

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Biología



Diferenciación genética de poblaciones de *Bolitoglossa helmrichi*
(Caudata: Plethodontidae) en Alta Verapaz y Baja Verapaz, Guatemala

Trabajo de graduación presentado por

Flor De María Morales Arroyo

para optar al grado académico de Licenciada en Biología

Guatemala,

2022

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Biología



Excelencia que trasciende

DEL VALLE
GRUPO EDUCATIVO

Diferenciación genética de poblaciones de *Bolitoglossa helmrichi*
(Caudata: Plethodontidae) en Alta Verapaz y Baja Verapaz, Guatemala

Trabajo de graduación presentado por

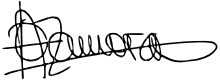
Flor De María Morales Arroyo

para optar al grado académico de Licenciada en Biología

Guatemala,

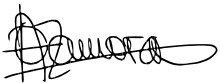
2022

Vo.Bo.

f. 

PhD. Olga Alejandra Zamora Jerez

Tribunal examinador:

f. 

PhD. Olga Alejandra Zamora Jerez

f. 

MSc. Zabdi Moises López Urizar

f. 

MSc. Gabriela Alfaro Marroquín

Fecha de aprobación del examen de graduación:

Guatemala, 6 de junio de 2022

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por el apoyo a lo largo de toda mi carrera, por estar presente en momentos de felicidad, alegría, estrés y por celebrar cada uno de mis logros. A mi papás por brindarme la oportunidad de estudiar en esta universidad y ser el pilar económico que necesité para cumplir uno de mis sueños, por estar pendientes de mi bienestar general, por levantarse conmigo todas las mañanas y motivarme día a día. A mis hermanas Diana y Ceci, por creer en mis capacidades y apoyarme en todo momento.

A mi asesora principal Alejandra Zamora, por su apoyo, interés, tiempo y por ser quién me apoyó durante el planteamiento de este trabajo y proyecto; por brindarme el conocimiento de lo que me apasiona en los últimos años. A Zabdi López, por brindarme apoyo y conocimiento sobre la biogeografía de Guatemala. También agradezco a todos mis catedráticos por compartirme su conocimiento, y dedicarme tiempo y apoyo durante mis años de formación universitaria.

A Marcelo Serrano y a su familia por brindarme la oportunidad, disponibilidad y hospitalidad de trabajar este proyecto dentro de su finca en la Reserva Pamac II y el interés que ha brindado hacia esta investigación. A cada uno de los trabajadores de la finca por apoyarnos como guías locales y especialmente a Felipe por siempre estar atento a las actividades realizadas dentro de la finca y por cuidar de mí y mis colegas.

A Edna Álvarez por abrirme las puertas de trabajar dentro de la Reserva Natural Ranchitos del Quetzal. A su vez a los trabajadores de la reserva quienes estuvieron atentos durante nuestra estadía en la reserva.

A mis amigos de la universidad, Hellen, Mafer, Isa, Chico, Samuel y Ericka no solo por formar parte de los viajes de campo conmigo y apoyarme durante la colecta de los especímenes utilizados en este estudio, si no por crear nuevas experiencias juntos y por el tiempo invertido en apoyarme durante este trabajo. A su vez, a mis otros compañeros de la carrera Andrés, Daniel, Monge, Jairo, Venado y Melvin por las experiencias compartidas a lo largo de la carrera. A mi novio Joshua por ser quien me ha brindado el mayor apoyo emocional durante toda mi formación universitaria y por ser mi motivador diario.

A la Universidad del Valle de Guatemala y al Departamento de Biología por el conocimiento que me han brindado, por brindarme un espacio para mi desarrollo personal y por la formación profesional que me han dado durante estos cinco años de carrera. A su vez, agradezco el apoyo económico que me han brindado durante el transcurso de estos años para poder cumplir mi sueño de ser una científica profesional.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	VII
LISTA DE FIGURAS.....	XII
RESUMEN	XV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. General.....	3
2.2. Específicos	3
3. JUSTIFICACIÓN	4
4. MARCO TEÓRICO.....	5
4.1. Clasificación y distribución de anfibios	5
4.2. Características y distribución del Orden Caudata	6
4.3. Familia Plethodontidae.....	8
4.4. Género <i>Bolitoglossa</i>	10
4.5. <i>Bolitoglossa helmrichi</i>	12
4.6. Ecología molecular y conservación de especies	13
4.7. Genética de poblaciones.....	14
4.8. Diversidad y diferenciación genética	14
4.8.1. Indicadores de diversidad genética.....	15
4.8.2. Factores que afectan la variación genética	15
4.9. Filogeografía.....	16
4.10. Marcadores moleculares y ADN mitocondrial	17
4.10.1. 16S ARN ribosomal (16S)	17
4.10.2. Citocromo B (CytB).....	17
4.11. Biogeografía y patrones de distribución	17
4.11.1. Geografía de Guatemala.....	18
4.11.2. Modelos de Nicho Ecológico	19
5. METODOLOGÍA	20
5.1. Sitios de estudio	20
5.1.1. Reserva Natural Pamac II.....	20
5.1.2. Reserva Natural Ranchitos del Quetzal	20
5.2. Diseño de muestreos y toma de muestras en campo.....	20

5.3.	Procesamiento de muestras	22
5.3.1.	Extracción de ADN	22
5.3.2.	Cuantificación, pureza e integridad de ADN	23
5.3.3.	Amplificación de genes 16S y Cytb	23
5.3.4.	Purificación y secuenciación de ADN	24
5.4.	Análisis de secuencias	24
5.4.1.	Limpieza y alineamiento de secuencias	24
5.4.2.	Análisis de diferenciación genética	24
5.4.3.	Redes de haplotipos.....	25
5.4.4.	Análisis filogenético.....	25
5.4.5.	Análisis biogeográfico y modelación de nicho ecológico.....	25
6.	RESULTADOS	26
6.1.	Análisis de diferenciación genética poblacional.....	29
6.1.1.	Indicadores de diversidad genética	29
6.1.2.	Estructura genética poblacional.....	29
6.1.3.	Historia demográfica poblacional.....	30
6.1.4.	Análisis de haplotipos	31
6.2.	Análisis filogenético	33
6.3.	Análisis biogeográfico	34
7.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	38
7.1.	Ectomización de colas en salamandras del género <i>Bolitoglossa</i>	38
7.2.	Análisis de diferenciación genética poblacional.....	38
7.2.1.	Indicadores de diversidad genética	38
7.2.2.	Estructura genética poblacional.....	39
7.2.3.	Historia demográfica poblacional.....	40
7.2.4.	Análisis de haplotipos	41
7.3.	Análisis filogenético	42
7.4.	Análisis biogeográfico	43
7.5.	Consideraciones finales.....	45
8.	CONCLUSIONES	47
9.	RECOMENDACIONES.....	48
10.	BIBLIOGRAFÍA	49
11.	APÉNDICE.....	59

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Secuencias de los marcadores moleculares utilizados para la amplificación de los genes 16S y Cytb.	23
Cuadro 2. Información de individuos colectados de <i>Bolitoglossa helmrichi</i>	26
Cuadro 3. Análisis de diversidad genética del gen 16S en poblaciones de <i>B. helmrichi</i> . Representando a los sitios polimórficos (S), número de mutaciones (h), número promedio de diferencias nucleotídicas (κ) y la diversidad de nucleótidos presentes en las distintas localidades (π).	29
Cuadro 4. Análisis de diversidad genética del gen Cytb en poblaciones de <i>B. helmrichi</i> . Representando a los sitios polimórficos (S), número de mutaciones (h), número promedio de diferencias nucleotídicas (κ) y la diversidad de nucleótidos presentes en las distintas localidades (π).	29
Cuadro 5. Índice de diferenciación genética (ϕ_{ST}) del gen 16S en poblaciones de <i>B. helmrichi</i> . Los valores de 0 - 0.15 se consideran con diferenciación genética moderada (amarillo), de 0.05 – 0.25 con diferenciación alta y de > 0.25 con diferenciación muy grande (verde).	30
Cuadro 6. Índice de diferenciación genética (ϕ_{ST}) del gen Cytb en poblaciones de <i>B. helmrichi</i> . Las poblaciones con valores de 0 - 0.15 son consideradas con diferenciación genética moderada, de 0.05 – 0.25 con diferenciación alta y de > 0.25 con diferenciación muy grande (verde).	30
Cuadro 7. Test de neutralidad de D de Tajima del gen 16S para las poblaciones de <i>B. helmrichi</i> . En donde * indica un $P > 0.10$ indicando que los datos no son significativos para este estudio. Los valores para la población de Quiché no se obtuvieron debido a que no presenta polimorfismos.	31
Cuadro 8. Test de neutralidad de D de Tajima del gen Cytb para las poblaciones de <i>B. helmrichi</i> . En donde * indica un $P > 0.10$ indicando que los datos no son significativos para este estudio.	31
Cuadro 9. Análisis de contribución de las variables climáticas para los puntos de ocurrencia de <i>B. helmrichi</i> descargados de GBIF.	35
Cuadro 10. Análisis de contribución de las variables climáticas para los puntos de colecta del presente estudio.	35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Árbol filogenético de anfibios vivientes y especies descritas. 5
- Figura 2.** Distribución y riqueza de especies de anfibios a nivel mundial. Los colores representan el número de especie por país. La deformidad del mapa representa las regiones en donde se concentra la mayor diversidad de especies de anfibios, a mayor tamaño, mayor número de especies. 6
- Figura 3.** Distribución y riqueza de especies del Orden Caudata a nivel mundial. Los colores representan el número de especie por país. La deformidad del mapa representa las regiones en donde se concentra la mayor diversidad de especies del Orden Caudata, a mayor tamaño, mayor número de especies. 7
- Figura 4.** Diagrama de pletodóntido con la lengua parcialmente extendida que muestra los músculos y posiciones de los electrodos de registro. Rectus subarcualis (SAR), depresor mandibular posterior (DMP) y recto profundo del cuello uterino (RCP). 9
- Figura 5.** Medidas morfológicas para salamandras del género *Bolitoglossa*. 11
- Figura 6.** Mapa de distribución actual de *Bolitoglossa helmrichi*. 13
- Figura 7.** Mapa de colectas de poblaciones de *Bolitoglossa helmrichi*. A) Departamentos de Guatemala y sitios de colecta. B) Perímetro de la Reserva Natural Privada Pamac II, San Cristóbal Verapaz, Alta Verapaz. C) Perímetro de la Reserva Natural Privada Ranchitos del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz. 21
- Figura 8.** Mapa de puntos de colectados para las poblaciones de *Bolitoglossa helmrichi*. A) Mapa para puntos de colecta en todas las localidades de los departamentos de Alta Verapaz, Baja Verapaz y Quiché. B) Puntos de colecta dentro de la Reserva Pamac II, San Cristóbal Verapaz, Alta Verapaz. C) Puntos de colecta dentro de la Reserva Ranchitos del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz. 28
- Figura 9.** Red de haplotipos para el gen 16S de las poblaciones de *B. helmrichi*. La diversidad de haplotipos es de 0.7384615 y se encuentra representada por círculos en 10 haplotipos. El tamaño de cada círculo es proporcional a la frecuencia de haplotipos. Las mutaciones entre cada haplotipo se presentan con líneas transversales. 32
- Figura 10.** Red de haplotipos para el gen Cytb de las poblaciones de *B. helmrichi*. La diversidad de haplotipos es de 0.8984615 y se encuentra representada por círculos en 19 haplotipos. El tamaño de cada círculo es proporcional a la frecuencia de haplotipos. Las mutaciones entre cada haplotipo se presentan con líneas transversales. 32
- Figura 11.** Reconstrucción de relaciones filogenéticas de las poblaciones de *B. helmrichi* entre las poblaciones, de los genes concatenados 16S y Cytb. Construido bajo el método de Máxima Verosimilitud (ML) con 1,000 de iteraciones, el modelo General Time Reversible (GTR) y el patrón Gamma distribuido con sitios invariantes (G+I). Los números entre nodos indican las probabilidades posteriores. 33
- Figura 12.** Reconstrucción de relaciones filogenéticas de las poblaciones de *B. helmrichi* entre las poblaciones, utilizando el gen 16S. Construido bajo el método de Inferencia Bayesiana con 100,000,000

de iteraciones, el modelo General Time Reversible (GTR) y el patrón Gamma distribuido con sitios invariantes (G+I). Los números entre nodos indican las probabilidades posteriores. 34

Figura 13. Mapa de patrones de distribución según modelación de nicho ecológico para datos de ocurrencia de *B. helmrichi* descargados de la base de datos GBIF. 36

Figura 14. Mapa de patrones de distribución según modelación de nicho ecológico para datos de colecta de *B. helmrichi* del presente estudio. 37

LISTADO DE APÉNDICES

Apéndice 1. Muestras colectadas, localidad, coordinadas, elevación y secuenciación.	59
Apéndice 2. Información de especímenes del género <i>Bolitoglossa</i> descargadas desde GenBank y sus vouchers utilizados para los análisis filogenéticos.	63
Apéndice 3. Script de RStudio para red de haplotipos.	64
Apéndice 4. Códigos de haplotipos y localidades de colecta para el gen 16S.	65
Apéndice 5. Códigos de haplotipos y localidades de colecta para el gen Cytb.	66
Apéndice 6. Medidas de convergencia para el tamaño de la muestra en el análisis de MrBayes. Valor de tamaño de muestra estimado (ESS) y factor de reducción de escala potencial (PSRF+).	67
Apéndice 7. Códigos de las variables bioclimáticas para el análisis de Maxent.	67
Apéndice 8. Análisis de omisión/comisión para datos de colecta en la modelación de Maxent.	68
Apéndice 9. Curvas de respuesta según la probabilidad de presencia para datos de colecta.	68
Apéndice 10. Curvas de respuesta según la probabilidad de presencia para datos de colecta.	69
Apéndice 11. Análisis de Jackknife para la contribución de las variables ambientales.	69
Apéndice 12. Análisis de omisión/comisión para datos de ocurrencia en la modelación de Maxent.	70
Apéndice 13. Curvas de respuesta según la probabilidad de presencia para datos de ocurrencia.	71
Apéndice 14. Curvas de respuesta según la probabilidad de presencia para datos de ocurrencia.	72
Apéndice 15. Análisis de Jackknife para la contribución de las variables ambientales.	73
Apéndice 16. Cara de aprobación del comité de ética, uso y cuidado animal CEUCA-UVG.	74

RESUMEN

Los anfibios son uno de los grupos de vertebrados más diversos y amenazados del mundo. Principalmente por la pérdida y fragmentación de hábitat, cambio climático y epidemias de enfermedades. Guatemala es una de las regiones con mayor diversidad de anfibios, especialmente para la familia Plethodontidae siendo el género *Bolitoglossa* de los más destacados de la familia. *Bolitoglossa helmrichi* es una especie endémica del bosque nuboso del suroriente del país, sin embargo, se encuentra amenazado por prácticas forestales insostenibles, destrucción de hábitat y cambio de uso del suelo.

Las observaciones de campo han determinado que existen diferencias entre las poblaciones de *B. helmrichi*, principalmente en la morfología de los dedos. Por lo tanto, se cree que esta especie debe ser considerada un complejo de especies con poblaciones pequeñas con distribuciones geográficas restringidas. Por tanto, es importante generar y analizar la información sobre las especies a nivel molecular y biogeográfico. Generar esta información nos permite conocer el estado actual de la población, la historia evolutiva de este grupo y analizar importantes barreras geográficas que condicionan la distribución de sus poblaciones.

El objetivo principal de este estudio fue determinar las diferencias genéticas de las poblaciones de *B. helmrichi* en poblaciones de Alta Verapaz y Baja Verapaz. Se colectó un total de 40 salamandras, 30 para la Reserva Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz y 10 en la Reserva Natural Ranchitos del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz. Se extrajo el ADN de todas las salamandras colectadas y de 6 muestras de las Colecciones Herpetológicas de la Universidad de Arlington en Texas. Se obtuvo un total de 24 secuencias para ambos genes de interés y se realizaron análisis de diversidad genética, reconstrucciones de relaciones filogenéticas y modelaciones de nicho ecológico para las poblaciones muestreadas.

Se confirmó que *B. helmrichi* debe ser considerada una especie compleja debido a la alta diferenciación genética que se observó. Además, se observaron altos niveles de polimorfismos genéticos y una gran diversidad de haplotipos, lo que sugiere posibles nuevas especies dentro de este grupo. Los árboles filogenéticos establecieron que las poblaciones muestreadas en la Reserva Natural Privada Pamac II y Chicamán, Quiché deben ser consideradas dos especies diferentes que están estrechamente relacionadas con sus taxones hermanos *B. cuchumatana* y *B. helmrichi*. Se ha establecido que las barreras geográficas son un factor importante para la divergencia de las poblaciones muestreadas junto con los factores antropogénicos.

ABSTRACT

Amphibians are one of the most diverse and threatened groups of vertebrates in the world, mainly due to habitat loss and fragmentation, climate change and epidemic diseases. Guatemala is one of the regions with a high diversity of amphibians, especially from the family Plethodontidae, where the genus *Bolitoglossa* is one of the most outstanding of the family. *Bolitoglossa helmrichi* is one of the endemic species from the cloud forest in the southeast of the country. However, it is threatened by unsustainable forestry practices, habitat destruction and land use change.

Field observations have determined that there are differences between *B. helmrichi* populations, mainly in toe morphology. Therefore, it is believed that this species should be considered a species complex with small populations with restricted geographical distributions. It is important to generate and analyze information at all levels because morphology is generally complementary to molecular and biogeographical information. In addition, generating this information allows us to know the current population status, the evolutionary history of this group and analyze important geographical barriers that determine the distribution of their populations.

The main objective of this study is to determine the genetic differences between the populations of *B. helmrichi* of Alta Verapaz and Baja Verapaz. A total of 40 salamanders were collected, 30 from Reserva Natural Privada Pamac II, San Cristóbal Verapaz, Alta Verapaz and 10 in Reserva Natural Privada Ranchitos del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz. DNA was extracted from all collected samples in addition to 6 samples from the Herpetological Collections at the University of Texas at Arlington. Twenty-four sequences were obtained for the mitochondrial 16s rRNA and Cytochrome b genes. Genetic diversity was analyzed, phylogenetic relationships were reconstructed, and natural distribution patterns were determined for the sampled populations.

It was confirmed that *B. helmrichi* should be considered a complex species due to the high genetic differentiation that was observed. In addition, high levels of genetic polymorphisms and a great diversity of haplotypes were observed, suggesting possible new species within this group. The phylogenetic trees established that the populations sampled in the Reserva Natural Privada Pamac II and Chicamán, Quiché should be considered two different species that are closely related to their sister taxa *B. cuchumatana* and *B. helmrichi*. Geographical barriers have been established to be an important factor for the divergence of sampled populations along with anthropogenic factors.

1. INTRODUCCIÓN

Los anfibios son un tema reciente de atención pública y de investigación debido a la continua disminución de sus poblaciones, especialmente por ser uno de los grupos de vertebrados más más diversos y amenazados del mundo (Cryer *et al.*, 2019). La pérdida y fragmentación de hábitat, el cambio climático y las epidemias de enfermedades han sido las causas de la disminución de muchas poblaciones de anfibios a nivel global. Estas pérdidas se han reflejado en cambios de los patrones ecológicos, distribución de especies y asociaciones taxonómicas (Baillie *et al.*, 2004).

Guatemala es una de las regiones con mayor diversidad biológica debido a su alta variación topográfica y climática. Los anfibios representan gran parte de la biodiversidad en el país, principalmente para las salamandras de la familia Plethodontidae la cual cuenta con un total de 493 especies distribuidas en 28 géneros (Campbell *et al.*, 2010; Wake, 2019; AmphibiaWeb, 2022). El género *Bolitoglossa* es de los más destacados de esta familia, cuenta con 136 especies descritas hasta la fecha y 41 se encuentran distribuidas en el país (Campbell *et al.*, 2010; AmphibiaWeb, 2022).

Bolitoglossa helmrichi es una especie endémica del bosque nuboso del suroriente de Guatemala. Habita en altitudes que van desde 1,000 a los 2,290 msnm. Se encuentra catalogada como Vulnerable según los criterios de la Lista Roja de la UICN. Esta especie se encuentra en disminución por prácticas forestales insostenibles, destrucción de su hábitat y cambio en el uso del suelo (IUCN, 2019). Observaciones de campo han determinado que existe variación morfológica entre poblaciones, principalmente en los dedos de los pies. Por lo que se cree que esta especie debería de ser considerada un complejo de especies compuesto por poblaciones pequeñas con rangos geográficos restringidos (Rovito *et al.*, 2010).

En lugares con alta diversidad de especies y endemismo, como Guatemala, es crucial generar información sobre estas tanto a nivel genético como geográfico. El uso de herramientas moleculares permite ampliar y complementar la información acerca de los organismos, dando a conocer el flujo genético de poblaciones, diversidad genética, posibles eventos de especiación, analizar posibles barreras geográfica importantes y factores influyentes en la distribución de las especies. Esto nos permite monitorear las poblaciones actuales de una especie y poder determinar acciones específicas para su conservación. Este estudio pretende analizar por primera vez el estado actual de dos poblaciones de *B. helmrichi* mediante análisis de secuencias de ADN mitocondrial, generando análisis de diversidad genética, reconstrucciones históricas evolutivas y biogeográficas.

Se extrajo el ADN de colas e hígados de 46 salamandras y se generaron un total de 48 secuencias de 24 individuos para cada uno de los genes mitocondriales 16S ARN (16S) y Citocromo B (Cytb). Se generaron índices de diversidad genética y análisis de haplotipos para establecer el grado de diferencia entre las poblaciones estudiadas. Se realizaron dos árboles filogenéticos con las secuencias de los genes concatenadas utilizando los métodos de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana con el modelo de sustitución nucleotídica a General Time Reversible (GTR), bajo el patrón Gamma (G) y distribuido con sitios invariantes (I). Finalmente se realizaron mapas de distribución por medio de la modelación

de nicho ecológico con el algoritmo de MaxEnt y 19 variables bioclimáticas para establecer los patrones de distribución de las poblaciones de *B. helmrichi*.

2. OBJETIVOS

2.1. General

Determinar las diferencias genéticas entre las poblaciones de *Bolitoglossa helmrichi* de Alta Verapaz y Baja Verapaz mediante el uso de los genes 16S y Cytb.

2.2. Específicos

2.2.1. Reconstruir relaciones filogenéticas de las poblaciones de *B. helmrichi*.

2.2.2. Establecer las diferencias genéticas entre las poblaciones de *B. helmrichi*.

2.2.3. Determinar la diversidad genética de las poblaciones muestreadas de *B. helmrichi*.

2.2.4. Modelar la distribución natural potencial de *B. helmrichi*.

3. JUSTIFICACIÓN

Los anfibios son el grupo de vertebrados más amenazados y menos conocidos en diversas áreas geográficas. Guatemala es uno de los mayores centros de diversidad especialmente para la familia Plethodontidae, no obstante, sigue siendo un taxon poco estudiado en la actualidad. Los estudios con mayor influencia fueron realizados por Brocchi en 1883, la Universidad de California en Berkeley de 1969 a 1979 y la Universidad de Texas Arlington entre los años ochenta y a principios de los noventa. Estas expediciones dieron lugar a múltiples publicaciones de nuevas especies de salamandras en la región. La mayoría de estos estudios han utilizado la morfología para categorizar a los organismos, sin embargo, estos datos no siempre brindan evidencia sólida para definir a una especie, ya que la especiación no necesariamente genera cambios morfológicos evidentes en una población. Por lo tanto, es importante realizar la integración de datos morfológicos, genéticos y biogeográficos para obtener información más confiable y determinar si una especie conocida debe dividirse en un complejo de especies.

