al estadio de desarrollo de Gosner. Se presentan los valores observados y las líneas de tendencia para las cinco especies estudiadas.

Costo del quitridio en disco oral

Mediante la aplicación del modelo binomial negativo que incluyó nivel de infección, estadio y especie como variables explicativas, se logró obtener un buen poder explicativo del daño observado en el disco oral de las larvas colectadas en Aceguá (Daño en disco = nivel de infección*especie + estadio; Devianza explicada = 54%; calidad de ajuste = 1,1). Se seleccionó para el modelo la variable de interacción del nivel de infección y la especie, que fue estadísticamente significativa.

A nivel del ensamble, encontramos que los individuos con mayor daño en el disco oral fueron mayormente los más infectados, sin embargo aparecieron una serie de individuos con importante daño que no se encontraban infectados por quitridio (Figura 5.5). Estas diferencias respondieron a la existencia de patrones diferentes a nivel de especie. Los daños en disco oral observados tendieron a incrementarse en las especies nativas en relación al nivel de infección. En cambio, en *L. catesbeianus* esto no sucedió, encontrándose daño de disco oral importante en ejemplares con bajo nivel de infección (Figura 5.6). Mientras *L. catesbeianus* mantuvo un daño elevado durante todos los estadios—incluso mayor en los tempranos—las larvas de *H. pulchellus*, *P. minuta* y *Scinax* sp. tuvieron un incremento del daño en estadios mayores (Figura 5.7). En el caso de *O. americanus* no se observaron patrones por el escaso número de muestras, con bajos niveles de infección y estadios similares.

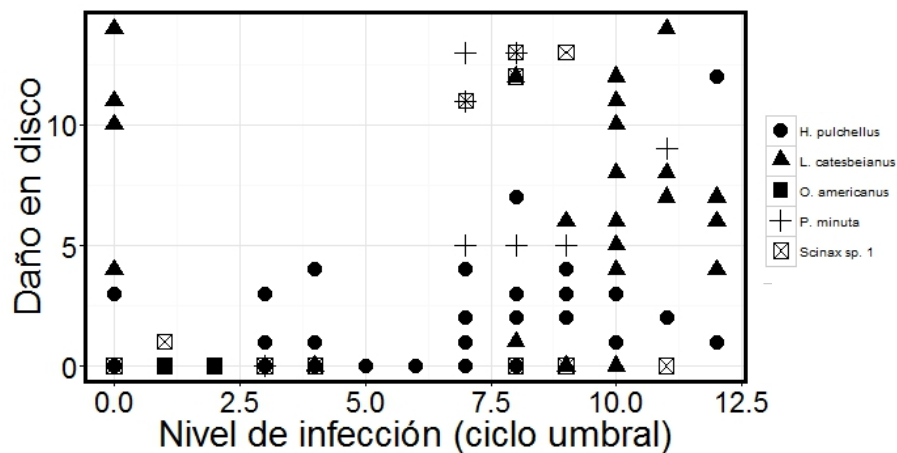


Figura 5.5. Daño en las estructuras queratinizadas del disco oral del ensamble de larvas de anuros estudiados de Aceguá, en relación al nivel de infección de quitridiomycosis determinado por el ciclo umbral en la PCR. Las identidades específicas se representan por diferentes símbolos, descritos en la derecha del gráfico.

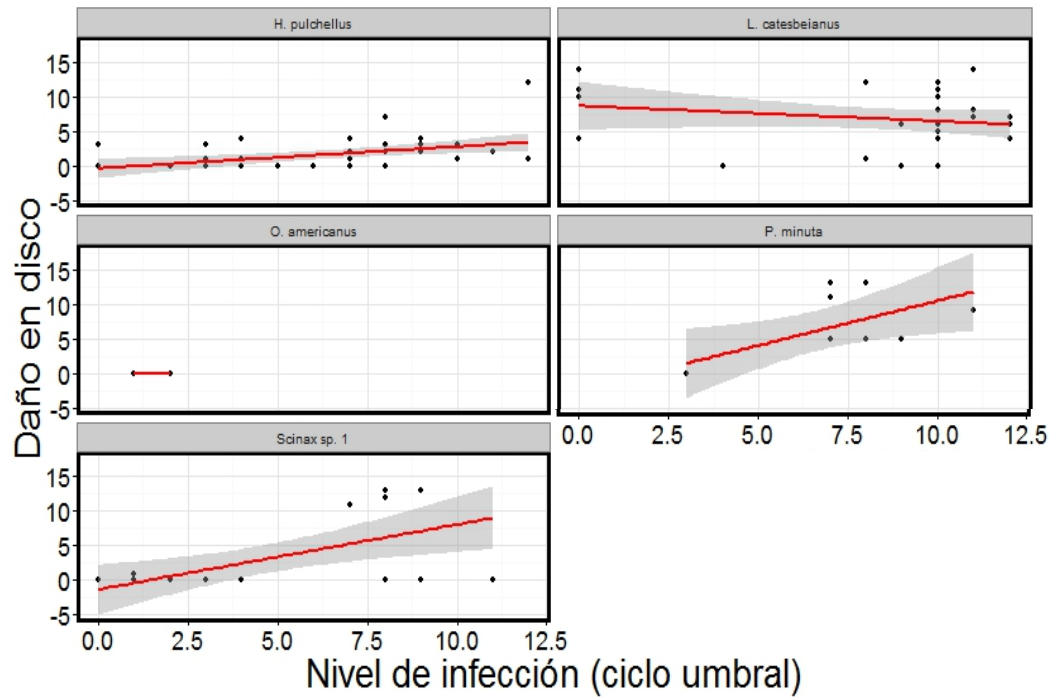


Figura 5.6. Daño en las estructuras queratinizadas del disco oral de cada una de las especies de larvas de anuros estudiadas de Aceguá, en relación al nivel de infección de quitridiomycosis determinado por el ciclo umbral en la PCR. Para cada especie se presentan los puntos observados y las líneas de tendencia.