Bolitoglossa helmrichi (Schmidt, 1936) es una salamandra endémica de los bosques nubosos del suroeste de Guatemala. Esta especie habita desde los 1,000 hasta los 2,290 msnm y tiene un área de distribución aproximada de 7,943 km². Se encuentra localizada en montañas asociadas al bosque pluvial subtropical y muy húmedo de Guatemala. Estas zonas presentan alto grado de amenaza por variaciones climáticas y cambios en los patrones de precipitación por prácticas forestales insostenibles y cambio del uso del suelo convirtiendo el bosque a tierras agrícola. Debido a la destrucción de hábitat y a la disminución de sus poblaciones esta se encuentra en la lista roja de la UICN catalogada como vulnerable (IUCN, 2019).

A pesar de ser una especie poco estudiada, observaciones de campo sugieren que debería considerarse un complejo de especies compuesto por varias poblaciones pequeñas con rangos de distribución restringidos y sin ningún estado de protección actual. Para poder comprender la genética de poblaciones y la historia evolutiva de esta especie, es necesario coleccionar más individuos de sus poblaciones y generar información genética y biogeográfica de las mismas, siendo este estudio el primero en reunir dicha información.

El uso de herramientas moleculares permite ampliar y complementar la información sobre las especies, dando a conocer el grado de diferenciación y flujo genético. En conjunto con los análisis biogeográficos permite analizar posibles barreras geográficas importantes y factores influyentes en la distribución de las especies. Generar esta información es de importancia para países que presentan alta biodiversidad como Guatemala y en donde estos estudios son escasos.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Clasificación y distribución de anfibios

La clase Amphibia engloba a todos los organismos conocidos como anfibios los cuales se caracterizan por tener piel glandular suave, húmeda y sin escamas externas. Son animales que cuentan con fertilización externa o interna, y los huevos generalmente son colocados en agua o en entornos húmedos (Vargas-García, 2015). La mayoría de los anfibios cuentan con una larva acuática con metamorfosis en la etapa adulta. La respiración la realizan a través de pulmones simples, branquias, piel y membranas bucofaríngeas (National Research Council, 1974).

La clase Amphibia se dividen en tres subclases: Lepospondyli y Temnospondyli, las cuales se encuentran extintas; y Lissamphibia incluye a todos los anfibios vivos. La subclase Lissamphibia cuenta con tres órdenes: Gymnophiona (Cecílicos), Caudata (Salamandras) y Anura (Sapos y Ranas; Figura 1). El número de especies en cada grupo depende de la clasificación taxonómica, sin embargo, actualmente se conocen más de 8,4740 especies de anfibios (AmphibiaWeb, 2022).

A nivel mundial las regiones tropicales presentan características esenciales para el desarrollo de los anfibios ofreciendo patrones climáticos adecuados, microhábitats delimitados y ausencias de grandes depredadores (Bickford *et al.*, 2007). Por tanto, las regiones tropicales y templadas albergan la mayor parte de la diversidad de los anfibios en la actualidad (FAO, 2020). La Figura 2, muestra el número de especies aproximadas por país en donde el color representa el número de especies para cada región y brinda una perspectiva de la distribución de este grupo a nivel mundial.

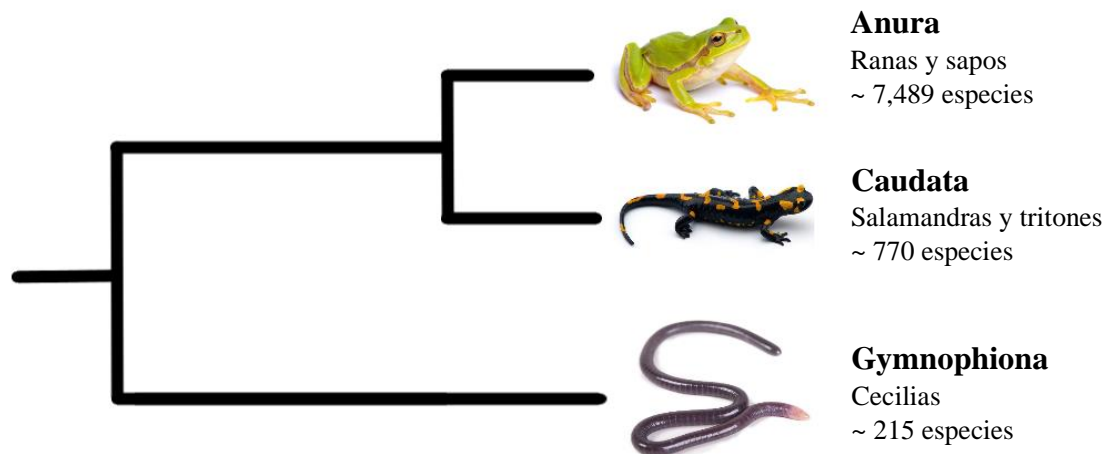


Figura 1. Árbol filogenético de anfibios vivos y especies descritas.

Fuente: Elaboración propia.

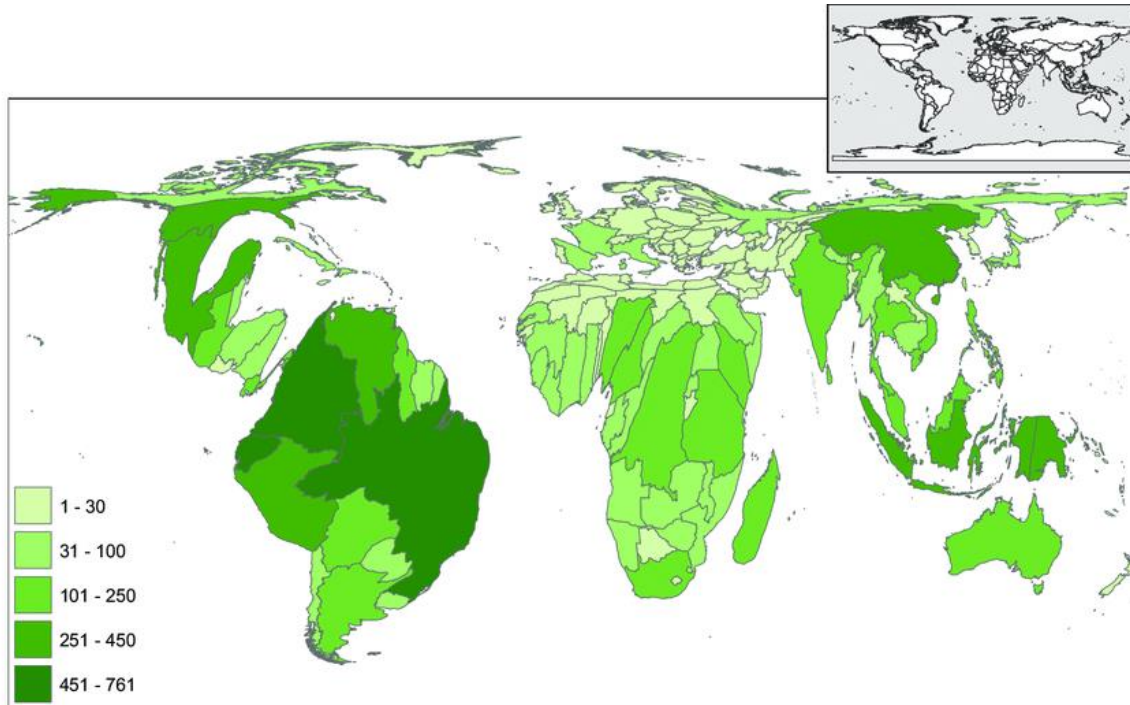


Figura 2. Distribución y riqueza de especies de anfibios a nivel mundial. Los colores representan el número de especie por país. La deformidad del mapa representa las regiones en donde se concentra la mayor diversidad de especies de anfibios, a mayor tamaño, mayor número de especies.

Fuente: (Wake & Vredenburg, 2008).

4.2. Características y distribución del Orden Caudata

El Orden Caudata incluye a las salamandras y tritones, siendo un clado de anfibios compuesto por alrededor de 770 especies descritas (AmphibiaWeb, 2022). Se distribuyen principalmente en los continentes del hemisferio norte a excepción de algunas especies distribuidas en Suramérica (Figura 3). Más de la mitad de las especies se encuentra en latitudes tropicales en América Central y del Sur. El rango total de salamandras se encuentra dividido en 13 regiones faunísticas, sin embargo, en Centroamérica la variación de abundancia de especies entre regiones faunísticas se encuentra ligado a factores climáticos y topográficos, siendo las tierras altas de mayor influencia (Wake, 2019).

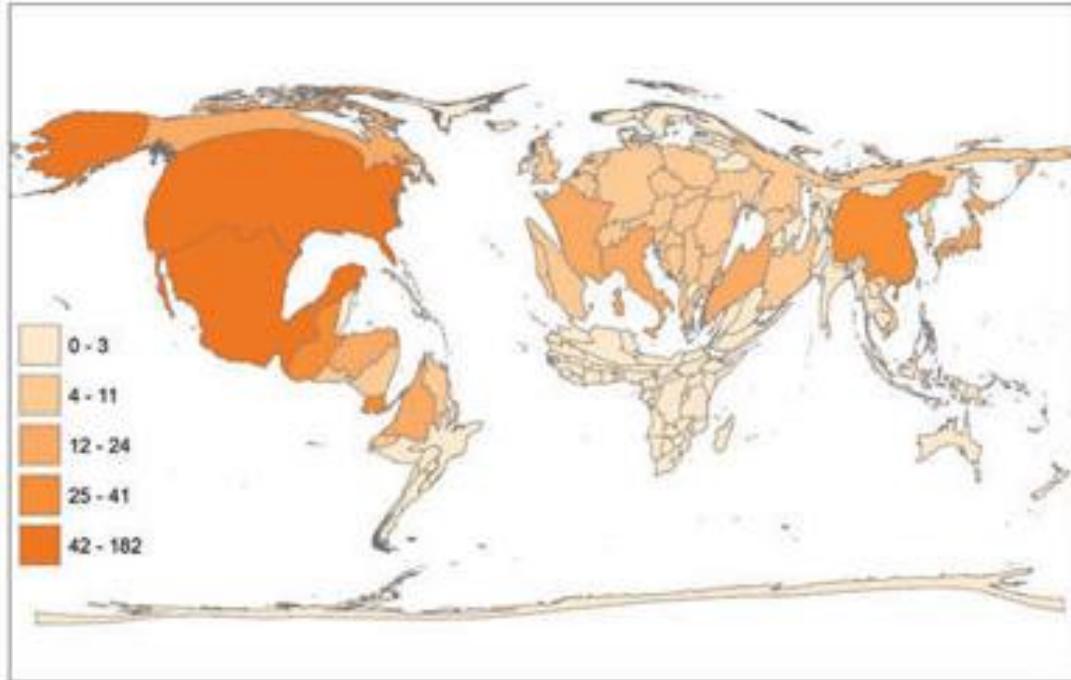


Figura 3. Distribución y riqueza de especies del Orden Caudata a nivel mundial. Los colores representan el número de especie por país. La deformidad del mapa representa las regiones en donde se concentra la mayor diversidad de especies del Orden Caudata, a mayor tamaño, mayor número de especies.

Fuente: (Koo *et al.*, 2013).

Este grupo presenta cuatro extremidades, comúnmente todas de la misma longitud y con bocas de gran tamaño; algunos con pequeños dientes débiles, maxilares y vomerianos (Vitt & Caldwell, 2014). Por ello son animales engullidores ya que introducen en su tracto digestivo a sus presas sin masticación previa. Poseen cráneos anchos y planos con huesos parietales fusionados y provistos de dientes curvados. La cintura pélvica en su mayor parte es cartilaginosa careciendo de cintura escapular dérmica (Wake, 2019). A diferencia de los anuros, poseen cola desarrollada durante todas las fases de su vida y carecen de oído medio. La mayoría no superan los 30 cm de longitud con algunas excepciones (Vitt & Caldwell, 2014). Son destacan por ser capaces de regenerar extremidades, colas y órganos internos luego de ser amputados, permitiéndoles poseer autonomía caudal como medio para escapar de potenciales depredadores (Miller & Fowler, 2014).

La ecología de las salamandras es parcial o completamente arbórea y algunas son especies acuáticas durante toda su vida. Habitan principalmente en bosques nubosos o bosques montanos húmedos (Wells, 2007). A diferencia de otros vertebrados, las salamandras de los trópicos cuentan con rangos de distribución bastante reducidos, con alto endemismo local para especies del bosque nuboso. No obstante, las especies de hábitats de tierras bajas cuentan con rangos geográficos más extensos (Wells, 2007; Miller & Fowler, 2014; Wake, 2019).

4.3. Familia Plethodontidae

Los pletodóntidos son un grupo de salamandras sin pulmones y sin ranuras nasolabiales con quimiorreceptores. Respiran por la piel y los epitelios ubicados en la cavidad bucofaríngea. (Cogger *et al.*, 1998). Se caracterizan por tener una lengua extremadamente larga que funciona como proyectil y se encuentra adherida a la cadera permitiéndoles capturar a sus presas con una gran velocidad (Figura 4; Köhler, 2011). Son completamente terrestres y ponen huevos en tierra, como consecuencia, muchas especies carecen de etapa larvaria acuática, un fenómeno conocido como desarrollo directo en donde las crías eclosionan con forma de adultos completamente formados con un tamaño reducido. El desarrollo directo está relacionado con los aumentos en el tamaño de los huevos y la duración del desarrollo embrionario. Además, la pérdida evolutiva del estado larval acuático permite que tengan una menor dependencia de hábitats acuáticos para su reproducción. Esto permitió una colonización y diversificación dentro de un amplio número de hábitats terrestres y el éxito de la proliferación de la familia Plethodontidae (Lewis *et al.*, 2011; Semlitsch *et al.*, 2014).

Generalmente habitan en zonas con alta humedad debido a que les permite respirar a través de la piel. Abarcan una gran diversidad de zonas adaptativas desde hábitats acuáticos hasta hábitats estrictamente terrestres y arbóreas (Wake, 1966). Algunas especies de pletodóntidos cuentan un ciclo de vida bifásico, con una larva acuática y terrestre como la mayoría de los miembros del supergénero *Desmognathus* y la subfamilia Hemidictyliinae. No obstante, otros grupos son completamente acuáticos y de forma larval permanente como la subfamilia Spelerpinae quienes generalmente habitan en corrientes. Se cree que el ancestro de los pletodóntidos fue semiacuático con larvas acuáticas y branquias que habitaban en arroyos pasando por metamorfosis y dando lugar a adultos con rasgos terrestres (Wake & Marks, 1993; Mueller *et al.*, 2004).

En algunos lugares, los pletodóntidos constituyen la biomasa dominantes de vertebrados debido a su modesto tamaño y bajo metabolismo, siendo capaces de alimentarse de presas como colémbolos que suelen ser demasiado pequeños para otros vertebrados terrestres. Dando acceso a un nicho ecológico con competencia mínima de otros grupos (Hairston, 2009).

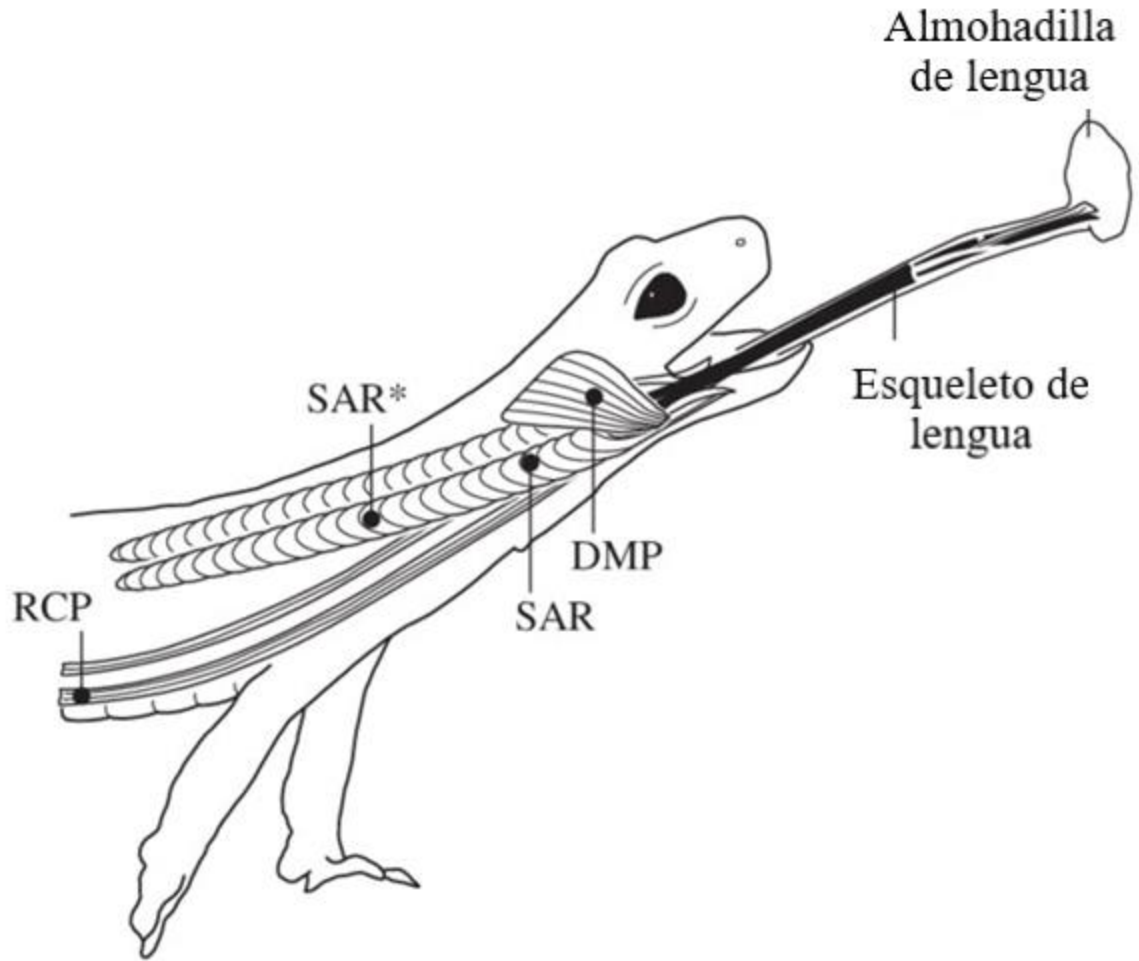


Figura 4. Diagrama de pletodóntido con la lengua parcialmente extendida que muestra los músculos y posiciones de los electrodos de registro. Rectus subarcualis (SAR), depressor mandibular posterior (DMP) y recto profundo del cuello uterino (RCP).

Fuente: (Deban & Dicke, 1999).

La familia Plethodontidae es una de las familias más amplias de Caudata, representando a más de 493 especies (AmphibiaWeb, 2022), sin embargo, su taxonomía sigue siendo un amplio debate en la actualidad. Esta familia se dividió en dos subfamilias: Hemidactyliinae y Plethodontinae. En Centroamérica, las salamandras pertenecen a la subfamilia Hemidactyliinae, la cual cuenta con 21 géneros y más de 387 especies descritas (AmphibiaWeb, 2022). Esta subfamilia se distribuye desde Nueva Escocia y al extremo sureste de Alaska hacia el sur llegando al este de Brasil y al centro de Bolivia; siendo Mesoamérica el centro de diversidad más importante de este grupo (Köhler, 2011). Las salamandras de la familia Plethodontidae son representadas principalmente por el supergénero *Bolitoglossa*, el cual se distribuye en Mesoamérica y siendo las tierras altas de Guatemala occidental una de las áreas de mayor diversidad (Campbell *et al.*, 2010).

4.4. Género *Bolitoglossa*

El género *Bolitoglossa* cuenta con siete subgéneros: *Bolitoglossa*, *Magnadigita*, *Eladinea*, *Mayamandra*, *Nanotriton*, *Oaxakia* y *Pachymandra* (Townsend *et al.*, 2009). Este género es comúnmente conocido por sus salamandras con lengua en forma de hongo. Actualmente se han descrito alrededor de 136 especies ubicadas desde México y Centroamérica, hasta Colombia, Ecuador y Bolivia (AmphibiaWeb, 2022). Las especies de este género habitan en elevaciones que van desde 90 hasta 3,000 msnm y en hábitats que incluyen bosques andinos, bosques subandinos y tierras bajas tropicales (Acosta-Galvis & Gutiérrez-Lamus, 2012; Rovito *et al.*, 2012).

Este género de salamandras es muy diverso en cuanto a comportamiento y características morfológicas. Pueden encontrarse en hábitats arbóreos, bromelias, debajo de troncos podridos o en parches de musgo (Meza-Joya *et al.*, 2017). El hábitat depende del comportamiento de cada especie, a veces permanecen en el dosel durante el día mientras duermen y luego bajan hasta el suelo del bosque para aparearse, alimentarse o descansar sobre los helechos (Rovito *et al.*, 2012).

La morfología de estas salamandras es consistente dentro de las especies únicamente en relación al tamaño relativo, la forma de la cabeza, protuberancias del ojo y labiales, el número relativo de surcos costales y el grado de membranas de piel (Rovito *et al.*, 2012). Ha sufrido una extensa radiación evolutiva en los trópicos del Nuevo Mundo, incluyendo hábitats altamente arbóreos y fosoriales. Sus orígenes evolutivos tanto paralelos como convergentes permiten que este género obtenga membranas interdigitales amplias, las cuales están asociadas a su hábitat arborícola en vegetación húmeda y también sus formas alargadas (Wake & Lynch, 1975).

Cuentan con una alta variación fenotípica en sus patas, siendo estas la mayor fuente de variación entre especies ya que pueden tener mucho o muy poco tejido interdigital (Figura 5, García-París *et al.*, 2008). A su vez, la coloración es altamente variable entre especies, sin embargo, el dorso es típicamente marrón y pueden tener manchas, o rayas de colores (Rovito *et al.*, 2012). El vientre generalmente siempre es más claro que el dorso y los iris pueden ser de color dorado, cobrizo o marrón (Townsend *et al.*, 2009). Existe dimorfismo sexual, ya que las hembras son de un mayor tamaño que los machos y tienen dientes más grandes en la parte frontal de la boca (Brcko *et al.*, 2013).

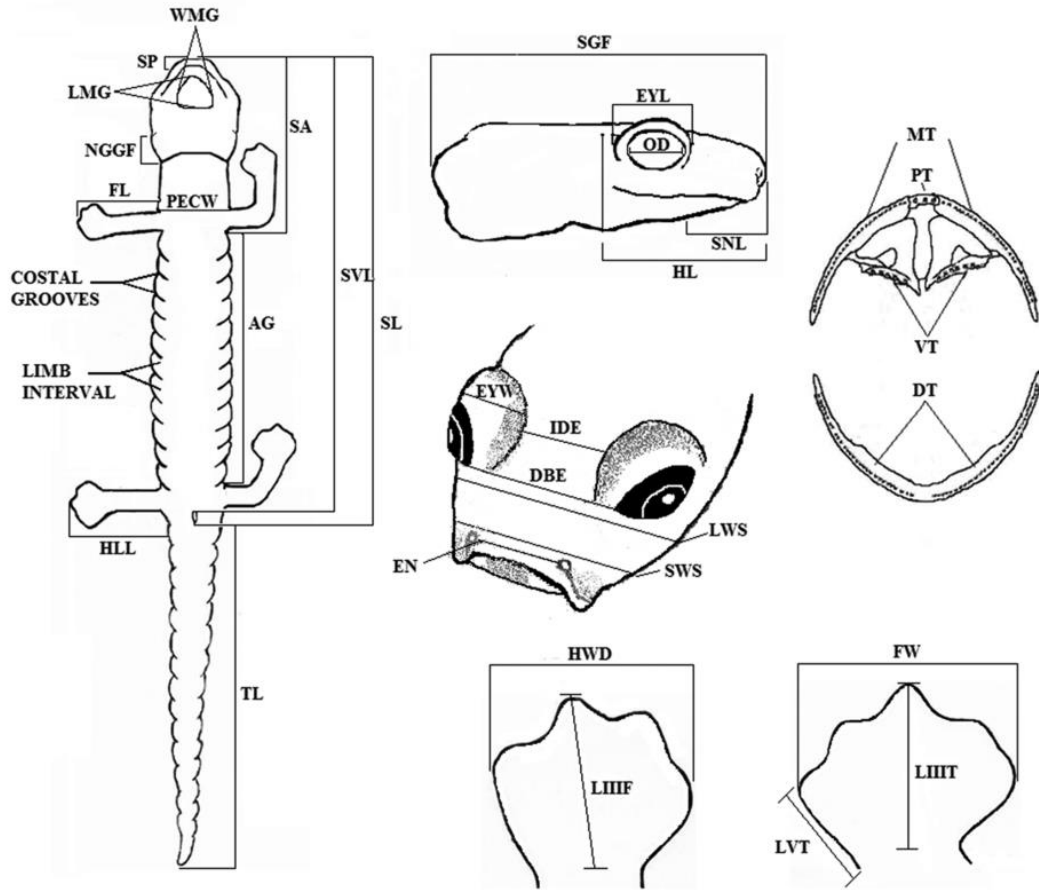


Figura 5. Medidas morfológicas para salamandras del género *Bolitoglossa*.

A pesar de su alta diversidad, el rol ecológico del género *Bolitoglossa* es poco estudiado. Sin embargo, se conoce que forman parte de las presas de muchas especies de reptiles y son depredadores de muchos insectos, moluscos y crustáceos (Anderson & Mathis, 1999). Se ha realizado poca investigación sobre aspectos de comportamiento y diversidad críptica de este género. No obstante, al igual que mucho otros anfibios, se encuentran amenazadas por la pérdida y fragmentación de hábitat debido a la agricultura, el cambio en el uso de la tierra, contaminación y el desarrollo de infraestructura (IUCN, 2008).

4.5. *Bolitoglossa helmrichi* (Schmidt, 1936)

Bolitoglossa helmrichi es una especie endémica de Guatemala la cual vive únicamente en los bosques nubosos de la zona montañosa en el suroriente de Guatemala, a una altitud entre 1,000 – 2,290 msnm. Esta especie pertenece al grupo *rostrata*, anteriormente conocido como grupo *helmrichi*, el cual incluye a especies como *B. cuchumatana*, *B. helmrichi*, *B. engelhardti* y *B. rostrata* (Wake & Brame, 1969; Parra-Olea *et al.*, 2004; Campbell *et al.*, 2010). Se creía que su distribución se ubicaba únicamente en las regiones montañosas del suroeste de Alta Verapaz y Baja Verapaz. Recientemente se ha encontrado en Sierra de Las Minas y existen registros en Zacapa y El Progreso (Figura 6). Siendo su extensión de ocurrencia estimada (EEO) de 7,943 km² (IUCN, 2019).

B. helmrichi se considera un complejo de especies con altos niveles de similitud morfológica y con ausencia de características diagnósticas claras dentro de las poblaciones. La mayoría de los individuos cuentan con franjas dorsolaterales pálidas que se extienden desde detrás de los ojos hasta la base de la cola. En algunos de los casos, el dorso es pálido y forma una amplia banda dorsal marcada por flancos más oscuros. *B. rostrata* y *B. cuchumatana* tienden a parecerse mucho a esta especie, sin embargo, *B. helmrichi* suele ser más pálida que las otras especies. A su vez, pueden diferenciarse por la longitud relativa de los dedos (Campbell *et al.*, 2010).

Se caracteriza por ser tener un tamaño pequeño-mediando, donde los adultos alcanzan una longitud estándar (SL) promedio de 43.1 mm en machos y 42.8 mm en hembras, un promedio de dientes 56.4 dientes maxilares (MT) y 30.9 diente vomerianos (VT) en adultos. Las fosas nasales son pequeñas y las protuberancias labiales son moderadas en hembras y más desarrolladas en machos. La cabeza tiene una media de 5.7 mm en machos adultos y 5.9 en hembras adultas. Los ojos son ligeramente protuberantes y no son visibles más allá de margen de la mandíbula al verlas desde abajo. Cuentan con pocos dientes premaxilares, 2 – 3 en machos y 3 – 7 en hembras. Las extremidades de *B. helmrichi* son delgadas y moderadamente largas, que varían de 1 – 10 mm en machos y de 5 – 15 mm en hembras. La longitud de dedos de las manos va en orden decreciente 3, 2, 4, 1; y los dedos de los pies 3, 4, 2, 5, 1 (Wake & Brame, 1969).

Su coloración es altamente variable, cuentan con una franja dorsal de borde claro, con color marrón, la franja más pronunciada va sobre sus hombros. Algunos individuos cuentan con estas franjas marcadas y bordeadas por una con una pigmentación más oscura en forma de Y en la base de la cabeza, sin embargo, no todos los individuos cuentan con la presencia de estas franjas ya que algunos únicamente cuentan con manchas oscuras dispersas en la espalda y cola. Las colas generalmente tienen una pigmentación amarillenta y anaranjada clara ventralmente y tienen algunas pequeñas manchas oscuras (Wake & Brame, 1969).

Habita principalmente en los bosques nubosos y se pueden encontrar en plantaciones de café bajo sombra y dentro de árboles de banano cercanas al bosque. Tiende a ser arbórea bajo la corteza de los árboles y en bromelias (Wake & Brame, 1969). Esta especie se encuentra amenazada principalmente por cambios en las prácticas agrícolas, aunque puedan persistir en cafetales de sombra, no logra sobrevivir en áreas abiertas debido a la pérdida de humedad la cual no les permite respirar adecuadamente. La deforestación es una amenaza

conservación implementando el uso de genes mitocondriales, nucleares y microsatélites para determinar el flujo de genes y la relación entre poblaciones de una especie. A su vez, los datos genéticos moleculares permiten responder a preguntas ecológicas relacionadas con la biogeografía, genómica, genética de conservación y ecología del comportamiento (Freeland, 2014; Miglani, 2015).

Las técnicas moleculares han avanzado a lo largo del tiempo, estas se han vuelto importantes e indispensables para la resolución de problemas genéticos y de conservación. Se ha implementado para determinar relaciones entre poblaciones, especies e individuos. Por lo que se ha implementado para la conservación de especies con el fin de reducir el riesgo de extinción de las mismas (Haig, 1998; Joyce & Pullin, 1999). En la actualidad la estructura genética de poblaciones naturales ha sido afectada por fragmentación y destrucción de hábitat, contaminación, introducción de especies exóticas, sobreexplotación de recursos naturales, cambios en el uso de la tierra y calentamiento global (Lande, 1998). Por lo cual es importante estudiar y mantener los niveles adecuados de diversidad genética inter e intra poblacional ya que la supervivencia de las mismas no está asegurada (Haig, 1998).

Por tanto, el estudio de la ecología molecular permite obtener información sobre límites poblacionales, estructura genética, patrones de migración, flujo genético; convirtiéndose en una herramienta importante para establecer áreas importantes para la conservación tales como corredores biológicos, restauración de áreas degradadas, translocaciones de individuos, entre otros (Landweber & Dobson, 1999).

4.7. Genética de poblaciones

La genética de poblaciones es la rama de la genética que busca describir la variación y distribución de la frecuencia alélica para explicar fenómenos evolutivos. En donde una población se define como un grupo de individuos de una misma especie que están aislados reproductivamente de otros grupos afines y que comparten el mismo hábitat. Estas poblaciones están sujetas a cambios evolutivos en los que subyacen cambios genéticos y están influenciados por la selección natural, deriva genética, flujo genético, mutación y recombinación genética (Gillespie, 2004; Säll & Bengtsson, 2017). La genética de poblaciones pretende establecer qué tan diversas son las especies o una población, si existen diferentes poblaciones cercanamente relacionadas, de qué forma se mantiene la variación genética, cuáles son los genes o alelos responsables de la variación fenotípica y cómo las especies están relacionadas y cómo adquieren su distribución geográfica (Cutter, 2019; Orr, 2010).

4.8. Diversidad y diferenciación genética

La diversidad genética se define como las variaciones heredables de cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie. Esto determina su capacidad de adaptación ante variaciones ambientales e incluso efectos de perturbación humana (Campbell & Reece, 2007). La diversidad genética es importante de preservar ya que es el potencial evolutivo de una especie ante posibles cambios en su entorno y su respuesta física y biológica. Cabe destacar que a mayor variabilidad genética

las especies tienen mayor probabilidad de sobrevivir, sin embargo, pocos estudios se han realizado sobre especies silvestres (Hughes *et al.*, 2008).

La diferenciación genética ocurre cuando existe un flujo genético restringido entre poblaciones definido por parches de hábitat únicos separados por factores geográficos o ecológicos los cuales restringen la dispersión de las especies. Estos factores pueden ser ríos, montañas, lagos, entre otros (Bohonak, 1999). No obstante, cada parche puede proporcionar un hábitat continuo que se extiende a distancias mayores a las que puede cubrir la dispersión individual, y por tanto, las diferencias genéticas se pueden observar dentro de poblaciones continuas, ya que los apareamientos entre individuos no serán aleatorios con respecto a la distancia que existe entre ellos (Wright, 1943).

Varios estudios han establecido taxones con distancias genéticas fuertes, especialmente en poblaciones de especies con capacidad de dispersión limitadas como lo son los anfibios (Bohonak, 1999). Por lo tanto, se han implementado diversos análisis para estimar el grado de diferenciación genética de poblaciones y establecer las causas principales de la diferenciación entre estas.

4.8.1. Indicadores de diversidad genética

Actualmente existen distintos parámetros e indicadores que estiman la diversidad genética de poblaciones empleando el uso de marcadores moleculares. Estos son utilizados con mayor frecuencia para medir la diversidad genética ya que utilizan regiones del ADN que permiten conocer la evolución de la variabilidad, y procesos de deriva genética o cuello de botella. Generalmente, los marcadores moleculares más utilizados son los microsatélites, marcadores de genes nucleares y mitocondriales (Hughes *et al.*, 2008).

A partir de las secuencias de los marcadores moleculares se pueden obtener parámetros como la diversidad haplotípica, diversidad nucleotídica, y número de polimorfismos genéticos (Garnacho-Montero *et al.*, 2005; Singh & Kulathinal, 2013). También se pueden obtener otros indicadores como el índice de fijación (Wright, 1943) y las pruebas de neutralidad (Tajima, 1989). Estos en conjunto nos permiten establecer el grado de divergencia que existe entre las poblaciones estudiadas.

4.8.2. Factores que afectan la variación genética

Comprender la influencia de factores abióticos, altitud, topografía e historia en la distribución espacial de la variación genética es de importancia en estudios de ecología molecular (Carstens *et al.*, 2005). Las características climáticas, altitudinales y latitudinales influyen en la proporción de hábitat y son un factor importante en los patrones migratorios. Se sabe que los cambios en altitud pueden influir en la diferenciación genética de poblaciones de una especie a través de la adaptación local (Giordano *et al.*, 2007).

La selección natural divergente, definida como la selección que surge por condiciones ecológicas desiguales, promueve cambios fenotípicos y genéticos entre las poblaciones siendo una fuente clave en la diversidad biológica (Nosil *et al.*, 2009). Los cambios altitudinales tienen un efecto directo en la variación de los individuos de una especie, principalmente si viven en distintas zonas de elevación las cuales pueden inducir a

disparidades fenotípicas y genéticas debido a la selección ecológica divergente (Feijó *et al.*, 2019). Diversos estudios han establecido que la divergencia fenotípica y genética entre poblaciones de animales a lo largo de gradientes altitudinales no es un fenómeno raro. Se han detectado en numerosas especies de artrópodos, lagartos, anfibios, aves y mamíferos (Grieco & Rizk, 2010; Keller *et al.*, 2013; Branch *et al.*, 2017).

Los paisajes de montaña son una barrera importante para la distribución de anfibios y flujo genético. Esto es de importancia ya que los anfibios son particularmente sensibles a efectos de la variación altitudinal y topográfica por diversas razones (Vences & Wake, 2007). Los anfibios generalmente son malos dispersores de genes y presentan alta filopatría, es decir que existen muchas especies diferentes que pertenecer en un mismo territorio (Allentoft & O'Brien, 2010). Su baja dispersión a menudo se le atribuye a la dependencia de hábitats húmedos y al alto riesgo de desecación y depredación asociados a la dispersión terrestre y locomoción lenta que presentan (Giordano *et al.*, 2007). Por tanto, se espera que la dispersión de los individuos lejos de sus sitios natales y la expansión del rango de distribución sea limitado. En consecuencia, se espera que sus poblaciones cuenten con estructura genética definida, especialmente cuando se trata de distancias geográficas moderadamente grandes o al encontrarse en paisajes fragmentados.

4.9. Filogeografía

La filogeografía estudia los eventos históricos responsables de la distribución geográfica de una especie tomando en cuenta la filogenética de esta. A su vez, puede inferir eventos pasados como expansiones de las poblaciones, cuellos de botella poblacionales, vicarianza y migración (Avice, 2000). La filogeografía es importante de estudiar debido a que permite priorizar áreas de alto valor para la conservación. A su vez, han desempeñado un papel importante en la definición de unidades evolutivas significativas, ESU (Domínguez-Domínguez & Vázquez-Domínguez, 2009).

En la actualidad, se han incorporado herramientas filogeográficas para el análisis de los efectos de las características de paisaje en la distribución de las especies a diversas escalas espaciales. Estas herramientas brindan una visión sobre los patrones espaciales de la diversidad genética (Manel *et al.*, 2003). Múltiples análisis filogeográficos basados en ADN mitocondrial han establecido diferencias significativas entre poblaciones de anfibios y de la mano del ADN nuclear se ha determinado la estructura genética de las poblaciones estudiadas (Vences & Wake, 2007).

En un estudio por Funk *et al.* (2005) realizado para la rana moteada colombiana (*Rana luteiventris*) establecieron el impacto de las crestas de las montañas en la estructura de las poblaciones de esta especie, encontrando flujo genético significativamente reducido en las poblaciones situadas en ambos lados de las cordilleras y entre poblaciones de baja y alta elevación a pesar de su estrecha proximidad geográfica. Asimismo, establecieron que existe poca diversidad genética dentro de las poblaciones de altitudes mayores. Esto sugiere que la variación en los regímenes de selección y límites físicos de especies contribuye a la diferenciación observada y por tanto la diferenciación genética entre poblaciones de anfibios parece ser relativamente alta para poblaciones separadas por montañas y cordilleras.

En especies como *Bolitoglossa helmrichi* con una distribución geográfica amplia dentro de Guatemala y que cuenta con variabilidad morfológica, es indispensable comprender su historia evolutiva, patrones de aislamiento y barreras geográficas mediante la identificación de patrones filogeográficos. Por ello, es importante establecer y generar información sobre el estado poblacional, establecer su historia evolutiva y eventos de especialización dentro de esta especie (Bickford *et al.*, 2007). Los factores históricos son importantes de comprender para áreas que presentan alta diversidad de especies como lo es el bosque nuboso y regiones tropicales húmedas debido a que eventos de aislamiento y flujo genético restringido pueden resultar en historias demográficas complejas y en la divergencia de las poblaciones de un taxón (Rovito *et al.*, 2012; Stevens, 2006).

4.10. Marcadores moleculares y ADN mitocondrial

Existen diversos métodos para la generación de información genética, desde regiones que se encuentran altamente conservadas en múltiples taxones hasta regiones específicas para cada especie. Estos son conocidos como marcadores moleculares, los cuales permiten obtener la información básica para su uso en análisis filogenéticos. Los marcadores de ADN mitocondrial (ADNmt) son bastante utilizados para estudios de filogenia ya que generalmente son regiones altamente heredadas matrilinealmente y presentan una alta tasa de mutación por ausencia de recombinación genética. Esto permite realizar una rápida detección y diferenciación entre taxones a nivel de especie.

4.10.1. 16S ARN ribosomal (16S)

Es un componente de la subunidad menor 30S de los ribosomas procariotas que se unen a la secuencias de Shine-Dalgarno. Estos se utilizan para la reconstrucción de filogenias debido a que cuentan con bajas tasas de mutación y están altamente conservadas en distintas especies (Weisburg *et al.*, 1991). Esto permite determinar fácilmente entre taxones diferentes, así como la relación que existe entre ellos. Este marcador molecular fue diseñado para la diferenciación entre bacterias, sin embargo, se ha demostrado que puede utilizarse en una amplia variedad de animales tanto vertebrados como invertebrados (Woese *et al.*, 1990; Woese & Fox, 1977) y para la identificación de nuevas especies e incluso géneros (Weisburg *et al.*, 1991).

4.10.2. Citocromo B (CytB)

Es la subunidad principal de los complejos transmembrana b6f y bc1 que forman parte de la cadena respiratoria de los eucariotas y procariotas aerobios. Es utilizada para el estudio de relaciones filogenéticas en vertebrados, ya que es un gen que presenta una gran cantidad de información útil para identificar diversas especies. A su vez, la variabilidad de la secuencia permite comparar fácilmente entre especies de un mismo género, y contiene una alta proporción de sustitución de nucleótidos causada por la evolución lo que permite diferenciar entre taxones de vertebrados estrechamente relacionados (Castresana, 2001).

4.11. Biogeografía y patrones de distribución

La biogeografía es el estudio de los patrones de distribución geográfica de los seres vivos y los factores que determinan esos patrones (Groves, 2017). Estos estudios no

permiten dividir las regiones del planeta por medio de la composición de flora y fauna. Se cree que los patrones de distribución actuales de las plantas y animales, tal y como son reflejadas en las regiones biogeográficas, son el resultado de muchas causas históricas y actuales (Muller-Hohenstein, 2001). Estas causas incluyen condiciones climáticas y geográficas actuales, la tasa de dispersión, la adaptabilidad a condiciones ambientales prevalecientes y edad de los taxones estudiados (Carta *et al.*, 2022).

Cada especie cuenta con una distribución geográfica única, y muchas veces muestran rangos geográficos similares con otras especies. Los rangos compartidos entre dos (o más) especies pueden deberse a una historia evolutiva común, barreras físicas a la dispersión o requisitos ecológicos que limitan la supervivencia (Lomolino *et al.*, 2004; Posadas *et al.*, 2006). En muchos casos, esto se traduce en especies estrechamente relacionadas que se distribuyen dentro de las mismas regiones con más frecuencia de lo esperado, lo que a su vez da linajes distintos que tienen rangos de distribución lo aleatorio y agrupados espacialmente (Lomolino *et al.*, 2004). Como resultado, el factor histórico actúa como un importante impulsor de los patrones de distribución actuales, de modo que diferentes regiones del mundo albergan diferentes conjuntos de organismos vivos. Estos patrones geográficos son la razón por la cual la Tierra está dividida en distintas unidades biogeográficas (Carta *et al.*, 2022).

4.11.1. Geografía de Guatemala

Centroamérica comprende una amplia diversidad de paisajes y diversos procesos de la superficie de la tierra, es una región con alta diversidad geomorfológica ya que los dominios tectónicos, litológicos y climáticos son altamente variables. Sus relieves permiten conservar una historia única de evolución de paisajes (Marshall, 2007). La geología de esta región se debe a la subducción Cenozoica de la placa oceánica de Cocos y la placa Farallón el cual sucedió debajo del margen occidental de la placa del Caribe. A su vez, el frente volcánico se desarrolló al norte en el Paleozoico con los bloques Maya y Chortí, y el bloque volcánico sur se formó en el fondo oceánico con la placa caribeña conformando los bloques Chorotega y Chocó (Mann *et al.*, 2015).

Durante el Cenozoico se formaron variaciones en el suelo del fondo oceánico, dando origen diversas formaciones rocosas. Estas se generaron debido a la configuración tectónica, incluyendo cordilleras volcánicas, cuencas, zanjas, llanuras, deltas, valles y mesetas (Marshall, 2007). Los anfibios aparecieron alrededor de 358 millones de años en esta región dando lugar a la especiación por alopatría. Es probable que la alta diversidad de salamandras este dada por la edad geológica de las tierras altas y la complejidad topográfica de esta región.

La diversidad en Guatemala está dada por estar tanto por estar situada en Mesoamérica como por ser geológicamente compleja ya que se encuentra en la intersección de las placas de América del Norte y el Caribe. Esto crea una conexión entre el istmo de Tehuantepec y la depresión de Nicaragua (Schuchert, 1935) los cuales se dividen en dos grandes bloques geológicos: el bloque Maya y el bloque Chortí (Marshall, 2007). Estos dos bloques se encuentran a lo largo de la falla de Motagua-Polochic creando una zona elevada que se extiende de este a oeste a través del centro de Guatemala. Sierra de las Minas, alcanza

altitudes mayores a 3,000 m y la Sierra de Chuacú se encuentra entre las fallas de Motagua y Polochic, y los valles a lo largo de cualquier zona que separan a Sierra de las Minas de otras tierras altas al norte y sur. El valle de Motagua es una zona con baja elevación con vegetación semiárida, siendo una barrera importante para múltiples taxones y divide zonas forestales de mayor elevación en ambos lados (Castoe *et al.*, 2009; Daza *et al.*, 2010). Debido a estas barreras geográficas, se ha determinado alto endemismo en la Sierra de las Minas y Sierra de Chuacús, en anfibios y especialmente en salamandras (Campbell *et al.*, 2010; Rovito *et al.*, 2010).

4.11.2. Modelos de Nicho Ecológico

Los modelos de nicho ecológicos (ENM) son métodos que utilizan datos de ocurrencia junto con datos ambientales para hacer modelos correlativos de las condiciones ambientales que cumplen con los requisitos ecológicos de una especie y predicen la idoneidad relativa del hábitat (Warren & Seifert, 2011). Los ENMs utilizan algoritmos informáticos para predecir la distribución de una especie en el espacio geográfico y el tiempo por medio de datos ambientales. Los datos ambientales pueden ser datos climáticos (por ejemplo, temperatura y precipitación) y otras variables como tipo de suelo, cobertura del suelo, profundidad de agua, entre otros (Escobar, 2020). Estos modelos generalmente son utilizados para estimar la idoneidad relativa del hábitat que se sabe que ocupa la especie, estimar el hábitat en áreas geográficas que no se sabe que está ocupada por la especie y estimar el hábitat de una especie a lo largo del tiempo dado un escenario específico de cambio ambiental (Warren & Seifert, 2011).

5. METODOLOGÍA

5.1. Sitios de estudio

El muestreo de individuos de *B. helmrichi* se realizó mediante la colecta de individuos presentes en campo en dos localidades dentro de su rango de distribución durante la época lluviosa que comprendió de julio a septiembre del 2021 bajo los permisos de colecta 010127 del Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP). La presente investigación se realizó bajo la supervisión del Comité de Ética para el Uso y Cuidado Animal de la Universidad del Valle de Guatemala (CEUCA-UVG) con el número de propuesta I-20201(2).