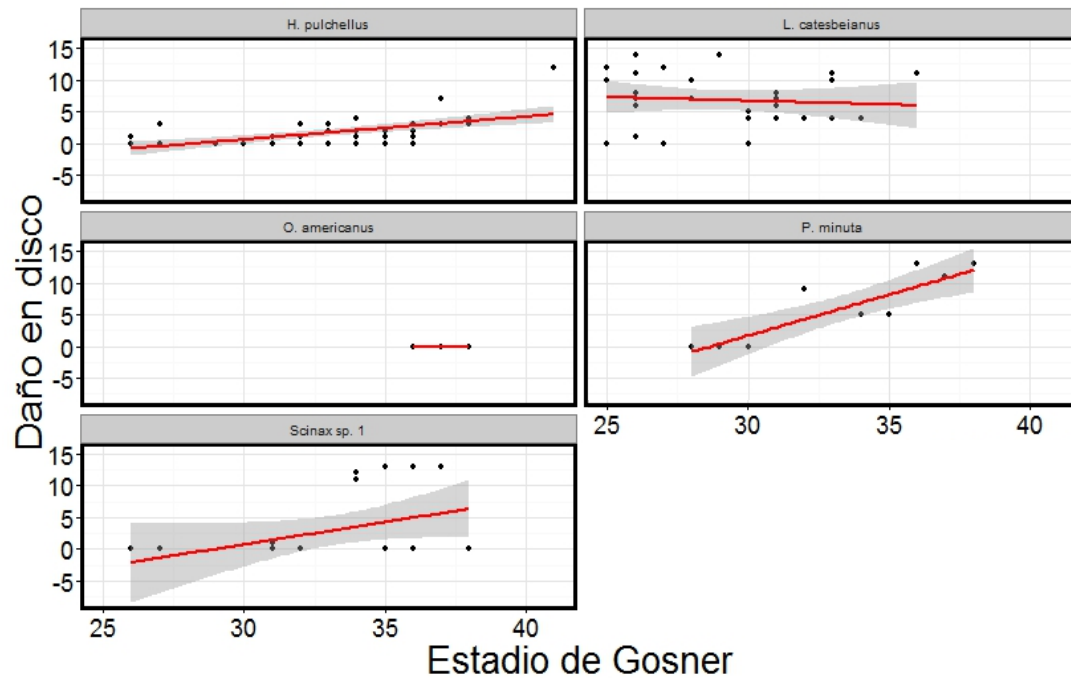


Figura 5.7. Daño en las estructuras queratinizadas del disco oral de cada una de las especies de larvas de anuros estudiadas de Aceguá, en relación al estadio de desarrollo de Gosner. Para cada especie se presentan los puntos observados y las líneas de tendencia.

Efecto del daño en disco oral sobre la dieta

La exploración de las variables de la base de datos, mediante un modelo lineal generalizado (con distribución de Poisson), nos mostró la ausencia de una relación estadísticamente significativa entre la riqueza de ingesta y el grado de daño en el disco oral de las larvas de rana toro. Si bien los mayores niveles de riqueza de presas aparecieron a niveles bajos de daño, existió una gran variación y dispersión de las observaciones y no se observó ningún patrón (Figura 5.8). El único parámetro significativo en el modelo de riqueza fue el estadio de Gosner.

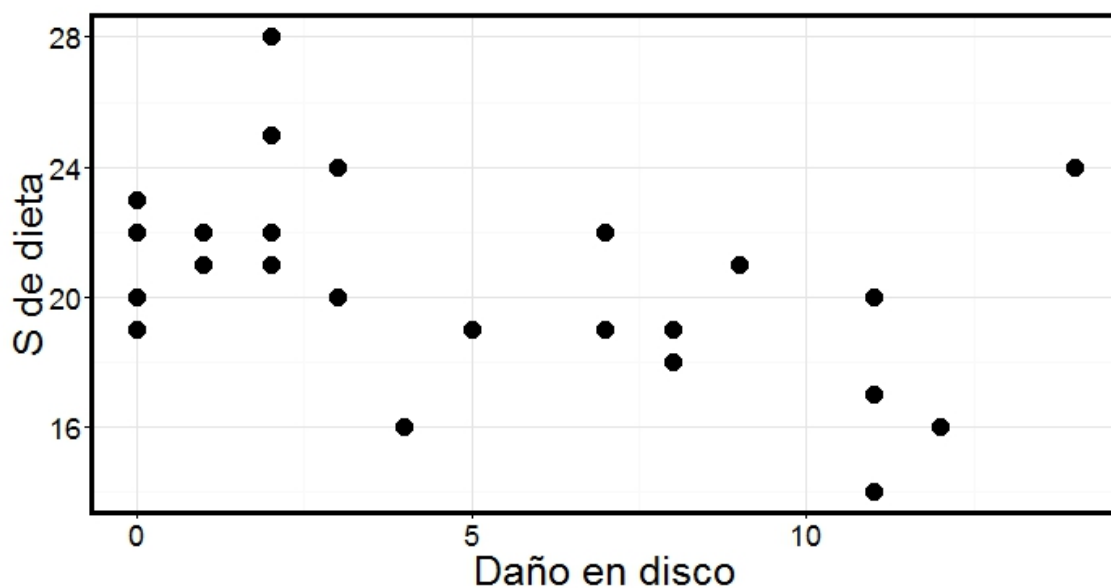


Figura 5.8. Riqueza de presas ingeridas por larvas de rana toro de la localidad de Aceguá, Cerro Largo, en relación al daño en las estructuras queratinizadas del disco oral. Datos obtenidos de estudios previos (Ruibal 2008; Ruibal y Laufer 2012).

Discusión

La presente es la primer evaluación comunitaria de quitridiomycosis, a nivel de larvas de anuros en Uruguay y la región. El procesamiento de una muestra sistematizada de larvas, incluyendo diagnóstico y cuantificación por PCR en tiempo real resulta novedoso y puede aportar mucho a la comprensión de la dinámica y efectos de esta enfermedad, tan poco conocida aún. Las prevalencias encontradas resultan muy importantes, por ser tan altas, superando un 90% de infección. De todas formas, se deben considerar ciertos factores que podían explicar estas

altas prevalencias en nuestra muestra: 1) el tratarse de comunidades acuáticas, donde las esporas de quitridio circulan libremente y son capaces de infectar a múltiples individuos (Johnson y Speare 2003; Johnson y Speare 2005), 2) el tratarse de una muestra de final de la época fría, cuando las prevalencias aumentan (Geiger et al. 2011), 3) el tratarse de un área con alta prevalencia en adultos (ver Capítulo 4), y 4) la alta sensibilidad de la técnica de PCR utilizada (Kriger et al. 2006b; Kriger et al. 2006a; Garland et al. 2011).

Los niveles de infección con Bd detectados a partir de PCR en tiempo real fueron altos en todas las especies. Se destacó un mayor nivel de infección en dos especies con tamaño corporal relativamente importante y persistencia prolongada de su fase larval: la nativa *Pseudis minuta* y la exótica *L. catesbeianus* (Figuras 5.2 y 5.3). Esto coincide con nuestras predicciones acerca del rol de los atributos y relacionamiento con el agua de las diferentes especies en el nivel de infección con quitridio de las diferentes especies. Por tanto, no todas las especies nativas estarían jugando un rol similar en la persistencia de Bd. El hecho de la alta dependencia al agua durante todo el ciclo de estas especies condiciona su presencia en determinados sistemas. Se plantea por tanto la interrogante del nivel de infección por quitridio en otros sistemas no evaluados en el presente estudio, tal como los charcos temporales. Estas especies persistentes no son comunes en los charcos temporales y por tanto este podría ser un refugio para las especies nativas que los utilizan. Sería relevante en futuros estudios evaluar la heterogeneidad de ambientes de reproducción y forrajeo de anfibios en relación a la persistencia de Bd en una región (Kriger y Hero 2007).

El hecho de que la inclusión de la variable estadio de desarrollo de Gosner logre un mejor ajuste que el tamaño corporal en los modelos de quitridio indica que la permanencia en el charco condiciona el nivel de infección (Figura 5.4). Prácticamente en todas las especies nativas presentaron una relación positiva entre el estadio de desarrollo y el nivel de infección con Bd, tal como ya se ha observado en otras regiones (Smith et al. 2007). La variable estadio permite considerar de forma similar entre especies dicha permanencia que el tamaño corporal, el cual tiene gran variabilidad entre especies. Esto refuerza la idea de que el nivel de infección observados en Aceguá está muy relacionado a la permanencia de dependencia de los sistemas acuáticos.

Un aspecto importante fue el haber detectado una relación significativa y muy explicativa entre el nivel de infección de Bd y el daño en las piezas del disco oral en las especies nativas. En este aspecto un determinante fue la interacción entre el nivel de infección y la identidad específica. Esta observación tiene dos implicancias interesantes, por un lado sugiere un costo diferencial de la infección por quitridio y por otro plantea la posibilidad de generar una herramienta de detección y cuantificación rápida de Bd en una comunidad. *P. minuta*, *Hypsiboas pulchellus* y *Scinax* sp. (que comprende a *S. squalirrostris* y *S. granulatus*) mostraron una buena asociación en este sentido y dado que las tres son especies comunes, tienen el potencial de ser buenas indicadoras de la presencia de Bd. El potencial de las larvas para evaluar el nivel de Bd en un ambiente ha generado un fuerte debate y no siempre sería aplicable (Rachowicz 2002; Knapp y Morgan 2006; Smith y Weldon 2007). De todas formas nuestras observaciones parecen indicar que el daño sería un buen indicador de Bd en varias especies. Especialmente la presencia de mucho daño en estadios mayores sería un buen indicador (Figura 5.6).

Dentro del ensamble de larvas de Aceguá, la rana toro mostró una respuesta diferente a las nativas en el nivel de infección en relación al estadio (Figura 5.4) y en el daño del disco oral en relación al nivel de infección (Figura 5.5 y 5.6). Esto sugiere una interacción diferente con este patógeno y probablemente un rol que contribuye en su persistencia. *L. catesbeianus* es la especie con mayor nivel de infección (Figura 5.3A), por lo que entendemos que un renacuajo de rana toro porta potencialmente una gran carga relativa del patógeno, lo cual se magnifica considerando las importantes densidades de larvas de rana toro que ocurren en estos sistemas (Laufer et al. 2008; Ruibal y Laufer 2012; Gobel 2013). Además, las larvas de rana toro, a diferencia de las nativas, presentan una alta persistencia de Bd durante todos sus estadios de Gosner (Figuras 5.4, 5.5 y 5.6). Estas larvas no parecen tener un costo importante de la infección, ni en el daño de los discos orales, ni en la riqueza de su ingesta (Figuras 5.7 y 5.8). Toda esta evidencia coincide con la idea de la rana toro como una especie vector de *B. dendrobatidis* como planteamos en nuestra hipótesis (Daszak et al. 2004; Bai et al. 2010; Kadekar et al. 2016). La persistencia en años y las grandes densidades de las larvas de rana toro, nos sugieren que esta especie puede ser una magnificadora de la quitridiomycosis en nuestras comunidades nativas de anuros (Boone et al. 2004; Doupnik y Smith 2005). Greenspan y colaboradores (2012) demuestran que incluso en condiciones de bajas prevalencias, las larvas de rana toro pueden

actuar en el mantenimiento de la enfermedad en una comunidad, e infectar a los estadios susceptibles de otras especies, cuando estas se encuentran en el agua.

Las larvas de rana toro pueden tener un rol importante en los efectos de esta invasión sobre los ensambles de anuros nativos. Esta fase del ciclo de vida, además de tener efectos tróficos sobre las especies nativas de Uruguay (Ruibal y Laufer 2012; Gobel 2013), tendría efectos en la persistencia de enfermedades. Estas observaciones refuerzan la idea de los efectos nocivos de la invasión de rana toro en Uruguay y la necesidad de su control como forma de conservación de la biodiversidad nativa.