5.1.1. Reserva Natural Pamac II

La Reserva Natural Pamac II se encuentra localizada en el municipio de San Cristóbal Verapaz, en el departamento de Alta Verapaz (Figura 7A). La reserva cuenta con una extensión total de 670 hectáreas, presenta clima frío con temperaturas promedio de 16 a 23°C y va desde los 1,500 hasta los 2,100 msnm. La precipitación promedio anual es de 3,250 mm y cuenta con lluvia horizontal permanente en el área lo cual mantiene la humedad la mayor parte del tiempo. Esta reserva pertenece a la región del Boque Pluvial Montano Bajo Subtropical compuesto principalmente por bosque latifoliado, musgos y helechos (Ramírez, 1998).

5.1.2. Reserva Natural Ranchitos del Quetzal

La Reserva Natural Ranchitos del Quetzal se encuentra localizada en el municipio de Purulhá, Baja Verapaz (Figura 7B). Pertenece al Corredor Biológico del Bosque Nuboso en el cual predominan especies de epifitas como orquídeas, bromelias y musgos. Esta es una reserva de Bosque Subtropical Húmedo, con elevaciones que van desde 1,500 hasta los 1,800 msnm. Cuenta con alrededor de 50 especies de árboles diferentes, entre ellas pinos, cipreses, encinos, y otros. El bosque presente en el área por lo general se encuentra cubierto por nubes, producto de la humedad proveniente del Caribe con temperaturas promedio de 18°C, humedad relativa 93.9% y precipitación anual promedio de 2,092 mm (Centro de Estudios Conservacionistas, 1999).

5.2. Diseño de muestreos y toma de muestras en campo

Los muestreos en campo se realizaron mediante caminatas dentro de senderos y brechas en las reservas durante la noche para la colecta de individuos mediante el método de Relevamiento por Encuentros Visuales (REV) con captura manual. Este método consistió en la observación y captura de individuos ubicados desde el nivel del suelo hasta los dos metros de altura en la vegetación. Los individuos observados se colocaron en bolsas plásticas de colecta a las cuales se les agregó sustrato húmedo del suelo o del área de donde fueron colectadas con suficiente aire para permitirles la respiración. Cada bolsa fue rotulada individualmente con el número de colecta, nombre de colector, fecha y punto de muestreo.

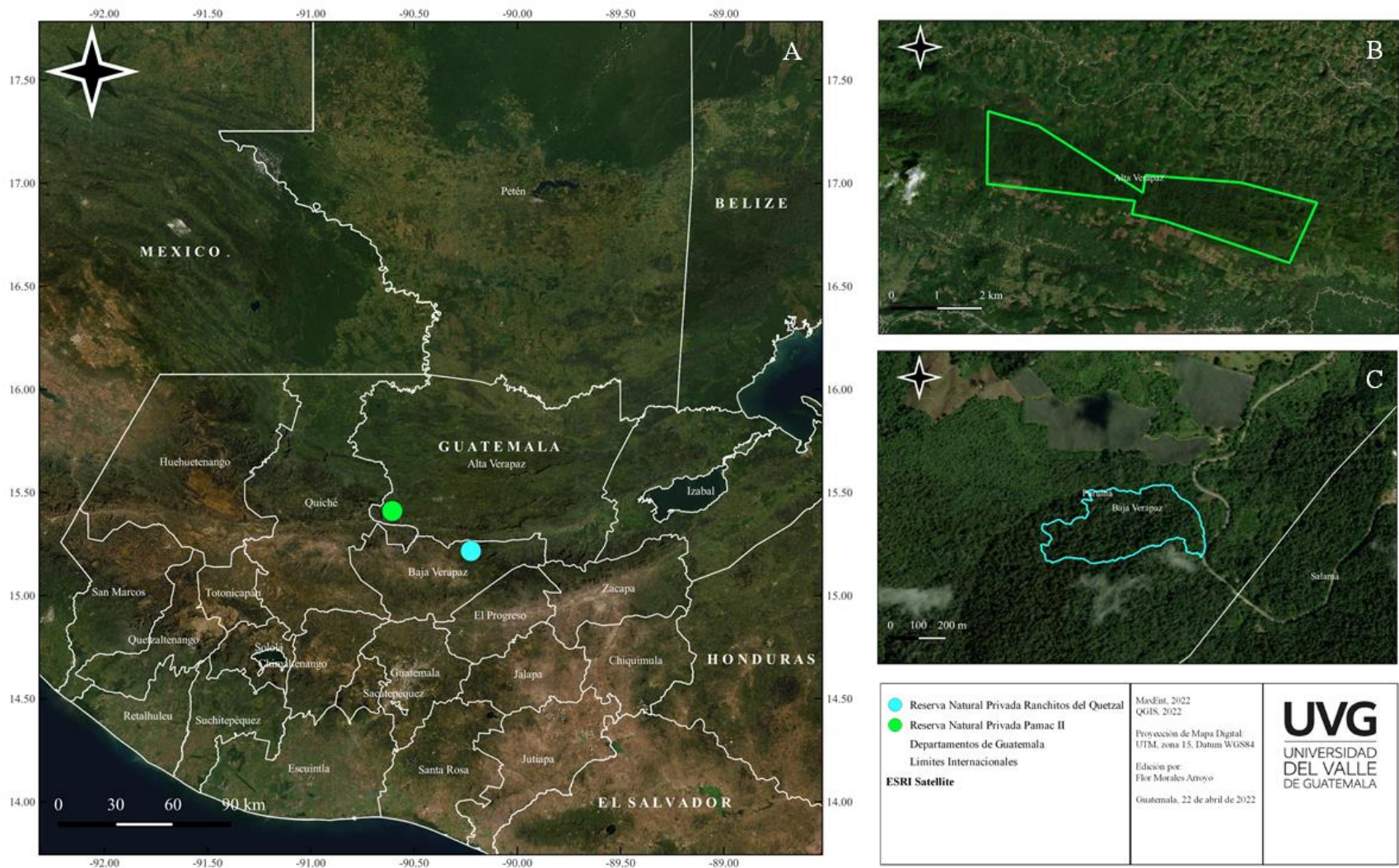


Figura 7. Mapa de colectas de poblaciones de *Bolitoglossa helmrichi*. A) Departamentos de Guatemala y sitios de colecta. B) Perímetro de la Reserva Natural Privada Pamac II, San Cristóbal Verapaz, Alta Verapaz. C) Perímetro de la Reserva Natural Privada Ranchitos del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz.

Los ejemplares muestreados fueron anestesiados por inmersión durante 5 minutos en lidocaína al 1% para evitar que el procedimiento induzca a los individuos en estado de estrés. Se realizó la ectomización de la cola de los ejemplares tomando de 2 – 5 mm con tijeras quirúrgicas previamente esterilizadas con etanol al 70%. El tejido fue almacenado en tubos Eppendorf con etanol al 95% y se preservaron en refrigeración a -20°C hasta ser procesadas. Esta metodología ha demostrado ser de bajo impacto debido a que no afecta la supervivencia, el comportamiento y el crecimiento de las salamandras (Leyse *et al.*, 2003; Segev *et al.*, 2015). Los individuos colectados estuvieron bajo observación para evaluar su respuesta al procedimiento, y posteriormente fueron liberados en los sitios donde fueron muestreados.

Se seleccionaron un total de 11 ejemplares adultos de distintos puntos de muestreo los cuales fueron sacrificados mediante la inmersión en lidocaína al 2% hasta observar la inmovilización completa. Este es un método aceptado para realizar eutanasia en situaciones donde otros métodos no se encuentran disponibles o tienen un costo prohibitivo. Este método actúa sobre los canales iónicos de los nervios y bloquean el movimiento del sodio hacia la célula provocando una falla en la conducción nerviosa debido a la incapacidad de generar potenciales de acción en los animales permitiéndoles que sean sacrificados rápidamente y provocando el mínimo estrés (Leary & American Veterinary Medical Association, 2020).

Posteriormente, se colectaron los hígados de los individuos sacrificados mediante un corte del lateral derecho del animal para acceder directamente al órgano. Las muestras fueron almacenadas en etanol al 95% en tubos Eppendorf y se preservaron en refrigeración a -20°C hasta ser procesadas. Los individuos fueron posicionados y fijados con formol al 10% durante dos días, se rehidrataron con agua desmineralizadas durante un día y finalmente fueron preservados en etanol al 70% en frascos de vidrio para ser ingresados a las Colecciones Biológicas de la Universidad del Valle de Guatemala.

5.3. Procesamiento de muestras

5.3.1. Extracción de ADN (Peñafiel et al., 2019)

Los tejidos colectados se colocaron en tubos Eppendorf con 300 µL de Buffer de Lisis (100mM Tris-HCl pH 8.0, 25mM EDTA pH 8.0, 1M NaCl, 0.5% SDS) y 3 µL Proteinasa K (20 mg/mL). Las muestras maceraron dentro del tubo con un pequeño pistilo. Las muestras se llevaron a incubación a 55°C en un Thermo Shaker a 900 rpm durante tres y con agitación en Vortex cada 30 min hasta observar desintegración total del tejido. Posterior a la incubación, las muestras se calentaron a 95°C durante diez minutos para desactivar cualquier residuo de Proteinasa K y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Se agregaron 100 µL de la Solución Precipitadora de Proteínas (4M de isotiocianato de guanidina y Tris 0.1M pH 7.5). Se centrifugaron los tubos durante 10 minutos a 16,000 g. El sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf sin tocar el pellet residual y se agregaron 300 µL de etanol absoluto frío mezclando los tubos múltiples veces hace observar nuevamente un pellet. Se centrifugaron nuevamente durante 10 minutos a 16,000 g. El sobrenadante se descartó y se agregaron 300 µL de etanol al 70% para lavar el pellet

de ADN mezclando los tubos de 5 a 10 veces. Se centrifugó durante 5 minutos a 16,000 g y se retiró el sobrenadante con micropipeta y dejando secar el pellet en una incubadora a 35°C. Cuando el pellet se secó completamente, el ADN fue resuspendido con 100 µL de Buffer TE 0.1X pH 8.0, se incubaron a 65°C durante una hora y se almacenaron a 4°C durante toda la noche para completar la resuspensión.

5.3.2. Cuantificación, pureza e integridad de ADN

La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro NanoDrop utilizando 1 µL de la muestra de ADN aislada. Se registraron los datos de concentración de ADN (ng/µL) y parámetros de integridad según las absorbancias A260/280 y A260/230. Se realizó un gel de electroforesis con Buffer TBE 1X y agarosa al 0.8% teñido con 1µL de Gel Red para establecer la integridad del ADN extraído. Se cargaron 8µL de ADN con 2µL de Loading Dye y se corrió durante 45 minutos a 90 voltios.

5.3.3. Amplificación de genes 16S y Cytb

Para ambos marcadores se elaboró un máster mix utilizando: 10.0 µL agua ultrapura, 25.0 µL de PCR máster mix de Promega (50U/mL Taq Polimerasa en Buffer de reacción con pH 8.5, 3mM de MgCl₂, 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dTTP, y 400µM dCTP), 5.0 µL cebador directo, 5.0 µL cebador reverso para cada muestra y 5 µL de ADN para cada muestra para un total de volumen de reacción de 50 µL. Los cebadores utilizados para cada gen se encuentran en Cuadro 1.

Cuadro 1. Secuencias de los marcadores moleculares utilizados para la amplificación de los genes 16S y Cytb.

Gen	Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	Referencia
Cytb	MVZ16	AAAGCACAGCACTGAAGATGC	800	Mortiz <i>et al.</i> (1992)
	MVZ15	GCTCAAAATGGTCAGGGTTAGCTG		
16S	16Sar	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	500	Palumbi <i>et al.</i> (1996)
	16Sbr	CCGGTYTGA ACTCAGATCAYGT		

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) para ambos genes se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf. El programa para el gen 16S ARNr consistió en una fase de iniciación a 95°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 s, anillamiento a 52°C durante 30 s y extensión a 72°C durante 30 s; y un periodo de síntesis a 72°C durante 5 min. La amplificación para el gen Cytb consistió en una fase de iniciación a 93°C durante 5 min, seguido de 38 ciclos de desnaturalización a 93°C durante 1 min, anillamiento a 48°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min; y un periodo de síntesis a 72°C durante 10 min.

Luego de la amplificación se elaboró un gel de agarosa con Buffer TBE 1X al 1.2% teñido con 1 µL de Gel Red y se cargarán 4 µL de cada muestra y 1 µL de Loading

Dye. Se utilizó una escalera de 100 pb para observar el tamaño de las bandas amplificadas y se corrió durante 45 min a 90 voltios.

5.3.4. Purificación y secuenciación de ADN

Las muestras amplificadas se limpiaron utilizando el kit de limpieza Promega Wizard Genomic Kit. Se colocaron 45 μL del producto de PCR en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se agregaron 45 μL de la “Membrane Binding Solution”. Se mezclaron en vortex y se agregaron al filtro de una columna con tubo recolector. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 s y se descartó el sobrenadante. Se lavó la columna con 300 μL de Buffer B (BWB) y se centrifugó durante 15 s a 14,000 rpm. Se repitió el procedimiento con 300 μL de BWB. Se descartó el sobrenadante y se centrifugó el tubo durante 1 min. Se transfirió la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se agregaron 15 μL de agua ultrapura (H2Oup) en el centro de la columna, se reposo durante 5 min y se centrifugó durante 30 s a 14,000 rpm. Se repitió el procedimiento con otros 15 μL de H2Oup. Al finalizar se descartó la columna y se almacenó a -20°C .

Se realizó la cuantificación con espectrofotómetro NanoDrop utilizando 1 μL de la muestra de ADN aislada y se registraron la concentración de ADN (ng/ μL) y parámetros de integridad según las absorbancias A260/A280 y A260/A230. Las muestras purificadas fueron colocadas en placas estériles para secuenciación con 96 pozos y se agregaron 10 μL de cada muestra. Esta se selló con un film plástico estéril y se aseguró con Parafilm para evitar que se abriera durante el envío. Dichas muestras fueron enviadas a MacroGen Inc, Corea del Sur para realizar la secuenciación bidireccional con tecnologías de Sanger.

5.4. Análisis de secuencias

5.4.1. Limpieza y alineamiento de secuencias

Los resultados de la secuenciación fueron procesados en el software Geneious Prime 2022.1 en donde se eliminaron los picos atípicos para las secuencias obtenidas. Se obtuvo la secuencia consenso a partir de las secuencias directas y reversas para cada muestra. Posteriormente se subieron las secuencias de estudios previos para *B. helmrichi* y los subgénero *Magnadigita* y *Bolitoglossa* encontradas en NCBI. Se realizó un alineamiento múltiple con el algoritmo de MUSCLE y se exportó para los análisis posteriores.

5.4.2. Análisis de diferenciación genética

Los análisis de diferenciación genética se realizaron en DNAsp versión 6.12.03 (Rozas, y otros, 2019) en donde se obtuvieron índices que permitieron obtener la diferenciación entre las poblaciones muestreadas en este estudio. Se obtuvo el índice de fijación (Φ_{ST}) comparando cada una de las poblaciones muestreadas en el presente estudio. A su vez, para cada población se obtendrá el número de sitios segregados (S), el número de haplotipos (h), diversidad de haplotipos (Hd), número promedio de diferencias de nucleótidos (K) y diversidad de nucleótidos (Π). Así mismo, se corrió un análisis de *D de Tajima* para todos el conjunto de datos y por población.

5.4.3. Redes de haplotipos

Se generó una red de haplotipos en RStudio utilizando los paquetes: ape (Paradis *et al.*, 2004), ggplot2 (Wickham, 2016), y pegas (Paradis, 2010); y se estimó el índice de diversidad genética. El script de R Studio se encuentra en anexo en el Apéndice 10.

5.4.4. Análisis filogenético

Se determinó el mejor modelo evolutivo con las secuencias alineadas en jModelTest (Darriba *et al.*, 2012) y fue seleccionado según el Criterio de Información de Akaike (AIC). Este paso se realizó para ambos marcadores moleculares. La reconstrucción filogenética se realizó con los métodos de Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana con los marcadores individuales. Posteriormente, se compararon las topologías de los árboles 16S y Cytb. Las secuencias fueron concatenadas de Geneious Prime y se volverá a realizar un análisis para la construcción de árboles filogenéticos. Los árboles ML se realizaron en RaxML versión 8.0 (Stamatakis, 2014) utilizando 1,000 repeticiones de *Bootstrap* y utilizando el modelo de sustitución seleccionado previamente.

El árbol con inferencias bayesianas se realizó en MrBayes versión 3.2.7a (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Los datos del alineamiento fueron modificados a formato NEXUS en Mesquite versión 3.61 (Maddison & Maddison, 2011) en donde se establecieron las instrucciones para MrBayes ajustando el modelo de sustitución, tasa de cambio y 100,000,000 de repeticiones. Se generaron cuadros con el resumen de los datos de corrida y se observó el factor de reducción de escala potencial (PSRF+) el cual obtuvo un valor de 1.0 para todos los parámetros. A su vez, se observó el valor tamaño de muestra estimado (ESSs) el cual obtuvo valores por arriba de 200 para todos los parámetros, estableciendo que la muestra es suficiente y que no se requieren más corridas. Ambas medidas de convergencia establecieron que el tamaño de la muestra es suficiente y por tanto no se requiere de más corridas para los datos obtenidos. Los árboles generados fueron visualizados y editados en FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2010).

5.4.5. Análisis biogeográfico y modelación de nicho ecológico

Se realizó la modelación de nicho ecológico en Maxent versión 3.4.4 (Phillips *et al.*, 2022) basado en variables climáticas históricas para el conocimiento de la distribución potencial de *B. helmrichi*. Se utilizó un total de 19 variables climáticas descargadas a partir de la base de datos de WorldClim versión 2.1 (Fick & Hijmans, 2017) con una resolución espacial de 2.5 minutos. Esto se realizó tanto para las coordenadas de los individuos colectados en este estudio como para los datos de ocurrencia reportados en la base de datos GBIF (Global Biodiversity Information Facility; GBIF.org, 2022). Los resultados fueron representados en mapas elaborados en QGIS versión 3.24.1 (QGIS.org, 2022).

6. RESULTADOS

Se colectaron un total de 40 individuos en campo (Figura 9). Se realizó la ectomización de colas a 28 y se sacrificaron 11 individuos para la extracción de hígado que posteriormente fueron preservados e ingresados dentro de las Colecciones Biológicas UVG (Cuadro 2). Se colectó un total de 10 individuos en la Reserva Natural Ranchitos del Quetzal y 30 individuos dentro de la Reserva Natural Pamac II. Se colectaron hígados de 6 individuos preservados en las Colecciones Herpetológicas de la Universidad de Texas en Arlington.

Cuadro 2. Información de individuos colectados de *Bolitoglossa helmrichi*.

Código colecta	Nombre en análisis de ADN	Código colecciones biológicas	Localidad de colecta
BOL01			Reserva Natural Pamac II
BOL02	<i>Bolitoglossa</i> sp. 01	UVGA4500	Reserva Natural Pamac II
BOL03	<i>Bolitoglossa</i> sp. 02	UVGA4501	Reserva Natural Pamac II
BOL04			Reserva Natural Pamac II
BOL05	<i>Bolitoglossa</i> sp. 03	UVGA4502	Reserva Natural Pamac II
BOL06	<i>Bolitoglossa</i> sp. 04	UVGA4503	Reserva Natural Pamac II
BOL07	<i>Bolitoglossa</i> sp. 05		Reserva Natural Pamac II
BOL08	<i>Bolitoglossa</i> sp. 06		Reserva Natural Pamac II
BOL09	<i>Bolitoglossa</i> sp. 07		Reserva Ranchitos del Quetzal
BOL10	<i>Bolitoglossa</i> sp. 08		Reserva Ranchitos del Quetzal
BOL11			Reserva Ranchitos del Quetzal
BOL12			Reserva Ranchitos del Quetzal
BOL13	<i>Bolitoglossa</i> sp. 09	UVGA4504	Reserva Ranchitos del Quetzal
BOL14	<i>Bolitoglossa</i> sp. 10	UVGA4505	Reserva Ranchitos del Quetzal
BOL15	<i>Bolitoglossa</i> sp. 11		Reserva Ranchitos del Quetzal
BOL16	<i>Bolitoglossa</i> sp. 12		Reserva Ranchitos del Quetzal
BOL17	<i>Bolitoglossa</i> sp. 13	UVGA4506	Reserva Natural Pamac II
BOL18			Reserva Natural Pamac II
BOL19			Reserva Natural Pamac II
BOL20			Reserva Natural Pamac II
BOL21	<i>Bolitoglossa</i> sp. 14		Reserva Natural Pamac II
BOL23	<i>Bolitoglossa</i> sp. 15		Reserva Natural Pamac II
BOL24			Reserva Natural Pamac II
BOL25			Reserva Natural Pamac II
BOL26			Reserva Natural Pamac II
BOL27			Reserva Natural Pamac II
BOL28	<i>Bolitoglossa</i> sp. 16	UVGA4507	Reserva Natural Pamac II
BOL29			Reserva Natural Pamac II
BOL30			Reserva Natural Pamac II
BOL31	<i>Bolitoglossa</i> sp. 17	UVGA4508	Reserva Natural Pamac II
BOL32	<i>Bolitoglossa</i> sp. 18	UVGA4509	Reserva Natural Pamac II
BOL33			Reserva Natural Pamac II
BOL34	<i>Bolitoglossa</i> sp. 19	UVGA4510	Reserva Natural Pamac II

Código de colecta	Nombre en análisis de ADN	Código colecciones biológicas	Localidad de colecta
BOL35			Reserva Natural Pamac II
BOL36			Reserva Natural Pamac II
BOL37			Reserva Natural Pamac II
BOL38			Reserva Natural Pamac II
BOL40			Reserva Natural Pamac II
BOL41			Reserva Natural Pamac II
BOL42	<i>Bolitoglossa</i> sp. 20		Reserva Natural Pamac II
BOLA6		UTAT-19-A6	Biotopo del Quetzal Mario-Dary Rivera
BOLA8	<i>Bolitoglossa</i> sp. 21	UTAT-34-A8	Fince El Volcán
BOLB1	<i>Bolitoglossa</i> sp. 22	UTAT-19-B1	Chicamán
BOLB5	<i>Bolitoglossa</i> sp. 23	UTAT-19-B5	Chicamán
BOLF4		UTAT-51-F4	Cerro de los Monos
BOLG6	<i>Bolitoglossa</i> sp. 24	UTAT-18-G6	Biotopo del Quetzal Mario-Dary Rivera

Nota: Los espacios en blanco indican que los individuos no fueron secuenciados y sometidos al análisis de ADN; e individuos que no fueron sacrificados para su ingreso en las colecciones biológicas.

Se utilizó un total de 50 secuencias de *B. helmrichi* para llevar a cabo los análisis de diversidad genética y filogenéticos. Se obtuvieron 24 secuencias tanto para el gen 16S y 24 secuencias para el gen Cytb (Cuadro 2). Se descargaron 21 secuencias para ambos genes de diferentes especies pertenecientes al subgénero *Magnadigita* y dos secuencias del subgénero *Bolitoglossa* desde GenBank las cuales fueron utilizadas para la reconstrucción de árboles filogenéticos.