Referencias

- Adams M, Pearl C (2007) Problems and opportunities managing invasive Bullfrogs: is there any hope? In: Gherardi F (ed) *Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats*. Springer Netherlands.
- Altig R (2007) Comments on the descriptions and evaluations of tadpole mouthpart anomalies. *Herpetol Conserv Biol* 2:1–4.
- Bai C, Garner TW, Li Y (2010) First evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in China: discovery of chytridiomycosis in introduced American bullfrogs and native amphibians in the Yunnan Province, China. *EcoHealth* 7:127–134.
- Baldo D, Maneyro R, Laufer G (2010) The tadpole of *Melanophryniscus atroluteus* (Miranda Ribeiro, 1902) (Anura: Bufonidae) from Argentina and Uruguay. *Zootaxa* 2615:66–68.
- Blaustein AR, Romansic JM, Scheessele EA, et al (2005) Interspecific variation in susceptibility of frog tadpoles to the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conserv Biol* 19:1460–1468.
- Boone MD, Little EE, Semlitsch RD, Fox SF (2004) Overwintered bullfrog tadpoles negatively affect salamanders and anurans in native amphibian communities. *Copeia* 2004:683–690.
- Borteiro C (2016) Enfermedades de la piel en anfibios de Uruguay y sureste de Brasil: nuevos diagnósticos y posibles efectos. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.
- Borteiro C, Kolenc F (2007) Redescription of the tadpoles of three species of frogs from Uruguay (Amphibia: Anura: Leiuperidae and Leptodactylidae), with notes on natural history. *Zootaxa* 1638:1–20.
- Boyle DG, Boyle DB, Olsen V, et al (2004) Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis Aquat Organ* 60:141–148.
- Buck JC, Hua J, Brogan III WR, et al (2015) Effects of Pesticide Mixtures on Host-Pathogen Dynamics of the Amphibian Chytrid Fungus. *PloS One* 10:e0132832.
- Bury RB, Whelan JA (1984) Ecology and management of the bullfrog. U.S. Fish and Wildlife Service 155.
- Daszak P, Striemy A, Cunningham AA, et al (2004) Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetol J* 14:201–207.
- DeMarchi JA, Gaston JR, Spadaro AN, et al (2015) Tadpole Food Consumption Decreases with

- Increasing *Batrachochytrium dendrobatidis* Infection Intensity. *J Herpetol* 49:395–398.
- Doupnik B, Smith G (2005) Habitat use and activity level of large American bullfrog tadpoles: Choices and repeatability. *Amphib-Reptil* 26:549–552.
- Drake DL, Altig R, Grace JB, Walls SC (2007) Occurrence of oral deformities in larval anurans. *Copeia* 2007:449–458.
- Garland S, Wood J, Skerratt LF (2011) Comparison of sensitivity between real-time detection of a TaqMan assay for *Batrachochytrium dendrobatidis* and conventional detection. *Dis Aquat Organ* 94:101–105.
- Geiger CC, Küpfer E, Schär S, et al (2011) Elevated temperature clears chytrid fungus infections from tadpoles of the midwife toad, *Alytes obstetricans*. *Amphib-Reptil* 32:276–280.
- Gobel N (2013) Efectos comunitarios de la invasión de rana toro *Lithobates catesbeianus* en Aceguá, Cerro Largo. Tesina de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.
- Gosner KL (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 183–190.
- Greenspan SE, Calhoun AJK, Longcore JE, Levy MG (2012) Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* to Wood Frogs (*Lithobates sylvaticus*) Via a Bullfrog (*L. catesbeianus*) Vector. *J Wildl Dis* 48:575–582.
- Han BA, Searle CL, Blaustein AR (2011) Effects of an Infectious Fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, on Amphibian Predator-Prey Interactions. *PLoS ONE* 6:e16675.
- James TY, Toledo LF, Rödder D, et al (2015) Disentangling host, pathogen, and environmental determinants of a recently emerged wildlife disease: lessons from the first 15 years of amphibian chytridiomycosis research. *Ecol Evol* 5:4079–4097.
- Johnson ML, Speare R (2003) Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and disease control implications. *Emerg Infect Dis* 9:922–925.
- Johnson ML, Speare R (2005) Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Dis Aquat Organ* 65:181–186.
- Kadekar S, Tamukai K, Tominaga A, et al (2016) Spontaneous oral chytridiomycosis in wild bullfrog tadpoles in Japan. *J Vet Med Sci* 78:573–577.
- Knapp RA, Morgan JA (2006) Tadpole mouthpart depigmentation as an accurate indicator of chytridiomycosis, an emerging disease of amphibians. *Copeia* 2006:188–197.
- Kolenc F, Borteiro C, Alcalde L, et al (2008) Comparative larval morphology of eight species of *Hypsiboas* Wagler (Amphibia, Anura, Hylidae) from Argentina and Uruguay, with a review of the larvae of this genus. *Zootaxa* 1927:1–66.
- Kolenc F, Borteiro C, Tedros M (2003) La larva de *Hyla uruguayana* Schmidt, 1944 (Anura: hylidae), con comentarios sobre su biología y su status taxonómico. *Cuad Herpetol* 17:87–100.
- Kruger KM, Hero J-M (2007) The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is non-randomly distributed across amphibian breeding habitats. *Divers Distrib* 13:781–788.
- Kruger KM, Hero J-M, Ashton KJ (2006a) Cost efficiency in the detection of chytridiomycosis using PCR assay. *Dis Aquat Organ* 71:149–154.
- Kruger KM, Hines HB, Hyatt AD, et al (2006b) Techniques for detecting chytridiomycosis in wild frogs: comparing histology with real-time Taqman PCR. *Dis Aquat Organ* 71:141–148.
- Langone JA (1989) Descripción de la larva de *Physalaemus gracilis* (Boulenger, 1883) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Museo de Hist. Natural*