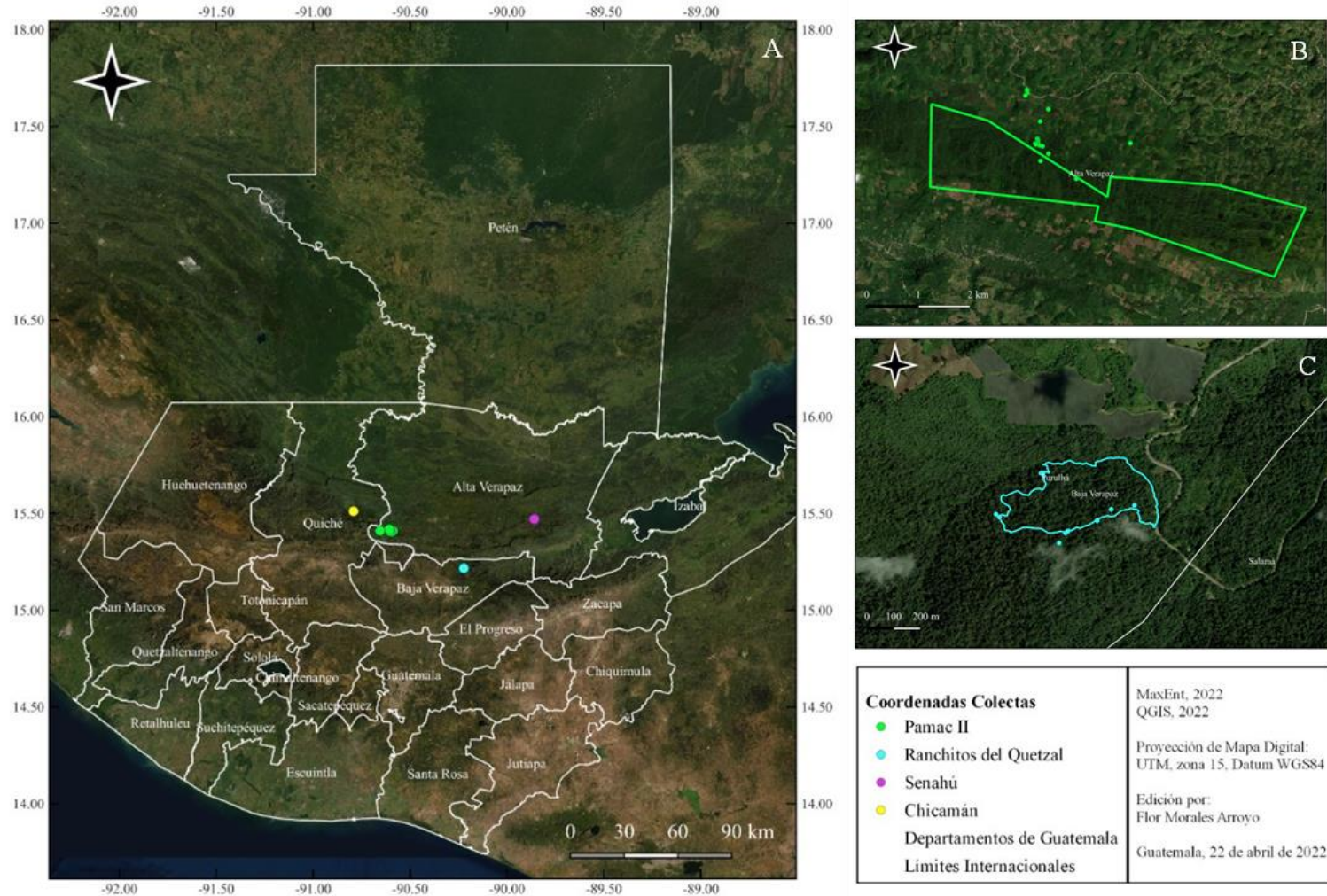


Figura 8. Mapa de puntos de colectados para las poblaciones de *Bolitoglossa helmrichi*. A) Mapa para puntos de colecta en todas las localidades de los departamentos de Alta Verapaz, Baja Verapaz y Quiché. B) Puntos de colecta dentro de la Reserva Pamac II, San Cristóbal Verapaz, Alta Verapaz. C) Puntos de colecta dentro de la Reserva Ranchitos del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz.

6.1. Análisis de diferenciación genética poblacional

Se realizaron los análisis de diversidad genética para establecer el grado de diferenciación de las poblaciones muestreadas. Se dividieron en tres poblaciones generales conformando a los individuos muestreados en Alta Verapaz, Baja Verapaz y Quiché para todos los análisis realizados.

6.1.1. Indicadores de diversidad genética

Los análisis de diversidad genética establecen que la población con mayor diferenciación genética es la de Alta Verapaz ubicada en la Reserva Pamac II. Esta presenta un mayor número de polimorfismos genéticos, mutaciones y diversidad nucleotídica para ambos genes. La diversidad de haplotipos es mayor en esta población para el gen 16S, sin embargo, para el gen Cytb es mayor en la población de Baja Verapaz (Cuadro 3 y 4).

Cuadro 3. Análisis de diversidad genética del gen 16S en poblaciones de *B. helmrichi*. Representando a los sitios polimórficos (S), número de mutaciones (h), número promedio de diferencias nucleotídicas (κ) y la diversidad de nucleótidos presentes en las distintas localidades (π).

Localidad	S	h	κ	π
Alta Verapaz	12	7	1.67692	0.00361
Baja Verapaz	4	3	1.20915	0.00260
Quiché	0	1	0.00000	0.00000
General	15	10	2.87057	0.00617

Cuadro 4. Análisis de diversidad genética del gen Cytb en poblaciones de *B. helmrichi*. Representando a los sitios polimórficos (S), número de mutaciones (h), número promedio de diferencias nucleotídicas (κ) y la diversidad de nucleótidos presentes en las distintas localidades (π).

Localidad	S	h	κ	π
Alta Verapaz	28	12	8.20308	0.01241
Baja Verapaz	14	8	4.60131	0.00969
Quiché	1	2	0.66667	0.00101
General	39	18	12.3750	0.01872

6.1.2. Estructura genética poblacional

Se determinó el índice de fijación (Φ_{ST}) para establecer el grado de diferenciación debido a la estructura genética entre las poblaciones (Cuadro 5 y 6). Los valores van de 0 a 1, en donde un valor de 0 indica que las poblaciones se cruzan libremente y un valor de 1 que toda la variación genética se explica por la estructura de la población y que ambas poblaciones no comparten ninguna diversidad genética. Se observa que las tres poblaciones

se encuentran altamente diferenciadas, en especial las poblaciones de Alta Verapaz y Quiché con la de Baja Verapaz. Para el gen Cytb se observa una alta diferenciación entre las poblaciones de Alta Verapaz y Quiché, sin embargo, para el gen 16S la diferenciación es mucho menor.

Cuadro 5. Índice de diferenciación genética (ϕ_{ST}) del gen 16S en poblaciones de *B. helmrichi*. Los valores de 0 - 0.15 se consideran con diferenciación genética moderada (amarillo), de 0.05 – 0.25 con diferenciación alta y de > 0.25 con diferenciación muy grande (verde).

	Alta Verapaz	Baja Verapaz	Quiché
Alta Verapaz	-		
Baja Verapaz	0.67963	-	
Quiché	0.05217	0.85867	-

Cuadro 6. Índice de diferenciación genética (ϕ_{ST}) del gen Cytb en poblaciones de *B. helmrichi*. Las poblaciones con valores de 0 - 0.15 son consideradas con diferenciación genética moderada, de 0.05 – 0.25 con diferenciación alta y de > 0.25 con diferenciación muy grande (verde).

	Alta Verapaz	Baja Verapaz	Quiché
Alta Verapaz	-		
Baja Verapaz	0.56157	-	
Quiché	0.62349	0.85412	-

6.1.3. Historia demográfica poblacional

Se realizó la prueba de neutralidad con base en el índice de D de Tajima para las mismas poblaciones. Este análisis mide las diferencias entre las secuencias y establece posibles eventos por los que han transcurrido las poblaciones estudiadas (Cuadro 7 y 8). Los resultados obtenidos para este análisis no fueron significativos debido a que todos presentaron un $P > 0.10$. A grandes rasgos se observa que para el gen 16S existe una fijación de alelos en la población de Baja Verapaz y esta se encuentra bajo selección negativa, por aparte, la población de Alta Verapaz se encuentra bajo selección positiva (Cuadro 7).

El análisis para el gen Cytb establece que las tres poblaciones se encuentran bajo selección positiva (Cuadro 8). Esto quiere decir que las poblaciones se encuentran con bajos niveles de polimorfismos de alta y baja frecuencia, indicando una disminución en el tamaño de la población.

Cuadro 7. Test de neutralidad de D de Tajima del gen 16S para las poblaciones de *B. helmrichi*. En donde * indica un $P > 0.10$ indicando que los datos no son significativos para este estudio. Los valores para la población de Quiché no se obtuvieron debido a que no presenta polimorfismos.

Localidad	D de Tajima
Alta Verapaz	-1.57178*
Baja Verapaz	0.11917*
Quiché	-
General	-0.46535*

Cuadro 8. Test de neutralidad de D de Tajima del gen Cytb para las poblaciones de *B. helmrichi*. En donde * indica un $P > 0.10$ indicando que los datos no son significativos para este estudio.

Localidad	D de Tajima
Alta Verapaz	0.43552*
Baja Verapaz	0.43065*
Quiché	1.63299*
General	1.29930*

6.1.4. Análisis de haplotipos

Se realizó el análisis de haplotipos para las secuencias de ambos genes obtenidas en el presente estudio. Se utilizó a las secuencias de *B. helmrichi* y *B. cuchumatana* dentro del análisis para obtener las mutaciones genéticas entre las poblaciones muestreadas y ambas especies descritas. En el Apéndice 13 y 14 se presentan los haplotipos a los que pertenece cada individuo y su localidad respectiva. Se obtuvo un total de 10 haplotipos para la secuencia de datos analizada para el gen 16S con una diversidad de 0.7384615 a nivel intrapoblacional. La Figura 9 establece que el haplotipo II forma parte de los individuos colectados para la Reserva Ranchitos del Quetzal y la secuencia de *B. helmrichi*. El haplotipo III junta a los individuos de la Reserva Pamac II. Ambos haplotipos se encuentran unidos por el haplotipo I del cual forma parte *B. cuchumatana*.

Se observaron un total de 19 haplotipos para la secuencia de datos analizada para el gen Cytb con una diversidad haplotípica de 0.8984615 a nivel intrapoblacional, lo cual indica una diversidad alta para este gen. La Figura 10 establece un mayor número de polimorfismos entre haplotipos tal y como se observó en el análisis de diversidad genética. Se observa un mayor número de haplotipos, en donde los individuos de la Reserva Ranchitos de Quetzal se unen a los individuos de Reserva Pamac II por medio del haplotipo IV el cual pertenece a esta última Reserva. A su vez, se observa que los haplotipos XVII y XVIII pertenecientes a la población de Quiché son más similares a los de Alta Verapaz que a los de Baja Verapaz.

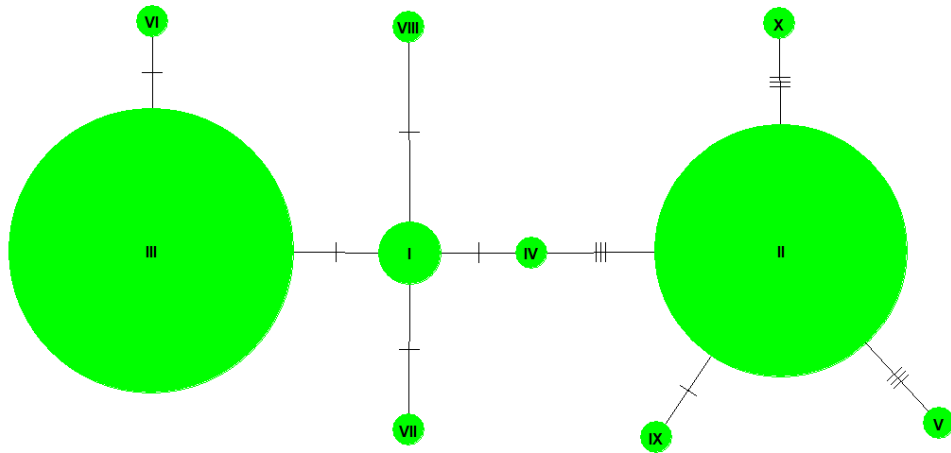


Figura 9. Red de haplotipos para el gen 16S de las poblaciones de *B. helmrichi*. La diversidad de haplotipos es de 0.7384615 y se encuentra representada por círculos en 10 haplotipos. El tamaño de cada círculo es proporcional a la frecuencia de haplotipos. Las mutaciones entre cada haplotipo se presentan con líneas transversales.

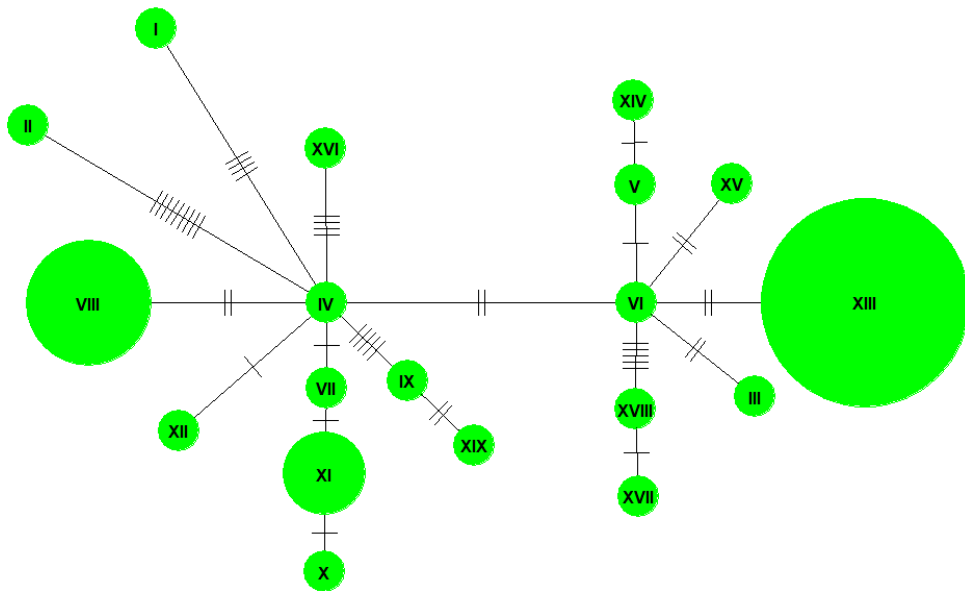


Figura 10. Red de haplotipos para el gen Cytb de las poblaciones de *B. helmrichi*. La diversidad de haplotipos es de 0.8984615 y se encuentra representada por círculos en 19 haplotipos. El tamaño de cada círculo es proporcional a la frecuencia de haplotipos. Las mutaciones entre cada haplotipo se presentan con líneas transversales.

6.2. Análisis filogenético

La historia evolutiva se infirió a partir de las secuencias concatenadas de los genes ARN16S y Citocromo B mediante los métodos de máxima verosimilitud (Figura 11) e inferencia bayesiana (Figura 12) basados en el modelo General Time Reversible (GTR) y el patrón Gamma (G) distribuido con sitios invariantes (I). Se presenta el porcentaje de asociación de taxones junto a las ramas. El análisis incluyó un total de 20 secuencias de individuos colectados y 23 secuencias descargadas de NCBI de especies de los subgéneros *Magnadigita* y *Bolitoglossa*. Se determinó como outgroup a las dos secuencias del subgénero *Bolitoglossa*, incluyendo a *B. mexicana* y *B. odonnelli*. Se observó una agrupación similar en ambos casos en donde los individuos colectados para el presente estudio se unen en un mismo grupo en conjunto con *B. helmrichi* y *B. cuchumatana*. Se observa que los individuos de Alta Verapaz y Quiché se encuentran más relacionadas con *B. cuchumatana* que con *B. helmrichi*. Ambas poblaciones podrían considerarse especies diferentes.

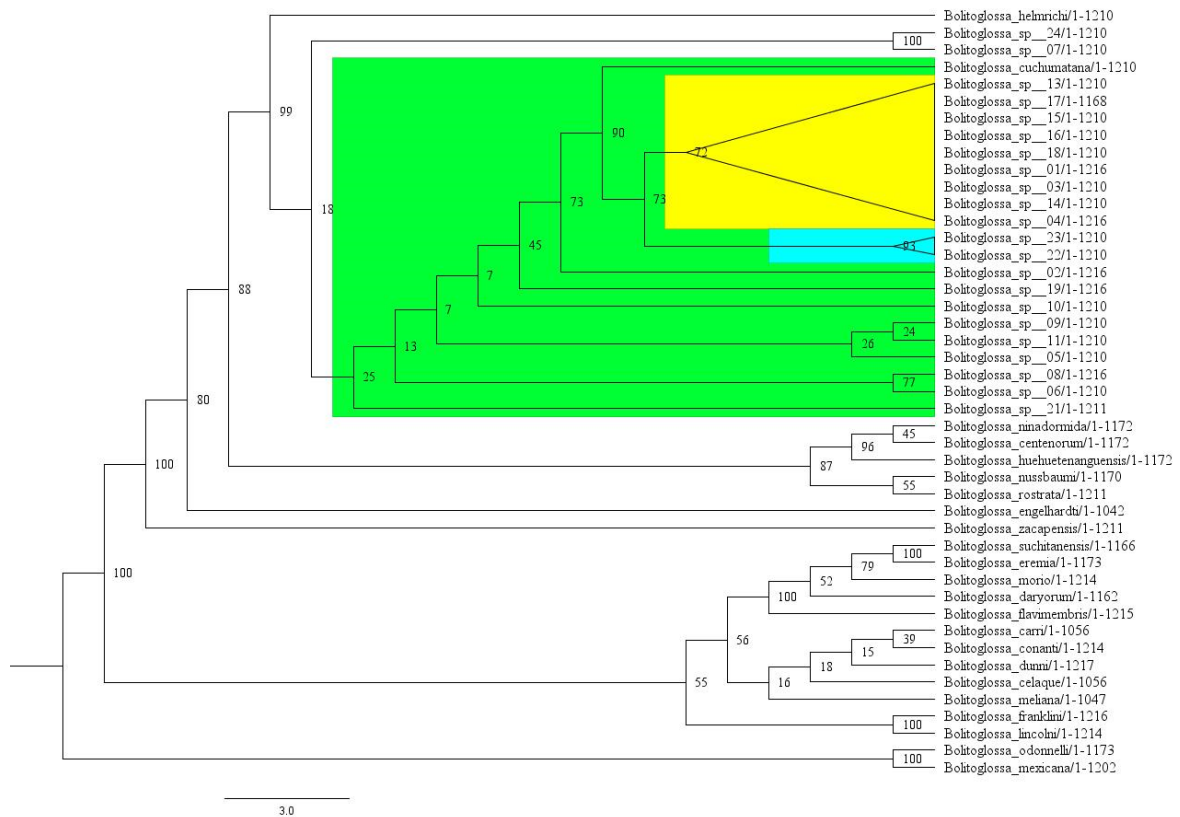


Figura 11. Reconstrucción de relaciones filogenéticas de las poblaciones de *B. helmrichi* entre las poblaciones, de los genes concatenados 16S y Cytb. Construido bajo el método de Máxima Verosimilitud (ML) con 1,000 de iteraciones, el modelo General Time Reversible (GTR) y el patrón Gamma distribuido con sitios invariantes (G+I). Los números entre nodos indican las probabilidades posteriores.

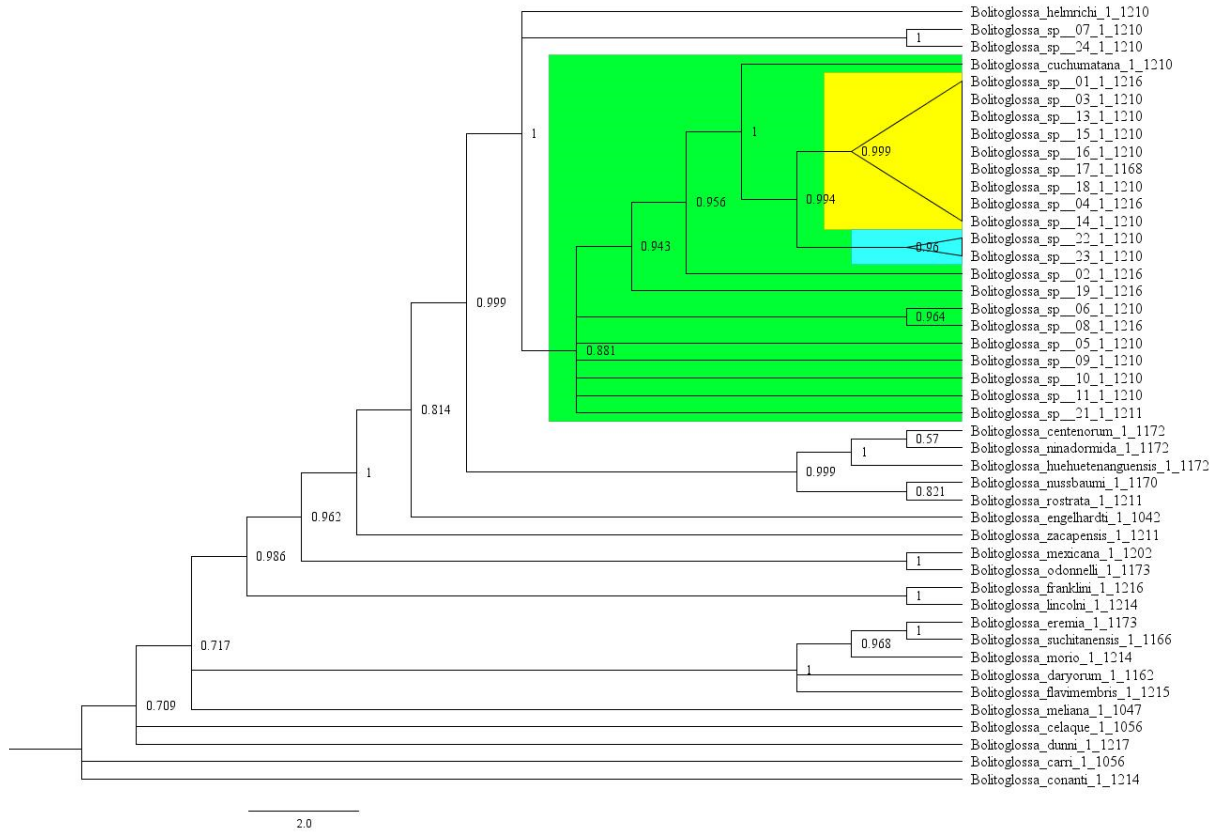


Figura 12. Reconstrucción de relaciones filogenéticas de las poblaciones de *B. helmrichi* entre las poblaciones, utilizando el gen 16S. Construido bajo el método de Inferencia Bayesiana con 100,000,000 de iteraciones, el modelo General Time Reversible (GTR) y el patrón Gamma distribuido con sitios invariantes (G+I). Los números entre nodos indican las probabilidades posteriores.

6.3. Análisis biogeográfico

Se realizó el análisis de modelación de nicho ecológico para los puntos de colecta del presente estudio y a su vez, para los puntos de ocurrencia descargados desde la base de datos de GBIF. El análisis se realizó utilizando 19 variables bioclimáticas (Apéndice 7). El análisis de contribución se presenta en el Cuadro 9 para los puntos de ocurrencia de *B. helmrichi* y en el Cuadro 10 para los puntos de colecta del presente estudio. Se presentan los datos de contribución relativas para cada variable ambiental, en donde el porcentaje de cada variable establece cuanto contribuye al modelo predictivo. A su vez, se observa la importancia de permutación la cual depende estrictamente del modelo MaxENT la cual se calcula omitiendo cada una de las variables para establecer su importancia dentro del modelo.

Los datos de ocurrencia descargados de GBIF para *B. helmrichi* establecen que esta especie se encuentra distribuida a lo largo los departamentos de Alta Verapaz, Baja Verapaz, Quiché y Zacapa. Su distribución se encuentra principalmente dentro de la Sierra de Chamá, Sierra de Chuacús y Sierra de las Minas (Figura 13). En la Figura 14 se observa la

modelación de nicho ecológico para las muestreadas colectadas en donde el patrón de distribución es similar al de ocurrencias, sin embargo, se observa una ampliación en cuanto a los patrones de distribución el cual se ve afectado debido al bajo número de puntos de registro.

Cuadro 9. Análisis de contribución de las variables climáticas para los puntos de ocurrencia de *B. helmrichi* descargados de GBIF.

Variable	Porcentaje de contribución	Importancia de permutación
Temperatura promedio del trimestre más cálido	48.7	0
Precipitación del mes más seco	25.8	0.4
Precipitación estacionaria	13.2	51.4
Temperatura promedio anual	5.4	4.8
Promedio diurno anual	2.4	0
Precipitación del mes más húmedo	2.3	3
Precipitación del trimestre más frío	0.9	2.2
Temperatura estacionaria	0.7	13.8
Temperatura máxima del mes más cálido	0.6	23.6
Precipitación del trimestre más húmedo	0.1	0.8

Cuadro 10. Análisis de contribución de las variables climáticas para los puntos de colecta del presente estudio.

Variable	Porcentaje de contribución	Importancia de permutación
Máxima temperatura del mes más cálido	44.2	40.5
Precipitación estacionaria	31.2	51.2
Precipitación del mes más seco	17.7	1.8
Isotermalidad	6.9	6.2
Temperatura estacionaria	0.1	0.3

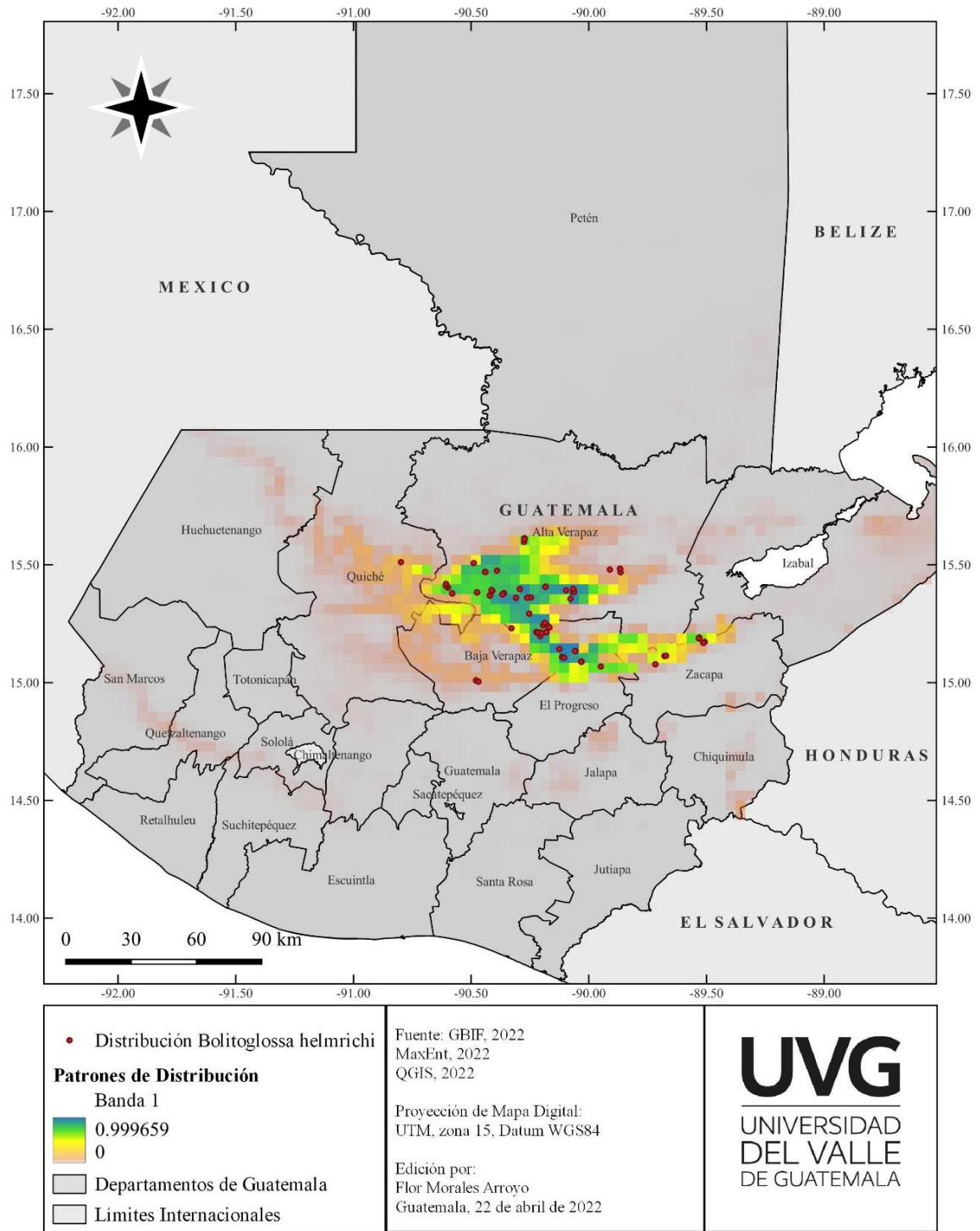


Figura 13. Mapa de patrones de distribución según modelación de nicho ecológico para datos de ocurrencia de *B. helmrichi* descargados de la base de datos GBIF.

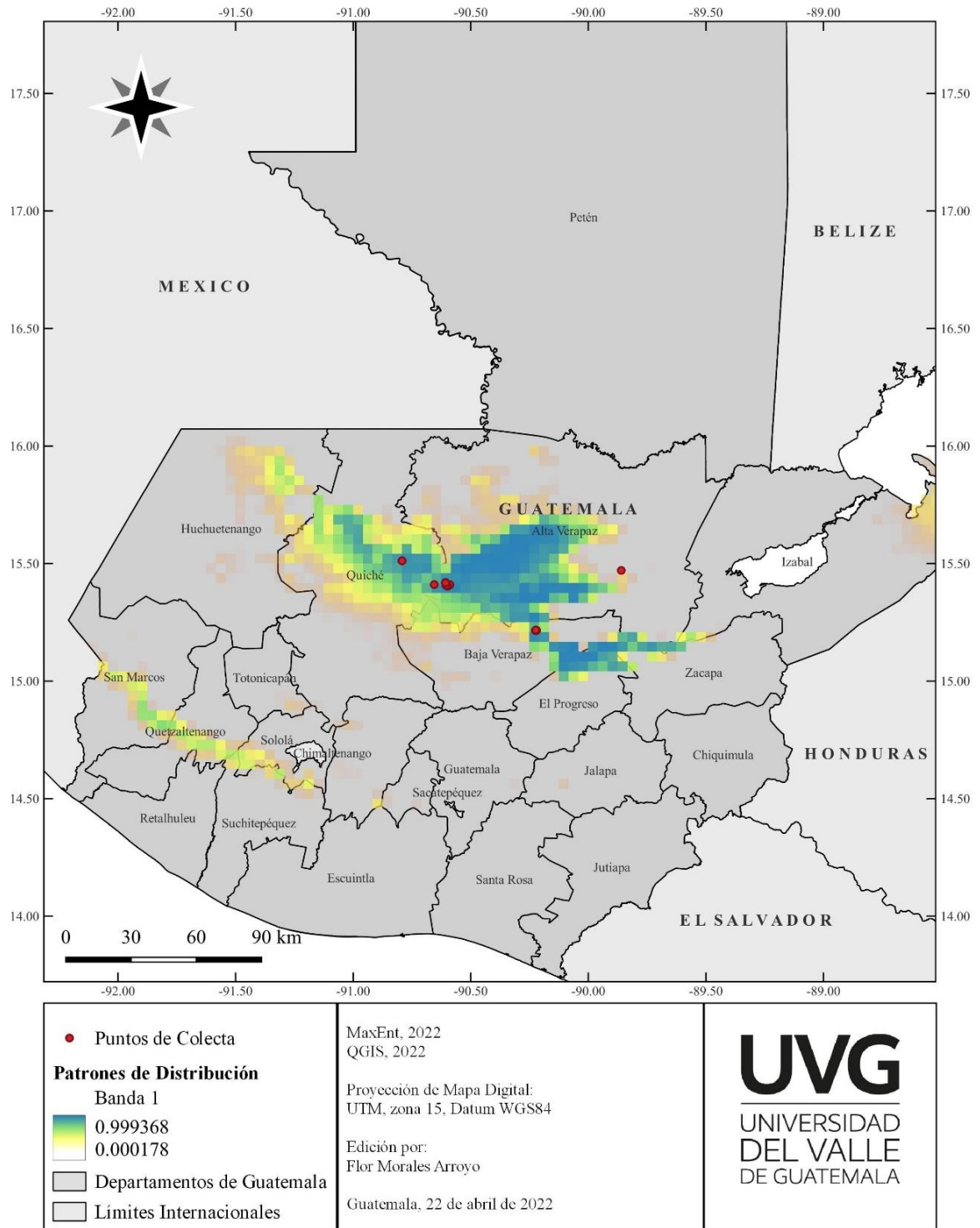


Figura 14. Mapa de patrones de distribución según modelación de nicho ecológico para datos de colecta de *B. helmrichi* del presente estudio.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1. Ectomización de colas en salamandras del género *Bolitoglossa*

El método de ectomización de colas fue exitoso, ya que todas las salamandras anestesiadas respondieron adecuadamente a la lidocaína al 1%. Siendo este estudio la primera vez en la cual se realiza este método para las salamandras del género *Bolitoglossa*. La ectomización de colas es un procedimiento el cual ha demostrado ser de bajo impacto debido a que no afecta la supervivencia y el crecimiento de las salamandras ya que estas son capaces de regenerar la cola y otras partes de su cuerpo, siendo los anfibios que sobresalen por su capacidad regenerativa de tejidos, órganos y partes del cuerpo entero (Arntzen *et al.*, 1999). Durante el procedimiento se observó que los individuos no presentaban señales de estrés ya que hubo ausencia de retracción del individuo a la hora de realizarse la ectomización.

Según la AMVA (2020) establecen que para procedimientos de eutanasia y anestesia en anfibios es recomendado el uso de Metanosulfonato de Tricaína (MS222) por sumersión. No obstante, este compuesto no se encontraba disponible en el departamento de la Universidad del Valle de Guatemala y cuenta con un costo muy elevado. Por lo que se optó por utilizar el compuesto alternativo aceptado por la AMVA y se estableció que la lidocaína al 1% es un excelente sustituto al MS222 permitiendo realizar la ectomización de colas y eutanasiar los individuos colectados siendo un método altamente costeable y practico de utilizar.

La colecta de tejidos animales es de alta importancia en la actualidad para su uso en estudios filogenéticos y para establecer la relación entre especies. Generalmente se requiere de una alta cantidad de individuos para poder hacer estudios comparativos y muchos de estos deben de ser sacrificados para poder obtener el tejido adecuadamente para una correcta extracción de ADN. Sin embargo, en muchas ocasiones esto genera daño en las características morfológicas de los animales y al tratarse de especies en peligro de extinción esto puede causar un impacto negativo en sus poblaciones (Catenazzi *et al.*, 2016). El proceso de ectomización de colas en salamandras ha sido un procedimiento recientemente utilizado para la extracción de tejidos el cual ha demostrado ser de bajo impacto debido a que no afecta la supervivencia, el comportamiento y el crecimiento de las salamandras (Leyese *et al.*, 2003).

7.2. Análisis de diferenciación genética poblacional

7.2.1. Indicadores de diversidad genética

La genética de poblaciones nos permite describir la variación y distribución de las frecuencias alélicas para explicar fenómenos evolutivos. Las variables de cada población nos permiten determinar la diversidad genética de cada especie y el estado poblacional. Los genes 16S y Cytb permiten realizar análisis de este tipo y establecer polimorfismos o mutaciones presentes los cuales evidencian la variabilidad existente entre los individuos de una misma especie (Garnacho-Montero *et al.*, 2005; Singh & Kulathinal, 2013).

Los análisis poblacionales establecieron un total de 15 sitios polimórficos (S) para el gen ARN 16S y 39 para el gen Cytb, el resto de los sitios se consideran regiones

conservadas. En base a estos resultados, el gen *Cytb*, evidencia un mayor número de polimorfismos, el cual es apoyado a la hora de observar el valor promedio de diferencias nucleotídicas (k) y la diversidad nucleotídica (π); siendo estas mayores a los valores generados por el gen 16S. Por tanto, se establece que entre las poblaciones muestreadas existe alta variabilidad genética.

A nivel poblacional se puede observar que la población de Alta Verapaz cuenta con un mayor número de sitios polimórficos, lo cual nos indica que existe mayor diversidad genética dentro de esta población en comparación a las de Baja Verapaz y Quiché. Esto nos indica que las poblaciones de Alta Verapaz son genéticamente más diversas que el resto de las poblaciones y que probablemente esta población comparte un mayor flujo genético con poblaciones aledañas.

Las poblaciones de Baja Verapaz y Quiché cuentan con un menor número de polimorfismos, evidenciando la baja capacidad evolutiva y adaptativa frente a perturbaciones de estas poblaciones. La población de Baja Verapaz se encuentra dentro de la Reserva Natural Ranchitos del Quetzal la cual comparte hábitat con la Reserva Natural del Biotopo del Quetzal Mario Dary Rivera. A pesar de ser sitios que implementan acciones de conservación en sus bosques, esta población puede encontrarse restringida únicamente para esta localidad y no compartir flujo genético con poblaciones de otros sitios. Un factor importante, es la creciente frontera agrícola y la urbanización de los alrededores de ambas reservas.

Cabe destacar que es importante implementar el uso de marcadores de microsatélites y nucleares a estos análisis, debido a que los marcadores mitocondriales únicamente nos permiten visualizar eventos históricos o del pasado lejano. Los marcadores de microsatélites permiten identificar eventos más recientes dentro de las poblaciones, por lo que estos datos podrían variar altamente al considerar las recientes amenazas que se presentan a este grupo de salamandras dentro de sus patrones de distribución.

7.2.2. Estructura genética poblacional

La diferenciación genética nos permite comparar entre poblaciones y determinar el flujo o la conectividad genéticos entre poblaciones (Wright, 1949). El índice de fijación (Φ_{ST}) es una medida de diferenciación de poblaciones que se estima a partir de los polimorfismos genéticos. Este se presenta en cuatro categorías: 0 – 0.05 (muy poca diferenciación), 0.05 – 0.15 (diferenciación moderada), 0.15 – 0.25 (alta diferenciación) y > 0.25 (diferenciación muy grande) (Wright, 1978).

En el análisis para el gen 16S al comparar las tres poblaciones se obtuvo que las poblaciones más distantes fueron la de Baja Verapaz con Alta Verapaz y Quiché, con valores de 0.67963 y 0.85867, respectivamente. Las poblaciones más relacionadas fueron Alta Verapaz y Quiché, con un Φ_{ST} de 0.05217 (Figura 5). Sin embargo, para el gen *Cytb*, los índices de Φ_{ST} indican que existe diferenciación muy grande entre las tres poblaciones (Figura 6).

El aislamiento de la población de Baja Verapaz se puede atribuir a la cuenca del río Polochic lo cual la separa del resto de poblaciones. Las cuencas son barreras geográficas importantes las cuales causan la separación de diversos taxones, especialmente de aquellos con baja movilidad como las salamandras, debido a los cambios abruptos de altitud. A su vez, las poblaciones de Quiché también se encuentran aisladas de las de Alta Verapaz y Baja Verapaz, debido a las cuenca del río Chixoy.

Cabe destacar que las poblaciones pueden estar aisladas por distintos factores como las distancias y barreras biogeográficas presentes, factores ambientales y por la intervención humana. No obstante, el cambio del uso del suelo, la creciente frontera agrícola y las zonas de urbanización son un factor importante para disminución en la conectividad de las poblaciones estudiadas. Estos factores no solo son una amenaza para la biodiversidad, si no también son factores importantes para la separación o división de taxones completos.

Los resultados obtenidos concuerdan con estudios previos y literatura consultada para este estudio, ya que las especies de salamandras pletodóntidos muestran característicamente un grado de fragmentación genética. Larson (1984) estableció que un patrón general de la historia estructural poblacional de los pletodóntidos es que luego de su origen se expanden gradualmente hacia regiones con acceso ecológico y más tarde como resultado del cambio climático sus poblaciones se fragmentan en islas entre las cuales hay poco o ningún cambio genético.

7.2.3. Historia demográfica poblacional

La historia demográfica procura reconstruir la estructura poblacional y explicar los cambios que se producen con el tiempo (Frankham, 2019). La prueba o test de neutralidad (D de Tajima) mide las diferencias entre las secuencias y establece eventos por los que han transcurrido las poblaciones (Tajima, 1989). Los valores de cero indican que se ajustan a un modelo neutral estándar. Los valores positivos se originan del exceso de alelos de frecuencia intermedia (pocos alelos raros) los cuales originan cuellos de botella poblacionales, estructura y selección de equilibrio. Los valores negativos, indican un exceso de alelos de baja frecuencia (muchos alelos raros) generando expansiones poblacionales y selección positiva derivados de cuellos de botella pasados (Biswas & Akey, 2006).

Existe una fijación de alelos en la población de Baja Verapaz según el gen 16S. Esta población ha experimentado un cuello de botella reciente debido al bajo número de sitios polimórficos que presenta. En el caso de la población de Alta Verapaz, la población se encuentra en expansión y bajo selección positiva. Esto se puede observar según el índice Φ_{ST} y ya que presenta muchos sitios polimórficos. La población de Quiché no fue evaluada ya que número de muestra fue muy bajo para someterla a esta prueba.

No obstante, al observar la prueba de neutralidad para el gen Cytb, establece que todas las poblaciones se encuentran bajo selección positiva, es decir que las poblaciones cuentan con bajos niveles de polimorfismos de alta y baja frecuencia causados por recientes contracciones poblacionales. Esto se corrobora al observar el número de sitios polimórficos para este gen, siendo bastante altos principalmente para las poblaciones de Alta Verapaz y Baja Verapaz. Los genes 16S y Cytb a nivel intra e inter poblacional obtuvieron un valor

$P > 0.10$ lo cual establece que los datos para estas poblaciones no son significativos. Por tanto, no se puede establecer con certeza los eventos por los cuales han pasado las poblaciones de *B. helmrichi* muestreadas para este estudio y se requieren de más información para establecer con importancia evolutiva.

Se puede establecer que las poblaciones en general se encuentran en crecimiento y expansión como resultado de cuellos de botella pasados derivados de actividades humanas recientes y posibles eventos naturales e históricos. Cabe destacar que estas poblaciones han sido afectadas por el crecimiento urbano y por la expansión agrícola. Estas actividades han causado fragmentación de hábitat y las poblaciones han quedado aisladas en las localidades muestreadas para este estudio.

7.2.4. Análisis de haplotipos

Las redes de haplotipos permiten analizar datos genéticos de poblaciones para visualizar las relaciones genealógicas a nivel intraespecífico, así como para hacer inferencia sobre la biogeografía y la historia de las poblaciones (Leigh & Bryant, 2015). Por tanto, se realizó la construcción de una red de haplotipos para el gen Cytb de las poblaciones de *B. helmrichi*.

Se observaron un total de 10 haplotipos para la secuencia de datos analizada para el gen 16S con una diversidad haplotípica 0.7384615 a nivel intrapoblacional, estableciendo una alta diversidad para el gen analizado (Figura 10). El número de haplotipos indica baja variación entre las poblaciones estudiadas, sin embargo, el índice de diversidad haplotípica indica variación alta entre las poblaciones. Se observan dos agrupaciones principales en los haplotipos II y III. El haplotipo I pertenece a *B. cuchumatana* la cual se encuentra a solo un polimorfismo de los miembros del haplotipo III, VII y VIII; los cuales pertenecen a todos los individuos colectados en la Reserva Natural Pamac II, San Cristóbal Verapaz, Alta Verapaz y de la población de Chicamán, Quiché. Por otra parte, estos se encuentran separados del haplotipo II el cual pertenece a *B. helmrichi* y a los individuos colectados en Reserva Natural Ranchitos del Quetzal. El haplotipo II se separa por múltiples polimorfismos del haplotipo IX perteneciente de la población de Senahú, Alta Verapaz.

La red de haplotipos con el gen 16S nos permite determinar que el haplotipo I presenta múltiples conexiones y por tanto puede considerarse el haplotipo ancestral. El resto de los haplotipos se derivaron de este haplotipo presentando múltiples mutaciones y separándose en dos haplotipos principales, localizados en Baja Verapaz (haplotipo II) y Alta Verapaz y Quiché (haplotipo III). Esto nos indica que las poblaciones han pasado por un proceso de divergencia, en donde las poblaciones de Alta Verapaz y Baja Verapaz se han derivado del Haplotipo I y actualmente podría tratarse de especies diferentes. Cabe destacar que el gen 16S es altamente conservado y por tanto se observa baja variabilidad entre haplotipos.

Se observaron un total de 19 haplotipos para la secuencia de datos analizada para el gen Cytb con una diversidad de 0.8984615 a nivel intrapoblacional (Figura 11). Tanto el número de haplotipos como el índice de diversidad de haplotipos indica alta variación entre las poblaciones estudiadas. A diferencia de la red de haplotipos realizada para el gen 16S, se observa un alto número de polimorfismos entre cada haplotipo e incluso entre los

mismos individuos dentro de una misma población. A grandes rasgos, se observa la separación por 4 polimorfismos de *B. cuchumatana* (haplotipo I) del haplotipo IV el cual conecta con el resto de los haplotipos. A su vez, se observa una separación del haplotipo IV con *B. helmrichi* por 8 polimorfismos de por medio.

La red de haplotipos del gen *Cytb* establece una alta diversidad entre poblaciones. Los haplotipos XVII y XVIII de igual forma se separa por 5 polimorfismos del haplotipo VI el cual conecta a los haplotipos pertenecientes a las poblaciones de la Reserva Natural Pamac II. Los individuos de la Reserva Natural Ranchitos del Quetzal se encuentran distribuidos en los haplotipos VIII – XII. Al considerar la presencia de haplotipos, se puede establecer que la población de Alta Verapaz es más diversa que la población de Baja Verapaz ya que se encuentra distribuida en 8 haplotipos. Cabe destacar que el gen *Cytb* se caracteriza por obtener alta variabilidad haplotípica ya que se considera altamente polimórfica. No obstante, podemos establecer que las poblaciones muestreadas para el presente estudio cuentan con alta diversidad genética debido a su alta diversidad haplotípica.

7.3. Análisis filogenético

Las análisis filogenéticos fueron realizados por medio de la concatenación de los genes 16S y *Cytb* ya que al realizar las reconstrucciones filogenéticas con los genes separados ambos resultaban en topologías similares, por lo que la concatenación permite realizar análisis más robustos (Gadagkar *et al.*, 2005). Se realizaron dos análisis de reconstrucción filogenética basados en el método de máxima verosimilitud con un total de 1,000 iteraciones y el método de inferencia bayesiana con un total de 100,000,000 iteraciones. Ambos análisis se realizaron bajo el modelo General Time Reversible (GTR) y el patrón Gamma distribuido con sitios invariantes (G+I) debido a que según el criterio AIC este es el modelo que mejor explica el conjunto de datos.