- Laufer G, Arim M, Loureiro M (2009a) Informe de dos nuevas poblaciones invasoras de *Rana* Toro en Uruguay. Montevideo
- Laufer G, Barreneche JM (2008) Re-description of the tadpole of *Pseudopaludicola falcipes* (Anura: Leiuperidae), with comments on larval diversity of the genus. *Zootaxa* 1760:50–58.
- Laufer G, Canavero A, Núñez D, Maneyro R (2008) Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) invasion in Uruguay. *Biol Invasions* 10:1183–1189.
- Laufer G, Piñeiro-Guerra JM, Pereira-Garbero R, et al (2009b) Distribution extension of *Scinax aromothyella* (Anura, Hylidae). *Biota Neotropica* 9:275–277.
- Lips KR (2016) Overview of chytrid emergence and impacts on amphibians. *Phil Trans R Soc B* 371:20150465.
- Longcore JE, Pessier AP, Nichols DK (1999) *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91:219–227.
- McDiarmid RW, Altig R (eds) (2000) Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae, 1st edn. University Of Chicago Press
- Medina D, Garner TW, Carrascal LM, Bosch J (2015) Delayed metamorphosis of amphibian larvae facilitates *Batrachochytrium dendrobatidis* transmission and persistence. *Dis Aquat Organ* 117:85–92.
- Padgett-Flohr GE, Goble ME (2007) Evaluation of tadpole mouthpart depigmentation as a diagnostic test for infection by *Batrachochytrium dendrobatidis* for four California anurans. *J Wildl Dis* 43:690–699.
- Parris MJ, Cornelius TO (2004) Fungal pathogen causes competitive and developmental stress in larval amphibian communities. *Ecology* 85:3385–3395.
- Parris MJ, Reese E, Storfer A (2006) Antipredator behavior of chytridiomycosis-infected northern leopard frog (*Rana pipiens*) tadpoles. *Can J Zool* 84:58–65.
- Rachowicz LJ (2002) Mouthpart pigmentation in *Rana muscosa* tadpoles: seasonal changes without chytridiomycosis. *Herpetol Rev* 33:263–264.
- Rachowicz LJ, Vredenburg VT, others (2004) Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Dis Aquat Organ* 61:75–83.
- Ruibal M (2008) Efectos de la chytridiomycosis en la dieta, morfometría y estructuras orales de larvas de rana toro (*Lithobates catesbeianus*). Tesina de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.
- Ruibal M, Laufer G (2012) Bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Amphibia: Ranidae) tadpole diet: description and analysis for three invasive populations in Uruguay. *Amphib-Reptil* 33:355–363.
- Schloegel LM, Ferreira CM, James TY, et al (2010) The North American bullfrog as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. *Anim Conserv* 13:53–61.
- Smith KG, Weldon C (2007) A conceptual framework for detecting oral chytridiomycosis in tadpoles. *Copeia* 2007:1024–1028.
- Smith KG, Weldon C, Conradie W, du Preez LH (2007) Relationships among size, development, and *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in African tadpoles. *Dis Aquat Organ* 74:159–164.
- Van Rooij P, Martel A, Haesebrouck F, Pasmans F (2015) Amphibian chytridiomycosis: a review with focus on fungus-host interactions. *Vet Res* 46:1–22.
- Venesky MD, Parris MJ, Storfer A (2009) Impacts of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection on tadpole foraging performance. *EcoHealth* 6:565–575.
- Zuur AF, Ieno EN, Smith GM (2007) Analysing Ecological Data. Springer New York, New York, NY.

Capítulo 6: Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

Encontrar respuestas a la crisis en la biodiversidad es un tema central en políticas internacionales y nacionales (MVOTMA 2016). Los anfibios son un grupo interesante en este contexto, por ser los vertebrados más amenazados y por conformar un buen indicador de integridad ambiental. El problema de la región Neotropical radica en la escasez de conocimiento acerca de la biodiversidad de anfibios y de sus amenazas. La presente tesis es una de las primeras aproximaciones de estudios sistematizados de amenazas a los anfibios uruguayos y por tanto tiene un valor para su conservación.

Los resultados presentados en esta tesis provienen de un trabajo de más de 10 años de monitoreo de las poblaciones de rana toro en Uruguay. Los datos obtenidos probablemente sean uno de los seguimientos de invasión más detallados para Uruguay, y por tanto junto con los datos del mejillón dorado (*Limnoperna fortunei*) se han incorporado como indicadores ambientales de biodiversidad para el Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente (https://www.dinama.gub.uy/indicadores_ambientales/). El mantenimiento de esta importante base de datos requiere de un esfuerzo futuro y constante.

La invasión de rana toro ha sido predecible para Uruguay, encontrándose los focos en sitios próximos a los antiguos criaderos. De los 19 criaderos que sabemos que funcionaron en Uruguay, cuatro generaron poblaciones ferales, y dos de ellas lograron establecerse. Esta alta tasa de establecimiento confirma lo que predicen los modelos de nicho (e.g. Nori et al. 2011), una idoneidad ambiental en todo el territorio uruguayo para la rana toro. Podemos preguntarnos el por qué de las diferencias en el éxito de establecimiento de estas poblaciones. Si bien el bajo número de focos no nos permite hacer inferencias estadísticas, entendemos que hubo una diferencia evidente en la presión de propágulos que recibieron las poblaciones. Por un lado, las poblaciones de Aceguá y San Carlos provienen de dos de los mayores establecimientos ranícolas

que funcionaron en Uruguay. Dichos establecimientos trabajaron con un mayor número de animales, por un periodo más prolongado y con un éxito productivo mayor. Todo esto indica que estos sitios experimentaron una mayor cantidad, frecuencia y calidad de propágulos que las otras dos poblaciones que provienen de criaderos más pequeños. Además, en el caso de la población de Paraje Bizcocho, debe haber interferido el avance de la agricultura intensiva, ya que dos años después de haberla detectado, la totalidad de los cuerpos de agua invadidos fueron nivelados para cultivo.

Si bien nuestro diagnóstico de la invasión para Uruguay es detallado no podemos considerar que cubra la totalidad de los riesgos de invasión. Esto es notorio considerando por ejemplo el caso de San Carlos, donde en 2007 no detectamos la presencia de la rana toro, que si apareció luego en 2015. Probablemente pequeñas oscilaciones u otros factores compliquen la detectabilidad de las invasiones incipientes. En este sentido resulta fundamental en mantenimiento de un monitoreo por un tiempo prolongado de todos los sitios donde funcionaron criaderos, incluso en Paraje Bizcocho y Rincón de Pando, ya que estas poblaciones pueden reaparecer. Es fundamental establecer un sistema de detección temprana y respuesta rápida.

La rana toro está utilizando en los sitios invadidos los cuerpos de agua permanentes en zonas próximas a la ubicación de los antiguos criaderos. Como no estamos visualizando una selección de charcos, sino que más bien un frente de invasión y ocupación de sitios próximos, entendemos que los cambios observados en las comunidades son producto de ingreso de *L. catesbeianus*. Parece claro que la rana toro está actuando como un conductor y no un pasajero de dichos cambios.

Hasta ahora hemos detectado una fuerte estructuración de las comunidades acuáticas nativas, generando un efecto negativo sobre las larvas de anuros y positivo sobre el ensamble de peces (Laufer et al. 2008; Gobel 2013). Además, observamos un decremento de la riqueza y abundancia y una fuerte competencia con el ensamble de anuros adultos (Capítulo 3; Cortizas 2014). Las relaciones tróficas también muestran una importante depredación sobre productores primarios y huevos por parte de las larvas (Ruibal y Laufer 2012) y un rol del adulto como depredador tope (Capítulo 3). Finalmente nuestras observaciones sugieren que todas las poblaciones de rana toro en Uruguay estarían infectadas y tendría un rol en la persistencia de la

quitridiomycosis en las comunidades invadidas (Capítulo 2, 4 y 5). Todo esto hace a la rana toro una amenaza a los ecosistemas, a varias especies prioritarias y áreas de interés de conservación (e.g. ecosistemas prioritarios, Áreas Protegidas, etc.).

Si bien los costos del quitridio no parecen tan evidentes sobre los anuros nativos, los altos niveles de infección detectados en Uruguay serían un factor a considerar en la conservación de anfibios (Capítulo 4 y 5; Borteiro 2016). Además, nuestras observaciones marcan la posibilidad de ocurrencia de efectos no letales sobre los anfibios nativos, en el estado corporal de una especie, en el volumen de ingesta de individuos adultos de gran tamaño y en los daños de los discos orales de renacuajos nativos (Capítulo 4 y 5).

En conclusión, la presente tesis brinda una serie de observaciones básicas iniciales de dos fuertes amenazas a la conservación de los anfibios uruguayos: la invasión de rana toro y la quitridiomycosis. Además, nuestras observaciones suman evidencia sobre la interacción de estas dos amenazas. Por tanto, entendemos que los efectos negativos evidenciados justifican la necesidad de un mantenimiento y aumento de la investigación científica en estos temas en Uruguay.

Recomendaciones

Una vez hecho el diagnóstico del problema, aprovechando la potencialidad de éxito por la invasión temprana de rana toro, se debe pasar a la implementación de medidas de control y erradicación en el terreno. Vale notar que la erradicación en estados tempranos de invasión es posible y ya existen experiencias en otros países (Kraus 2009). Considerando que los cuerpos de agua invadidos se encuentran dentro de predios privados y que el manejo podría generar pequeños perjuicios temporales a los propietarios es fundamental el involucramiento y dirección de las autoridades nacionales de medio ambiente. Además, como fuerza de trabajo local, se debería incluir a las juntas locales, intendencias y otros organismos. Los datos de distribución geográfica presentados, facilitan la realización de estas medidas.

Básicamente un plan de erradicación se debería concentrar en la eliminación rápida de los diferentes estadios de las poblaciones invasoras por medios físicos y/o químicos, con el evitación de la dispersión. Para estos los cuerpos de agua invadidos deberían rodearse de cercos con

trampas de caída durante el periodo de manejo. Para toda medida de control se recomienda el seguimiento y monitoreo antes, durante y después, de las acciones en el terreno. Finalmente el control debe ir acompañado de una restauración de los sistemas que fueron invadidos favoreciendo el establecimiento de la biodiversidad nativa.

Dado el riesgo de reaparición de focos de invasión se debe establecer un sistema nacional de monitoreo que involucre los diferentes actores en contacto con la naturaleza (e.g. investigadores de otras áreas, gestores, militares, clubes de canotaje, ONGs, etc). En caso de ser detectado algún nuevo foco, se debe implementar un plan de respuesta rápida.

Otro aspecto sobre el que amerita profundizar el conocimiento y trabajar en el terreno es la presencia de quitridiomycosis y otras enfermedades. Este es un tema complejo y parece claro que a futuro las enfermedades infecciosas serán unos de los principales desafíos a la conservación de la biodiversidad y los servicios ecosistémicos (Johnson et al. 2013).

Debemos aprender la lección de la introducción de la rana toro. Todo el problema de esta invasión, con sus efectos negativos y enfermedades asociadas podrían haber sido evitados con un simple análisis de riesgo o lo que es más, con un estudio de viabilidad económica del negocio. Pero contrariamente a esto, existió un esfuerzo de algunas instituciones (Facultad de Veterinaria, Universidad de la República y Dirección Nacional de Recursos Acuáticos, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca) para la introducción y diseminación de criaderos de esta especie. A pesar de los resultados evidentes en el terreno, Uruguay sigue fomentando la introducción de especies exóticas invasoras para acuicultura (Carnevia 2008; Foti and Spinetti 2012). Una adecuada política de conservación de la biodiversidad, debería modificar estas estrategias. En caso que se quiera desarrollar la acuicultura se debería fomentar el uso de especies nativas.

Referencias

Borteiro C (2016) Enfermedades de la piel en anfibios de Uruguay y sureste de Brasil: nuevos diagnósticos y posibles efectos. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.

Carnevia D (2008) Análisis de las oportunidades de cultivo de especies acuáticas en Uruguay. DINARA – FAO, Montevideo.

Cortizas S (2014) Respuestas asimétricas de los anuros nativos ante la invasión de rana toro. Tesina de Grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.

Foti R, Spinetti M (2012) Herramientas aplicadas a la evaluación para la introducción y manejo preventivo de las especies exóticas invasoras para su uso en acuicultura. In: Identificación

de prioridades para la gestión nacional de las especies exóticas invasoras, Comité Nacional de Especies Exóticas Invasoras. Comité Nacional de Especies Exóticas Invasoras, Montevideo.

Gobel N (2013) Efectos comunitarios de la invasión de rana toro *Lithobates catesbeianus* en Aceguá, Cerro Largo. Tesina de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.

Johnson PT, Preston DL, Hoverman JT, Richgels KL (2013) Biodiversity decreases disease through predictable changes in host community competence. *Nature* 494:230–233.

Kraus F (2009) Alien reptiles and amphibians: a scientific compendium and analysis. Springer Verlag.

Laufer G, Canavero A, Núñez D, Maneyro R (2008) Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) invasion in Uruguay. *Biol Invasions* 10:1183–1189.

MVOTMA (2016) Estrategia Nacional para la Conservación y Uso Sostenible de la Diversidad Biológica del Uruguay 2016 - 2020. Montevideo.