En general observa la agrupación de *B. helmrichi*, *B. cuchumatana* y las salamandras colectadas para el presente estudio en un mismo clado. En la reconstrucción de las relaciones filogenéticas se corrobora la división de las poblaciones de Alta Verapaz y Quiché con las de Baja Verapaz principalmente. En donde las poblaciones de Alta Verapaz y Quiché se encuentran cercanamente relacionadas con *B. cuchumatana* y la población de Baja Verapaz con *B. helmrichi*; sin embargo, en esta última no se resuelve la filogenia de forma clara (Figura 12-13). Esto sugiere que las poblaciones de Alta Verapaz y Quiché deberían de considerarse especies separadas de *B. helmrichi*, sin embargo, es necesario estandarizar el número de muestra para cada población.

Se observó que la población de Baja Verapaz no se separó claramente dentro del análisis filogenético bajo el método de inferencia bayesiana, el cual principalmente se corrió con 1,000,000 iteraciones. Se aumentó este número a 100,000,000 esperando a que se mejorara la división de esta población, sin embargo, no quedo lo suficientemente clara la topología de este. Por lo que es importante aumentar el número de muestra para este grupo y a su vez implementar genes que permitan complementar la información para estas poblaciones. Cabe destacar que los genes mitocondriales generalmente son altamente conservados y son heredados de forma matrilineal el cual nos permite observar eventos históricos pasados, por lo que se recomienda implementar genes nucleares los cuales se

heredan de ambos progenitores y permiten observar eventos históricos más recientes (Luo *et al.*, 2018; Springer *et al.*, 2001).

Un factor importante para considerar es que las salamandras cuentan con caracteres morfológicos muy conservados, y su diversidad genética basada en secuencias de ADN a menudo es más alta que la revelada por morfología (Fu & Zeng, 2008; Martínez-Solano *et al.*, 2007). Anteriormente todas las salamandras distribuidas en localidades cercanas a Alta Verapaz y Baja Verapaz se consideraban como *B. helmrichi*, sin embargo, al realizar estudios filogenéticos se separaron en tres especies principales: *B. helmrichi*, *B. cuchumatana* y *B. engelhardti* (Larson, 1983). Las observaciones de campo establecen que la variación morfológica en estas especies se da principalmente en la morfología de los dedos de los pies. Por lo tanto, algunos autores han propuesto que esta debería de ser considerada un complejo de especies compuesto por poblaciones pequeñas (Rovito *et al.*, 2010). Esto se confirma al observar las reconstrucciones filogenéticas en donde se observan dos subclados para las poblaciones de Alta Verapaz y Quiché, las cuales se encuentran cercanamente emparentadas con *B. cuchumatana* y *B. helmrichi*.

Se sugiere que *Bolitoglossa helmrichi* abarca a un conjunto amplio de especies con pequeñas poblaciones aisladas dentro de su rango de distribución, principalmente para los departamentos de Alta Verapaz, Baja Verapaz y Quiché los cuales fueron evaluados en el presente estudio. Esto indica que la diversidad del grupo rostrata al cual pertenece *B. helmrichi* y *B. cuchumatana* es mucho más amplia de lo esperado. Se establece la presencia de nueva especie dentro de Cerro Guachmalén donde se colectaron los individuos de la Reserva Natural Pamac II, San Cristóbal Verapaz, Alta Verapaz; siendo una especie hermana de *B. cuchumatana* y *B. helmrichi*. A su vez, se sugiere una nueva especie para los especímenes encontrados en el departamento de Quiché. No obstante, es importante aumentar el número de individuos colectados por población y ampliar el número de poblaciones para establecer con mayor certeza la separación de estas y describir el complejo de nuevas especies sugeridas.

A pesar de no haber evaluado directamente las diferencias morfológicas entre las poblaciones estudiadas, en general no se observaron diferencias fenotípicas claras entre estos a pesar de que las reconstrucciones filogenéticas establecen que deben de considerarse especies diferentes. Esto concuerda con estudios previos que evalúan la relación entre las tasas de evolución y cambios morfológicos en plelodóntidos, en donde las tasas de diversificación de especies generalmente no van acompañadas de diversificación fenotípica para este grupo. Por tanto, se ha establecido que la especiación está principalmente dada por el aislamiento reproductivo y factores climáticos y geográficos (Adams *et al.*, 2009). Asimismo, se ha establecido que los patrones de evolución morfológica en salamandras son altamente redundantes y generalmente varían en tamaño corporal y tamaño de los dedos de manos y pies.

7.4. Análisis biogeográfico

Posteriormente a establecer las relaciones filogenéticas y el análisis de las poblaciones de *B. helmrichi* se realizó la modelación de nicho ecológico para las poblaciones muestreadas y para los datos de ocurrencia para dar a conocer los patrones de distribución y

endemismo. En la Figura 14 se observa en la modelación de nicho ecológico para los registros de ocurrencia de *B. helmrichi* se encuentra distribuida a lo largo los departamentos de Alta Verapaz, Baja Verapaz, Quiché y Zacapa. Su distribución se encuentra principalmente dentro de la Sierra de Chamá, Sierra de Chuacús y Sierra de las Minas. En la Figura 15 se observa la modelación de nicho ecológico para las muestras colectadas en donde el patrón de distribución es similar al de ocurrencias, sin embargo, se observa una ampliación en cuanto a los patrones de distribución el cual se ve afectado debido al bajo número de puntos de registro. Por lo tanto, se establece que este análisis es más preciso al haber un mayor número de muestra.

La distribución potencial para los datos de ocurrencia de *B. helmrichi* obtenidos desde GBIF está asociada a 10 de las 19 variables bioclimáticas analizadas. La variable con mayor ganancia cuando se usa aisladamente es la temperatura estacionaria y, por lo tanto, establece que tiene la información más útil por sí misma. La variable que más reduce la ganancia al omitirla es la precipitación estacionaria, siendo esta la variable con mayor cantidad de información y que no se encuentra presente en el resto de las variables. Las variables con mayor porcentaje de contribución son la temperatura promedio del trimestre más cálido, la precipitación promedio del mes más seco y la precipitación estacionaria (Cuadro 9).

La distribución potencial de los datos de ocurrencia de las poblaciones de salamandras muestreadas en el presente estudio está asociada principalmente a 5 de 19 variables bioclimáticas analizadas. La variable con mayor ganancia cuando se usa aisladamente es la precipitación estacional y, por tanto, establece que tiene la información más útil por sí misma. La temperatura máxima del mes más cálido es la variable que más reduce la ganancia cuando se omite y, por lo tanto, tiene la mayor cantidad de información que no se encuentra presente en el resto de las variables. Las variables con mayor porcentaje de contribución a los patrones de distribución son la máxima temperatura del mes más cálido, la precipitación estacionaria y la precipitación del mes más seco (Cuadro 10).

Comparando ambos análisis se pueden observar nuevos sitios de colecta para *B. helmrichi* en distintas zonas de Alta Verapaz, en la región de Sierra de las Minas, y en el departamento de Quiché en donde la información de las poblaciones es escasa y puede ser implementada dentro de futuros análisis filogenéticos y biogeográficos. A su vez, el análisis de MaxEnt para las muestras colectadas es un reflejo de la escasa información actual en las colecciones biológicas en Guatemala, por lo que es importante abastecerlas para poder realizar estudios de esta misma índole.

En general, se establece que tanto las temperaturas más altas y la precipitación estacionaria y del mes más seco son un factor importante para establecer la distribución de *B. helmrichi* y de las poblaciones colectadas. Esto concuerda con datos de estudios previos, en general la distribución de anfibios y en especial para las salamandras, se encuentra estrechamente relacionada con los patrones de precipitación estacionales y las tasas de evapotranspiración, lo cual puede afectar su supervivencia, el reclutamiento y los tamaños poblacionales (Kirk *et al.*, 2019; Winter *et al.*, 2016). A su vez, la temperatura y la precipitación son desencadenantes importantes para la época reproductiva, en donde los cambios en tiempos de reproducción están correlacionados con el calentamiento de las temperaturas (Kirk *et al.*, 2019). Se ha registrado que para las salamandras del género

Bolitoglossa la abundancia de adultos está relacionado significativamente con los niveles de precipitación, en donde existe mayor actividad durante la época lluviosa (Neckel-Oliveira *et al.*, 2011).

Esta información es importante de destacar debido a que, bajo un escenario de cambio climático, en donde las temperaturas aumenten y los patrones de precipitación sean altamente cambiantes, la distribución y la supervivencia de las poblaciones de *B. helmrichi* y las nuevas especies establecidas se verán afectadas llevándolas hasta su extinción. Por lo tanto, se recomienda realizar el análisis de modelación de nicho ecológico para las poblaciones muestreadas por separado para poder establecer con precisión los patrones de distribución de cada una ya que en este estudio no fue posible determinarlos por el bajo número de muestras por localidad. Esto permitirá elaborar estrategias de protección y conservación para las poblaciones de estas especies de salamandras.

7.5. Consideraciones finales

Los eventos de fragmentación y aislamiento en la historia geológica de Guatemala ha sido un promotor importante en la divergencia de especies del bosque nuboso aislados en las cordilleras montañosas de la región de Centroamérica (Castoe *et al.*, 2009). Esto es una causa importante de las distribuciones fragmentadas de distintos grupos de taxones como salamandras *Cryptotriton* y *Bolitoglossa* (Rovito *et al.*, 2015; Vásquez-Almazán & Rovito, 2014), lagartijas *Abronia* (Gutiérrez-Rodríguez *et al.*, 2021) y víboras como *Bothriechis* (Mason *et al.*, 2019).

Las barreras geográficas pasadas aíslan distintas especies relacionadas entre las tierras altas del noroeste y el noreste de Guatemala. Un ejemplo claro es el cañón del río Chixoy el cual provoca cambios abruptos en altitud desde los 500 hasta los 2,000 msnm al este y en la región occidental desde los 500 a los 1,500 msnm en distancias menores a 3 km de ambos lados. Esto separa el oriente de la Sierra de los Cuchumatanes y Cerro Guachmalén y la Sierra de Yalijux (Yoshimoto & Ariano-Sánchez, 2018). Distintos estudios han reportado el cañón del Río Chixoy como una barrera biogeográfica importante para distintos grupos como árboles de madera dura del género *Magnolia* (Serrano *et al.*, 2020), salamandras del género *Bolitoglossa* (Dahinten-Bailey *et al.*, 2021). En este contexto, el cañón del río Chixoy parece ser la barrera geográfica principal que separa a las salamandras del cerro Guachmalén de su taxón hermano *B. cuchumatana*. Otra barrera importante para las salamandras del cerro Guachmalén es la presencia de la cuenca del río Polochic la cual nace en Sierra Chamá y Sierra de las Minas (Obrist-Farner *et al.*, 2020), separando a las salamandras de las poblaciones de Baja Verapaz.

Sumado a las barreras geográficas presentes en Guatemala, la creciente fragmentación de hábitat es un factor importante para la separación de taxones y la disminución de la conectividad de las poblaciones de una especie. La pérdida y fragmentación de hábitat son de las mayores amenazas para la biodiversidad debido a que un hábitat inadecuado puede formar parte de una barrera importante de flujo de genes interrumpiendo la conectividad entre poblaciones (Sunny *et al.*, 2022). Por lo que es importante implementar estudios de genética del paisaje para dar a conocer las implicaciones de la perturbación del hábitat en la

conectividad de las poblaciones de las salamandras para poder establecer estrategias de conservación adecuadas a sus necesidades.

8. CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio establecen una alta diversidad genética dentro y entre las poblaciones de *Bolitoglossa helmrichi*. La población de Alta Verapaz la más diversa del resto ya que presenta altos niveles de diversidad en los índices evaluados.

La población más diferente es la de Baja Verapaz apoyada por el índice de fijación el cual estableció una menor conectividad genética con el resto de las poblaciones.

Se estableció alta diferenciación genética entre poblaciones con un alto número de haplotipos, especialmente para el gen Cytb conformado por 19 haplotipos y una diversidad haplotípica de 0.8984615.

Según las reconstrucciones filogenéticas basadas en los genes mitocondriales se determinó una nueva especie para la población localizada en la Reserva Natural Privada Pamac II, San Cristóbal Verapaz, Alta Verapaz.

Se sugiere que los especímenes del departamento de Quiché deben de ser considerados una nueva especie, sin embargo, se requiere de un mayor número de muestra para esta localidad.

Se estableció que la temperatura máxima del mes más cálido, la temperatura promedio del trimestre más cálido, la precipitación estacionaria y la precipitación del mes más seco son las variables bioclimáticas más importantes para determinar la distribución de las poblaciones de *B. helmrichi* muestreadas en el presente estudio.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda ampliar este estudio aumentando el número de localidades muestreadas y de individuos de cada una para determinar el estado de las poblaciones y describir el conjunto de especies propuesto para *B. helmrichi*. Estos datos son de importancia para determinar la diversidad de salamandras del género *Bolitoglossa* en Guatemala y establecer planes y estrategias adecuadas de conservación para las poblaciones de este grupo. Además, nos permite determinar el impacto de los eventos históricos y actividades antropogénicas en la conectividad de las poblaciones actuales.

Es importante ampliar la información molecular implementando el uso de marcadores nucleares y marcadores tipo microsatélites. Esto permite ampliar la información sobre el estado actual de las poblaciones de *B. helmrichi* ya que estos marcadores brindan información sobre eventos más recientes a diferencia de los mitocondriales que brindan información de eventos pasados. A su vez, estos marcadores permiten calcular el tamaño efectivo de una población y estableciendo la estructura genética de las mismas.

Se propone continuar la investigación analizando la posible presencia una posible nuevas especie del grupo *rostrata* en la Reserva Pamac II, San Cristóbal Verapaz, Alta Verapaz. Para ello es importante realizar la descripción de esta especie ampliando la información molecular para la misma y en conjunto con datos morfológicos los cuales no pudieron ser analizados en el presente estudio. A su vez, se sugiere generar un plan de conservación para el clado propuesto priorizando las áreas de desarrollo de estas.

Se recomienda la generación de mapas con las proyecciones de distribución históricas y futuras para reconocer los patrones de aislamiento y rutas de colonización utilizadas para este grupo en Guatemala. Esto permitiría establecer las áreas de distribución del conjunto de especies de *B. helmrichi* e identificar los estados de cada una de sus poblaciones.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Galvis, A. R., & Gutiérrez-Lamus, D. L. (2012). A new species of salamander (Bolitoglossa: Plethodontidae) from the Cordillera Oriental of the Colombian Andes. *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)*, 52(18), 201–218. <https://doi.org/10.1590/S0031-10492012001800001>
- Adams, D. C., Berns, C. M., Kozak, K. H., & Wiens, J. J. (2009). Are rates of species diversification correlated with rates of morphological evolution? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1668), 2729–2738. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0543>
- Allentoft, M., & O'Brien, J. (2010). Global Amphibian Declines, Loss of Genetic Diversity and Fitness: A Review. *Diversity*, 2(1), 47–71. <https://doi.org/10.3390/d2010047>
- AmphibiaWeb. (2022). *AmphibiaWeb*. University of California. <<https://amphibiaweb.org>>
- Anderson, M. T., & Mathis, A. (1999). Diets of Two Sympatric Neotropical Salamanders, *Bolitoglossa mexicana* and *B. rufescens*, with Notes on Reproduction for *B. rufescens*. *Journal of Herpetology*, 33(4), 601. <https://doi.org/10.2307/1565576>
- Arntzen, J. W., Smithson, A., & Oldham, R. S. (1999). Marking and Tissue Sampling Effects on Body Condition and Survival in the Newt *Triturus cristatus*. *Journal of Herpetology*, 33(4), 567. <https://doi.org/10.2307/1565573>
- Avice, J. C. (2000). *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press.
- Baillie, J., Hilton-Taylor, C., & Stuart, S. (2004). *IUCN Red List of Threatened Species: A global species assessment*. Cambridge University Press. <https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/>
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K., & Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3), 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>
- Biswas, S., & Akey, J. M. (2006). Genomic insights into positive selection. *Trends in Genetics*, 22(8), 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.06.005>
- Bohonak, A. J. (1999). Dispersal, Gene Flow, and Population Structure. *The Quarterly Review of Biology*, 74(1), 21–45. <https://doi.org/10.1086/392950>
- Branch, C. L., Jahner, J. P., Kozlovsky, D. Y., Parchman, T. L., & Pravosudov, V. V. (2017). Absence of population structure across elevational gradients despite large phenotypic variation in mountain chickadees (*Poecile gambeli*). *Royal Society Open Science*, 4(3), 170057. <https://doi.org/10.1098/rsos.170057>
- Brcko, I. C., Hoogmoed, M. S., & Neckel-Oliveira, S. (2013). Taxonomy and distribution of the salamander genus *Bolitoglossa* Duméril, Bibron & Duméril, 1854 (Amphibia, Caudata,

Plethodontidae) in Brazilian Amazonia. *Zootaxa*, 3686(4), 401.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.3686.4.1>

Campbell, J., Smith, E., Streichter, J., Acevedo, M., & Brodie, E. (2010a). *New salamanders (Caudata: Plethodontidae) from Guatemala, with Miscellaneous notes on known species*. 200.

Campbell, J., Smith, E., Streichter, J., Acevedo, M., & Brodie, E. (2010b). *New salamanders (Caudata: Plethodontidae) from Guatemala, with miscellaneous notes on known species*. 200(1).

Campbell, N., & Reece, J. (2007). *Biología*. Medica Panamericana.

Carstens, B. C., Brunsfeld, S. J., Demboski, J. R., Good, J. M., & Sullivan, J. (2005). Investigating the evolutionary history of the Pacific Northwest mesic forest ecosystem: Hypothesis testing within a comparative phylogeographic framework. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 59(8), 1639–1652.

Carta, A., Peruzzi, L., & Ramírez-Barahona, S. (2022). A global phylogenetic regionalization of vascular plants reveals a deep split between Gondwanan and Laurasian biotas. *New Phytologist*, 233(3), 1494–1504. <https://doi.org/10.1111/nph.17844>

Castoe, T. A., Daza, J. M., Smith, E. N., Sasa, M. M., Kuch, U., Campbell, J. A., Chippindale, P. T., & Parkinson, C. L. (2009). Comparative phylogeography of pitvipers suggests a consensus of ancient Middle American highland biogeography. *Journal of Biogeography*, 36(1), 88–103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.01991.x>

Castresana, J. (2001). Cytochrome b Phylogeny and the Taxonomy of Great Apes and Mammals. *Molecular Biology and Evolution*, 18(4), 465–471. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003825>

Catenazzi, A., Richards, S., & Glos, J. (2016). Herpetofauna. En *Core Standardized Method for Rapid Biological Fields Assessment*. Conservation International.

Centro de Estudios Conservacionistas. (1999). *Plan Maestro Biotopo Universitario “Mario Dary Rivera” para la conservación del Quetzal 2,000-2004*. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Cogger, H. G., Zweifel, R. G., & Kirshner, D. (Eds.). (1998). *Encyclopedia of reptiles & amphibians* (2nd ed). Academic Press.

Cryer, J., Wynne, F., Price, S. J., & Puschendorf, R. (2019). Cryptic diversity in *Lithobates warszewitschii* (Amphibia, Anura, Ranidae). *ZooKeys*, 838, 49–69. <https://doi.org/10.3897/zookeys.838.29635>

Cutter, A. (2019). *A primer of molecular population genetics*. Oxford University Press.

Dahinten-Bailey, H., Serrano, M. J., Alonso-Ascencio, M., Cruz-Font, J. J., Rosito-Prado, I., Ruiz-Villanueva, K. J. A., Vásquez-Almazan, C., & Ariano-Sánchez, D. (2021). A new species of *Bolitoglossa* (Caudata: Plethodontidae) of the *Bolitoglossa franklini* group from an isolated cloud forest in northern Guatemala. *Zootaxa*, 4966(2), 202–214. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4966.2.7>

- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Daza, J. M., Castoe, T. A., & Parkinson, C. L. (2010). Using regional comparative phylogeographic data from snake lineages to infer historical processes in Middle America. *Ecography*, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2010.06281.x>
- Domínguez-Domínguez, O., & Vázquez-Domínguez, E. (2009). *Filogeografía: Aplicaciones en taxonomía y conservación*. 32(1), 59–70.
- Escobar, L. E. (2020). Ecological Niche Modeling: An Introduction for Veterinarians and Epidemiologists. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 519059. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.519059>
- FAO. (2020). *El estado de los bosques del mundo 2020: Los bosques, la biodiversidad y las personas*. FOOD & AGRICULTURE ORG.
- Feijó, A., Wen, Z., Cheng, J., Ge, D., Xia, L., & Yang, Q. (2019). Divergent selection along elevational gradients promotes genetic and phenotypic disparities among small mammal populations. *Ecology and Evolution*, 9(12), 7080–7095. <https://doi.org/10.1002/ece3.5273>
- Fick, S. E., & Hijmans, R. J. (2017). WorldClim 2: New 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 37(12), 4302–4315. <https://doi.org/10.1002/joc.5086>
- Frankham, R. (2019). Conservation Genetics. En *Encyclopedia of Ecology* (pp. 382–390). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10559-7>
- Freeland, J. (2014). *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Fu, J., & Zeng, X. (2008). How many species are in the genus *Batrachuperus*? A phylogeographical analysis of the stream salamanders (family Hynobiidae) from southwestern China. *Molecular Ecology*, 17(6), 1469–1488. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03681.x>
- Funk, W. C., Blouin, M. S., Corn, P. S., Maxell, B. A., Pilliod, D. S., Amish, S., & Allendorf, F. W. (2005). Population structure of Columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) is strongly affected by the landscape: LANDSCAPE GENETICS OF FROGS. *Molecular Ecology*, 14(2), 483–496. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02426.x>
- Gadagkar, S. R., Rosenberg, M. S., & Kumar, S. (2005). Inferring species phylogenies from multiple genes: Concatenated sequence tree versus consensus gene tree. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 304B(1), 64–74. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21026>
- García-París, M., Parra-Olea, G., & Wake, D. (2008). *Description of a new species of the Bolitoglossa subpalmata group (Caudata: Plethodontidae) from Costa Rica*. 18(1), 23–31.