Nori J, Urbina-Cardona JN, Loyola RD, et al (2011) Climate change and American Bullfrog invasion: what could we expect in South America? *PloS One* 6:e25718.

Ruibal M, Laufer G (2012) Bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Amphibia: Ranidae) tadpole diet: description and analysis for three invasive populations in Uruguay. *Amphib-Reptil* 33:355–363.

ANEXO 1. Evaluación del método utilizado para la detección de rana toro, a través de sus vocalizaciones: horario de actividad

Artículo en prensa en Cuadernos de Herpetología: Laufer, Gabriel; Gobel, Noelia; Soutullo, Alvaro; Martinez-Debat, Claudio; de Sá, Rafael O. Assessment of the calling detection probability throughout the day of two invasive populations of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in Uruguay.

Introducción

Conocer la historia natural de una especie exótica invasora resulta fundamental tanto para entender sus efectos y su performance en un nuevo ambiente, como para monitorearla (Davis 2009). Uno de los atributos más notable de los anfibios es su despliegue vocal, específicamente el canto nupcial de los machos (Wells 2007). *L. catesbeianus* despliega un canto nupcial característico, el cuál le da su nombre por ser parecido al sonido de un toro, consistente en una vocalización fuerte de entre tres y quince llamados secuenciales, con picos de energía bimodales en 0,2 kHz and 1,4 kHz. Entre estos llamados pueden ocurrir silencios de entre 0,5 y 1 segundo (Capranica 1968).

Las vocalizaciones de la rana toro ocurren en periodos prolongados durante los meses cálidos. La evidencia recabada en el hemisferio norte muestra que los cantos ocurren durante las horas de la noche, con temperaturas del agua mayores a 20°C y momentos de poco viento (Oseen y Wassersug 2002). Los machos pueden cantar en forma aislada o formando grandes coros (Emlen 1976).

Se ha observado recientemente que a través de la vocalizaciones también puede ocurrir un efecto no esperado de la invasión, la interferencia en el nicho acústico. La evidencia experimental muestra que una especie de anuro nativo de Brasil del género *Hypsiboas* altera su frecuencia de canto en presencia de la rana toro, con posibles consecuencias negativas para su

éxito reproductivo. Seguramente el efecto en las comunidades acústicas sea aún mucho más importante (Both y Grant 2012).

Una de las mayores utilidades de la vocalización de los anfibios para los investigadores es la especificidad de canto, que permite utilizarlo para muestreos de campo y monitoreo (Heyer et al. 2014). El conspicuo canto de la rana toro resulta una herramienta clara para el muestreo sonoro, que permite determinar los sitios de invasión y la distribución esta especie. Se trata de un canto singular, fuerte y prolongado. Si bien se conocen los momentos de vocalización para el hemisferio norte, esto no ha sido evaluado en los nuevos sitios invadidos en Uruguay. La idea del presente trabajo fue buscar el período más intenso de canto de la rana toro en las poblaciones de Aceguá y San Carlos, para poder determinar los momentos del día óptimos para el muestreo durante el período reproductivo.

Metodología

Para la evaluación de la intensidad de cantos se realizaron grabaciones en campo en tres cuerpos de agua lénticos invadidos, dos en la localidad de Aceguá, Cerro Largo y otro en la localidad de San Carlos, Maldonado. En ambas localidades se realizaron grabaciones durante todo el día con grabadores Panasonic RR-US310. También se registró la temperatura y humedad relativa del aire a nivel del borde del charco y la temperatura del agua, mediante data loggers (Extech RHT10). En la tabla A.1 se resume los sitios, fechas y periodos muestreados.

Tabla A.1. Cuerpos de agua donde se efectuaron grabaciones de canto de machos de rana toro, durante la estación de actividad en el año 2015. En cada caso se detalla la localidad, la fecha y hora de inicio y fin de la grabación, y las coordenadas de ubicación.

Localidad	Fecha	Período	Latitud	Longitud
San Carlos, Maldonado	25 al 26 de diciembre	18:00 a 09:00 hs	34°47'11,7"S	54°53'00,7"O
Aceguá, Cerro Largo	9 al 12 de diciembre	17:00 a 14:00 hs	31°53'35,5"S 31°53'41,2"S	54°09'09,8"O 54°09'11.6"O

A partir de las grabaciones se realizó un sub-muestreo revisando los registros sonoros de cada hora de la grabación. Cada una hora se escucharon los primeros 30 segundos del minuto 0, 1, 2, 3, 4 y 5. De acuerdo con lo escuchado para cada uno de los 30 segundos se asignó un valor entre 0 y 3, correspondiendo el primero a una ausencia total de cantos la rana toro y el último a un evento de vocalizaciones que ocupaban entre dos tercios y el total del tiempo escuchado. Para las dos facciones intermedias, 1/3 y 2/3 del tiempo de vocalizaciones, se utilizaron los valores de 2 y 3 respectivamente. De esta forma, para cada hora se obtuvieron seis valores, los cual fueron sumados para obtener el nivel de intensidad de canto. Además, para cada una de esas horas se obtuvo la temperatura del aire, del agua y la humedad relativa a partir de los registros de campo. Finalmente, utilizando los datos de los diferentes muestreos se calculó un promedio y error estándar de intensidad de canto por hora, además de las variables ambientales.

Resultados y Discusión

Los registros de condiciones ambientales durante el período de muestreo fueron los esperados para diciembre en Uruguay. La temperatura del aire se mantuvo en el entorno de los 20°C durante la noche y aumentó de forma importante durante el día alcanzando un pico a las 15:00 horas. La humedad contrariamente resultó mayor durante la noche, disminuyendo en las horas de mayor calor. La temperatura del agua se mantuvo relativamente constante durante todo el día con pequeños picos asociados a las horas de mayor temperatura (Figura A.1).

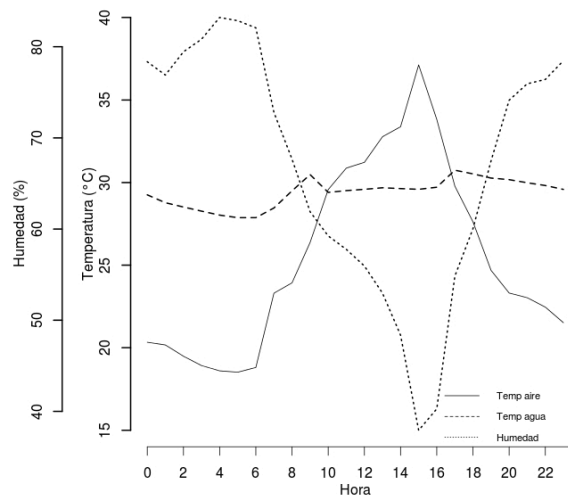


Figura A.1. Registros de variables ambientales durante el periodo de muestreo de actividad vocal de machos de rana toro en Aceguá, Cerro Largo y San Carlos, Maldonado. La gráfica incluye los valores medios de temperatura del aire y del agua, y humedad relativa.

Las vocalizaciones nupciales de los machos de rana toro se registraron durante casi todo el día salvo el período entre las 13:00 y las 16:00 horas. De todas formas la intensidad varió en el correr del día, alcanzándose los mayores valores durante la noche. Pudimos observar que, entre las 20:00 las 5:00 horas se mantuvo una fuerte intensidad de vocalizaciones. Luego de las 5:00 se produjo una disminución fuerte en la intensidad de vocalizaciones, llegando a desaparecer por completo a las 13:00 horas. Luego a la 17:00 horas se inició un suave incremento de la cantidad de vocalizaciones hasta las 20:00 (Figura A.2).

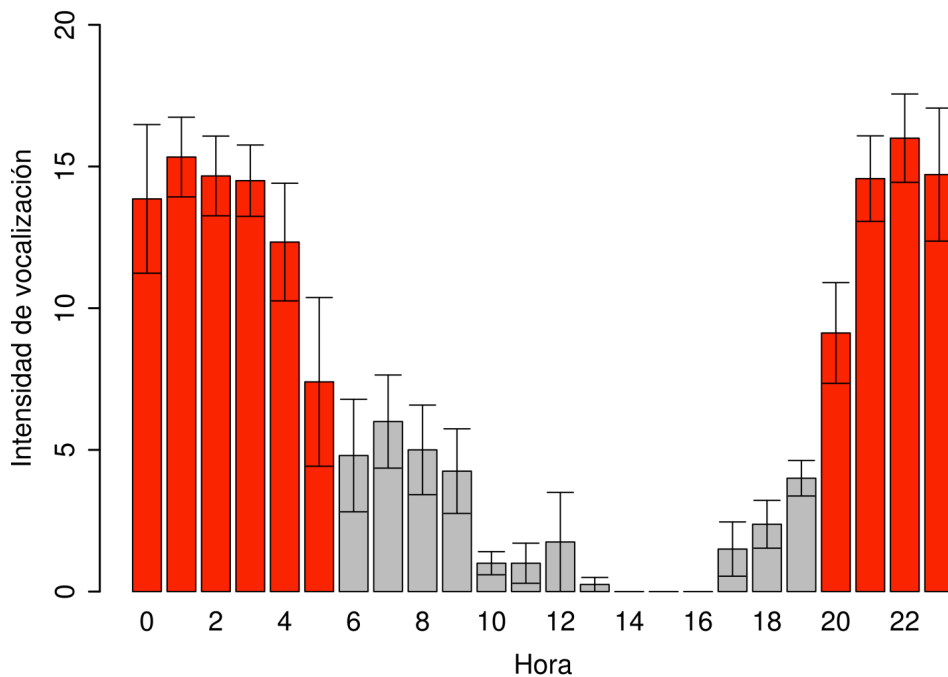


Figura A.2. Nivel de actividad de canto nupcial de machos de rana toro de las localidades de Aceguá, Cerro Largo y San Carlos, Maldonado, en diciembre de 2015. Las barras en gris indican las horas de día y las rojas las horas de noche.

El patrón observado en Uruguay resulta similar al reportado para el hemisferio norte (Bridges et al. 2000). La rana toro tiene un largo periodo de vocalizaciones durante prácticamente toda la noche. Es notorio que el período de canto de rana toro es extenso y se solapa con los menores períodos utilizados por las especies nativas (e.g. Bardier et al. 2014). Sin

duda la alta densidad, intensidad y duración de cantos de la *L. catesbeianus* podría alterar el nicho acústico y sería muy importante evaluar que daños puede producir esto sobre la biodiversidad nativa.

Nuestras observaciones confirman que para nuestra región el muestreo de vocalizaciones de machos durante el período nupcial resulta muy útil, considerando que pudimos confirmar que el periodo ideal para la detección sonora de la especie es óptima entre las 20:00 horas y las 5:00 horas. Es interesante que no aparece en ningún momento caídas en el nivel de las vocalizaciones dentro de este periodo, por lo cual podemos asumir que la detectabilidad sonora de la especie es constante. Si bien durante ciertas horas del día también se puede llegar a registrar a la especie por vocalizaciones, decae drásticamente la probabilidad de detección y por tanto no sería recomendable realizar muestreos sonoros diurnos.

Referencias

- Bardier C, Canavero A, Maneyro R (2014) Temporal and Spatial Activity Patterns of Three Species in the *Leptodactylus fuscus* Group (Amphibia, Leptodactylidae). *South Am J Herpetol* 9:106–113.
- Both C, Grant T (2012) Biological invasions and the acoustic niche: the effect of bullfrog calls on the acoustic signals of white-banded tree frogs. *Biol Lett* 8:714–716.
- Bridges AS, Dorcas ME, Montgomery WL (2000) Temporal variation in anuran calling behavior: implications for surveys and monitoring programs. *Copeia* 2000:587–592.
- Capranica RR (1968) The vocal repertoire of the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Behaviour* 31:302–324.
- Davis MA (2009) *Invasion Biology*. Oxford University Press, USA
- Emlen ST (1976) Lek organization and mating strategies in the bullfrog. *Behav Ecol Sociobiol* 1:283–313.
- Heyer R, Donnelly MA, Foster M, McDiarmid R (2014) *Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians*. Smithsonian Institution
- Oseen KL, Wassersug RJ (2002) Environmental factors influencing calling in sympatric anurans. *Oecologia* 133:616–625.
- Wells KD (2007) *The Ecology and Behavior of Amphibians*. University Of Chicago Press