- Garnacho-Montero, J., Garnacho-Montero, M. C., Ortiz Leyba, C., & Aldabó Pallás, T. (2005). Polimorfismos genéticos en la sepsis. *Medicina Intensiva*, 29(3), 185–191. [https://doi.org/10.1016/S0210-5691\(05\)74226-1](https://doi.org/10.1016/S0210-5691(05)74226-1)
- GBIF.org. (2022). *GBIF Occurrence Download*. <https://doi.org/10.15468/dl.ykxwyb>
- Gillespie, J. H. (2004). *Population genetics: A concise guide* (2nd ed). Johns Hopkins University Press.
- Giordano, A. R., Ridenhour, B. J., & Storfer, A. (2007). The influence of altitude and topography on genetic structure in the long-toed salamander (*Ambystoma macrodactylum*). *Molecular Ecology*, 16(8), 1625–1637. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03223.x>
- Grieco, T. M., & Rizk, O. T. (2010). Cranial shape varies along an elevation gradient in Gambel's white-footed mouse (*Peromyscus maniculatus gambelii*) in the Grinnell Resurvey Yosemite transect. *Journal of Morphology*, 271(8), 897–909. <https://doi.org/10.1002/jmor.10839>
- Groves, C. (2017). *Biogeografic Region*. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/biogeographic-region>.
- Gutiérrez-Rodríguez, J., Zaldívar-Riverón, A., Solano-Zavaleta, I., Campbell, J. A., Meza-Lázaro, R. N., Flores-Villela, O., & Nieto-Montes de Oca, A. (2021). Phylogenomics of the Mesoamerican alligator-lizard genera *Abronia* and *Mesaspis* (Anguillidae: Gerrhonotinae) reveals multiple independent clades of arboreal and terrestrial species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 154, 106963. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106963>
- Haig, S. M. (1998). MOLECULAR CONTRIBUTIONS TO CONSERVATION. *Ecology*, 79(2), 413–425. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1998\)079\[0413:MCTC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1998)079[0413:MCTC]2.0.CO;2)
- Hairston, N. G. (2009). *Community ecology and salamander guilds*.
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754–755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Hughes, A. R., Inouye, B. D., Johnson, M. T. J., Underwood, N., & Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity: Ecological effects of genetic diversity. *Ecology Letters*, 11(6), 609–623. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x>
- IUCN. (2008). *Bolitoglossa celaque*: Cruz, G., Wilson, L.D., McCranie, R. & Castañeda, F.: *The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T59144A11889323* [Data set]. International Union for Conservation of Nature. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T59144A11889323.en>
- IUCN. (2019). *Bolitoglossa helmrichi*: IUCN SSC Amphibian Specialist Group: *The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T59167A54374856* [Data set]. International Union for Conservation of Nature. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-2.RLTS.T59167A54374856.en>
- Joyce, D. A., & Pullin, A. S. (1999). Book reviews. *Heredity*, 83(6), 767–767. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.1999.0670b.x>

- Keller, I., Alexander, J. M., Holderegger, R., & Edwards, P. J. (2013). Widespread phenotypic and genetic divergence along altitudinal gradients in animals. *Journal of Evolutionary Biology*, 26(12), 2527–2543. <https://doi.org/10.1111/jeb.12255>
- Kirk, M. A., Galatowitsch, M. L., & Wissinger, S. A. (2019). Seasonal differences in climate change explain a lack of multi-decadal shifts in population characteristics of a pond breeding salamander. *PLOS ONE*, 14(9), e0222097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222097>
- Köhler, G. (2011). *Amphibians of Central America*. Herpeton Verlag Elke Köhler.
- Koo, M., Vredenburg, V. T., Gross, J., Spencer, C., Tunstall, T., & Wake, D. B. (2013). Visualizing AmphibiaWeb Data with Continuous Cartograms. En *Amphibia Web: Information on amphibian biology and conservation* (Berkeley). <https://amphibiaweb.org/amphibian/cartograms/>
- Lande, R. (1998). Anthropogenic, ecological and genetic factors in extinction and conservation. *Researches on Population Ecology*, 40(3), 259–269. <https://doi.org/10.1007/BF02763457>
- Landweber, L. F., & Dobson, A. P. (Eds.). (1999). *Genetics and the extinction of species: DNA and the conservation of biodiversity*. Princeton University Press.
- Leary, S. L. & American Veterinary Medical Association. (2020). *AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition*. <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf>
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- Lewis, Z. R., Kerney, R., & Hanken, J. (2011). Lung development in lungless salamanders! *Developmental Biology*, 356(1), 250–251. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.05.560>
- Leyse, K., Lind, A., Savage, W., Shaffer, H., & Stephens, M. (2003). *Tissue Collection Protocol for Genetic Research*. University of California, Davis.
- Lomolino, M. V., Sax, D. F., Brown, J. H., International Biogeography Society, & National Center for Ecological Analysis and Synthesis (Eds.). (2004). *Foundations of biogeography: Classic papers with commentaries*. University of Chicago Press.
- Luo, S., Valencia, C. A., Zhang, J., Lee, N.-C., Slone, J., Gui, B., Wang, X., Li, Z., Dell, S., Brown, J., Chen, S. M., Chien, Y.-H., Hwu, W.-L., Fan, P.-C., Wong, L.-J., Atwal, P. S., & Huang, T. (2018). Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(51), 13039–13044. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810946115>
- Maddison, W., & Maddison, D. (2011). *Mesquite: A Modular System for Evolutionary Analysis*. <http://mesquiteproject.org>

- Manel, S., Schwartz, M. K., Luikart, G., & Taberlet, P. (2003). Landscape genetics: Combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, *18*(4), 189–197. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00008-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00008-9)
- Mann, P., Rogers, R., & Gahagan, L. (2015). Overview of plate tectonic history and its unresolved tectonic problems. En *Central America: Geology, Resources and Hazards*. (Bundschuh&Alvarado). Taylor & Francis Group.
- Marshall, J. (2007). The Geomorphology and Physiographic Provinces of Central America. En *Central America: Geology, Resources and Hazards* (Bundschuh&Alvarado). Taylor & Francis Group.
- Martínez-Solano, I., Jockusch, E. L., & Wake, D. B. (2007). Extreme population subdivision throughout a continuous range: Phylogeography of *Batrachoseps attenuatus* (Caudata: Plethodontidae) in western North America. *Molecular Ecology*, *16*(20), 4335–4355. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03527.x>
- Mason, A. J., Graziotin, F. G., Zaher, H., Lemmon, A. R., Moriarty Lemmon, E., & Parkinson, C. L. (2019). Reticulate evolution in nuclear Middle America causes discordance in the phylogeny of palm-pitvipers (Viperidae: *Bothriechis*). *Journal of Biogeography*, *46*(5), 833–844. <https://doi.org/10.1111/jbi.13542>
- Meza-Joya, F. L., Hernández-Jaimes, C., & Ramos-Pallares, E. (2017). A new species of Salamander (Caudata, Plethodontidae, Bolitoglossa) from Serranía de los Yariguíes, Colombia. *Zootaxa*, *4294*(1), 93. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4294.1.4>
- Migliani, G. (2015). *Essentials of Molecular Genetics*. Copublished by Alpha Science International, Oxford, U.K. and Narosa Publishing House, New Delhi, India. <https://doi.org/10.13140/2.1.3513.3769>
- Miller, R. E., & Fowler, M. E. (2014). *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine, Volume 8—E-Book*.
- Mueller, R. L., Macey, J. R., Jaekel, M., Wake, D. B., & Boore, J. L. (2004). Morphological homoplasy, life history evolution, and historical biogeography of plethodontid salamanders inferred from complete mitochondrial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(38), 13820–13825. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405785101>
- Muller-Hohenstein, K. (2001). Biogeography. En *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences* (pp. 1201–1206). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-08-043076-7/02599-7>
- National Research Council. (1974). *Classification and Description of Amphibians Commonly Used for Laboratory Research*. National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK217595/>

- Neckel-Oliveira, S., Sarmiento, J. F. M., Galatti, U., Suárez, P., Lima, C., Lima, A. A., & Fáveri, S. B. (2011). Reproductive Traits of the Brazilian Salamander *Bolitoglossa paraensis* (Urodela: Plethodontidae). *Copeia*, 2011(3), 457–462. <https://doi.org/10.1643/CE-08-219>
- Nosil, P., Harmon, L. J., & Seehausen, O. (2009). Ecological explanations for (incomplete) speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(3), 145–156. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.10.011>
- Obrist-Farner, J., Eckert, A., Locmelis, M., Crowley, J. L., Mota-Vidaure, B., Lodolo, E., Rosenfeld, J., & Duarte, E. (2020). The role of the Polochic Fault as part of the North American and Caribbean Plate boundary: Insights from the infill of the Lake Izabal Basin. *Basin Research*, 32(6), 1347–1364. <https://doi.org/10.1111/bre.12431>
- Orr, H. A. (2010). The population genetics of beneficial mutations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1544), 1195–1201. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0282>
- Paradis, E. (2010). *pegas: An R package for population genetics with an integrated-modular approach*. 26, 419–420.
- Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K. (2004). *APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language*. 20, 289–290.
- Parra-Olea, G., García-París, M., & Wake, D. B. (2004). Molecular diversification of salamanders of the tropical American genus *Bolitoglossa* (Caudata: Plethodontidae) and its evolutionary and biogeographical implications: TROPICAL AMERICAN SALAMANDER DIVERSIFICATION. *Biological Journal of the Linnean Society*, 81(3), 325–346. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2003.00303.x>
- Peñafiel, N., Flores, D. M., Rivero De Aguilar, J., Guayasamin, J. M., & Bonaccorso, E. (2019). A cost-effective protocol for total DNA isolation from animal tissue. *Neotropical Biodiversity*, 5(1), 69–74. <https://doi.org/10.1080/23766808.2019.1706387>
- Phillips, S., Dudík, M., & Schapire, R. (2022). *Maxent software for modeling species niches and distribution (Version 3.4.1)*. http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/maxent/
- Posadas, P., Crisci, J. V., & Katinas, L. (2006). Historical biogeography: A review of its basic concepts and critical issues. *Journal of Arid Environments*, 66(3), 389–403. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2006.01.004>
- QGIS.org. (2022). *QGIS Geographic Information System*. <http://www.qgis.org>
- Rambaut, A. (2010). *FigTree v.1.3.1*. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- Ramírez, A. (1998). *Inventario y plan de manejo para la finca Pamac II*.
- Rovito, S. M., Parra-Olea, G., Lee, D., & Wake, D. (2012). A new species of *Bolitoglossa* (Amphibia, Caudata) from the Sierra de Juárez, Oaxaca, Mexico. *ZooKeys*, 185, 55–71. <https://doi.org/10.3897/zookeys.185.1146>

- Rovito, S. M., Vásquez-Almazán, C. R., & Papenfuss, T. J. (2010). A New Species of *Bolitoglossa* (Caudata: Plethodontidae) from the Sierra de las Minas, Guatemala. *Journal of Herpetology*, 44(4), 516–525. <https://doi.org/10.1670/09-205.1>
- Rovito, S. M., Vásquez-Almazán, C. R., Papenfuss, T. J., Parra-Olea, G., & Wake, D. B. (2015). Biogeography and evolution of Central American cloud forest salamanders (Caudata: Plethodontidae: *Cryptotriton*), with the description of a new species: *Cryptotriton* Phylogeny and Biogeography. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 175(1), 150–166. <https://doi.org/10.1111/zoj.12268>
- Säll, T., & Bengtsson, B. (2017). *Understanding population genetics: Trough the derivation of ten major results.*
- Schuchert, C. (1935). *Historical Geology of the Antillean-Caribbean Region Or the Lands Bordering the Gulf of Mexico and the Caribbean Sea* (John Wiley&Sons, Inc). American Association for the Advancement of Science.
- Segev, O., Polevikove, A., Blank, L., Goedbloed, D., Küpfer, E., Gershberg, A., Koplovich, A., & Blaustein, L. (2015). Correction: Effects of Tail Clipping on Larval Performance and Tail Regeneration Rates in the Near Eastern Fire Salamander, *Salamandra infraimmaculata*. *PLOS ONE*, 10(8), e0135839. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135839>
- Semlitsch, R. D., O'Donnell, K. M., & Thompson, F. R. (2014). Abundance, biomass production, nutrient content, and the possible role of terrestrial salamanders in Missouri Ozark forest ecosystems. *Canadian Journal of Zoology*, 92(12), 997–1004. <https://doi.org/10.1139/cjz-2014-0141>
- Serrano, M. J., Grajeda-Estrada, R., Villalobos, A., Álvarez-Ruano, M. R., & Vázquez-García, J. A. (2020). *Magnolia poqomchi*, a new species of subsection *Magnolia* (Magnoliaceae) from San Cristóbal Verapaz, Alta Verapaz, Guatemala. *Phytotaxa*, 454(4), 231–243. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.454.4.1>
- Singh, R. S., & Kulathinal, R. J. (2013). Polymorphism. En *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (pp. 398–399). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01189-X>
- Springer, M. S., DeBry, R. W., Douady, C., Amrine, H. M., Madsen, O., de Jong, W. W., & Stanhope, M. J. (2001). Mitochondrial Versus Nuclear Gene Sequences in Deep-Level Mammalian Phylogeny Reconstruction. *Molecular Biology and Evolution*, 18(2), 132–143. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003787>
- Stamatakis, A. (2014). *RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies.*
- Stevens, R. D. (2006). Historical processes enhance patterns of diversity along latitudinal gradients. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1599), 2283–2289. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3596>

- Sunny, A., López-Sánchez, M., Ramírez-Corona, F., Suárez-Atilano, M., & González-Fernández, A. (2022). Genetic diversity and functional connectivity of a critically endangered salamander. *Biotropica*, *54*(1), 42–56. <https://doi.org/10.1111/btp.13025>
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, *123*(3), 585–595. <https://doi.org/10.1093/genetics/123.3.585>
- Townsend, J., Butler, M., Wilson, L. D., & Austin, J. (2009). A new species of salamander in *Bolitoglossa dunni* group (Caudata: Plethodontidae: Bolitoglossinae) from Parque Nacional Montaña de Yoro, Honduras. *45*(2), 95–105.
- Vargas-García, V. (2015). *Guía de identificación de anfibios y reptiles*. PERU LGN.
- Vásquez-Almazán, C. R., & Rovito, S. M. (2014). A New Species of Black *Bolitoglossa* (Caudata: Plethodontidae) from Guatemala. *Journal of Herpetology*, *48*(4), 518–524. <https://doi.org/10.1670/13-170>
- Vences, M., & Wake, D. (2007). Speciation, Species Boundaries and Phylogeography of Amphibians. En *Amphibian Biology* (pp. 2613–2671). Surrey Beatty & Sons.
- Vitt, L. J., & Caldwell, J. P. (2014). Tetrapod Relationships and Evolutionary Systematics. En *Herpetology* (pp. 3–34). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386919-7.00001-0>
- Wake, D. B. (1966). *Comparative osteology and evolution of the lungless salamanders, family Plethodontidae*. Southern California Academy of Sciences]. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.146947>
- Wake, D. B. (2019). Caudata. En *Eyclopedia Britannica*. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3148.1.8>
- Wake, D. B., & Brame, A. H. (1969). Systematics and evolution of neotropical salamanders of the *Bolitoglossa helmrichi* group. *Contributions in science*, *175*, 1–40. <https://doi.org/10.5962/p.241162>
- Wake, D. B., & Lynch, J. (1975). *The distribution, ecology and evolutionary history of plethodontid salamanders in tropical America*. *25*, 1–65.
- Wake, D. B., & Marks, S. (1993). *Development and evolution of Plethodontid Salamanders: A review of prior studies and a prospectus for future research*. *49*(2), 194–203.
- Wake, D. B., & Vredenburg, V. T. (2008). Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(supplement_1), 11466–11473. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801921105>
- Warren, D. L., & Seifert, S. N. (2011). Ecological niche modeling in Maxent: The importance of model complexity and the performance of model selection criteria. *Ecological Applications*, *21*(2), 335–342. <https://doi.org/10.1890/10-1171.1>

- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Wells, K. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. University of Chicago Press Berlin Walter.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (2nd ed. 2016). Springer International Publishing : Imprint: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>
- Winter, M., Fiedler, W., Hochachka, W. M., Koehncke, A., Meiri, S., & De la Riva, I. (2016). Patterns and biases in climate change research on amphibians and reptiles: A systematic review. *Royal Society Open Science*, 3(9), 160158. <https://doi.org/10.1098/rsos.160158>
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088–5090. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576–4579. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576>
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics*, 28(2), 114–138. <https://doi.org/10.1093/genetics/28.2.114>
- Wright, S. (1949). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15(1), 323–354. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x>
- Wright, S. (1978). Variability within and among natural populations. En *Evolution and the Genetics of Population* (Vol. 4). University of Chicago Press.
- Yoshimoto, J., & Ariano-Sánchez, D. (2018). *El bosque estacionalmente seco de Guatemala: Flora, fauna y cultura*.

11. APÉNDICE

Apéndice 1. Muestras colectadas, localidad, coordinadas, elevación y secuenciación.

Código	Localidad	Municipio	Departamento	Longitud	Latitud	Elevación	Colector	Tipo de muestra
Bolito	Caserío Chiposo	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4099028	-90.6051194	1509	FMA	Cola
BOL2	Caserío Chiposo	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4191944	-90.6066944	1476	FMA	Hígado
BOL3	Finca Tzunu, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4099167	-90.6051667	1887	FMA	Hígado
BOL4	Finca Tzunu, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4099722	-90.6051111	1921	FMA	Cola
BOL5	Caserío Chiposo	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4140278	-90.6043889	1632	FMA	Hígado
BOL6	Caserío Chiposo	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4162222	-90.6029167	1748	FMA	Cola
BOL7	Reserva Natural Ranchitos del Quetzal	Purulhá	Baja Verapaz	15.2159861	-90.2246917	1740	FMA	Cola
BOL8	Reserva Natural Ranchitos del Quetzal	Purulhá	Baja Verapaz	15.2153361	-90.2222778	1744	FMA	Cola
BOL9	Reserva Natural Ranchitos del Quetzal	Purulhá	Baja Verapaz	15.2162972	-90.2198750	1657	FMA	Cola
BOL10	Reserva Natural Ranchitos del Quetzal	Purulhá	Baja Verapaz	15.2161583	-90.2206917	1693	FMA	Cola
BOL11	Reserva Natural Ranchitos del Quetzal	Purulhá	Baja Verapaz	15.2162972	-90.2198750	1705	FMA	Cola
BOL12	Reserva Natural Ranchitos del Quetzal	Purulhá	Baja Verapaz	15.2157722	-90.2211806	1719	FMA	Cola
BOL13	Reserva Natural Ranchitos del Quetzal	Purulhá	Baja Verapaz	15.2154000	-90.2221972	1757	FMA	Hígado
BOL14	Reserva Natural Ranchitos del Quetzal	Purulhá	Baja Verapaz	15.2149889	-90.2225028	1759	FMA	Hígado
BOL15	Reserva Natural Ranchitos del Quetzal	Purulhá	Baja Verapaz	15.2158944	-90.2245694	1750	FMA	Cola
BOL16	Reserva Natural Ranchitos del Quetzal	Purulhá	Baja Verapaz	15.2174028	-90.2230556	1699	FMA	Cola

Código	Localidad	Municipio	Departamento	Longitud	Latitud	Elevación	Colector	Tipo de muestra
BOL17	Finca Tzunuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4099528	-90.6051972	1936	FMA	Hígado
BOL18	Finca Tzunuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4099944	-90.6050972	1932	FMA	Cola
BOL19	Finca Tzunuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4100417	-90.6053028	1928	FMA	Cola
BOL20	Finca Tzunuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4103361	-90.6048333	1918	FMA	Cola
BOL21	Finca Tzunuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4104417	-90.6048361	1918	FMA	Cola
BOL23	Finca Tzunuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4108583	-90.6048806	1904	FMA	Cola
BOL24	Finca Tzunuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4108861	-90.6548750	1904	FMA	Cola
BOL25	Finca Tzunuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4105139	-90.6048333	1914	FMA	Cola
BOL26	Finca Tzunuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4102889	-90.6048417	1913	FMA	Cola
BOL27	Finca Tzunuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4102889	-90.6048417	1913	FMA	Cola
BOL28	Finca Tzunuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4103167	-90.6048222	1915	FMA	Hígado
BOL29	Finca Tzunuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4101500	-90.6048278	1922	FMA	Cola
BOL30	Finca Tzunuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4101222	-90.5881583	1924	FMA	Cola
BOL31	Finca Tzunuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4098722	-90.6047194	1937	FMA	Hígado
BOL32	Finca Tzunuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4099028	-90.6051444	1948	FMA	Hígado
BOL33	Finca Tzunuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4098889	-90.6050472	1946	FMA	Cola
BOL34	Finca Tzunuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4036889	-90.5979222	2142	FMA	Hígado
BOL35	Finca Tzunuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4098833	-90.6051528	1912	FMA	Cola

Código	Localidad	Municipio	Departamento	Longitud	Latitud	Elevación	Colector	Tipo de muestra
BOL36	Finca Tzunuuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4069000	-90.6043306	1944	FMA	Cola
BOL37	Finca Tzunuuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4096639	-90.6044083	1943	FMA	Cola
BOL38	Finca Tzunuuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4095611	-90.6039556	1936	FMA	Cola
BOL40	Finca Tzunuuj, Cerro Guachmalén	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4082139	-90.6029083	1915	FMA	Cola
BOL41	Caserío Chiposo	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4197250	-90.6067694	1494	FMA	Cola
BOL42	Caserío Chiposo	San Cristóbal Verapaz	Alta Verapaz	15.4187056	-90.6070444	1508	FMA	Hígado
BOLA6	Reserva Natural Biotopo del Quetzal Mario Dary Rivera	Purulhá	Baja Verapaz	-	-	1565	ENS	Hígado
BOLA8	Finca El Volcán	Senahú	Alta Verapaz	15°28.26'N	089°51.26'W	1295	JAC	Hígado
BOLB1	Camino entre El Chimel y San Pablo El Baldío	Uspantán	Quiché	15°30.72'N	090°47.52'W	1580	ENS	Hígado
BOLB5	Camino entre El Chimel y San Pablo El Baldío	Uspantán	Quiché	-	-	1550	ENS	Hígado
BOLF4	Marmolera, Cerro de los Monos	Río Hondo	Zacapa	-	-	-	EBC	Hígado
BOLG6	-	-	Baja Verapaz	-	-	-	-	Hígado

Nota: FMA: Flor Morales Arroyo, ENS: Eric N. Smith, EBC: Enio B. Cano, JAC: Jonathan A. Campbell.

Apéndice 2. Información de especímenes del género *Bolitoglossa* descargadas desde GenBank y sus váuchers utilizados para los análisis filogenéticos.

Especie	Váucher	16S	Cytb
<i>Bolitoglossa carri</i>	LDW11280	AY526139.1	AY526176.1
<i>Bolitoglossa celaque</i>	LDW11094	AY526141.1	AY526141.1
<i>Bolitoglossa centenorum</i>	MVZ:Herp:265355	MT524633.1	MT524683.1
<i>Bolitoglossa conanti</i>	MVZ 257800	GU725445.1	GU725458.1
<i>Bolitoglossa cuchumatana</i>	MVZ:Herp:251541	GU725454.1	GU725467.1
<i>Bolitoglossa daryorum</i>	MVZ:Herp:265507	MT524634.1	MT524686.1
<i>Bolitoglossa dunni</i>	MVZ 263454	GU725446.1	GU725459.1
<i>Bolitoglossa engelhardti</i>	MVZ 167789	AF218496.1	AF212987.1
<i>Bolitoglossa eremia</i>	MVZ:Herp:251544	MT524635.1	MT524691.1
<i>Bolitoglossa flavimembris</i>	MVZ 177786	GU725449.1	GU725462.1
<i>Bolitoglossa franklini</i>	MVZ:Herp:264193	MK165225.1	MK165231.1
<i>Bolitoglossa helmrichi</i>	MVZ 257804	GU725463.1	GU725463.1
<i>Bolitoglossa huehuetenanguensis</i>	MVZ:Herp:269875	MT524636.1	MT524684.1
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	MVZ:Herp:263474	MK165222.1	MK165229.1
<i>Bolitoglossa meliana</i>	MVZ:Herp:265621	KJ175100.1	-
<i>Bolitoglossa meliana</i>	UTA A-58565	-	HQ010004.1
<i>Bolitoglossa mexicana</i>	USNM:573702	MT524640.1	MT524695.1
<i>Bolitoglossa morio</i>	MVZ:Herp:251466	KJ175098.1	KJ175106.1
<i>Bolitoglossa ninadormida</i>	MVZ:Herp:231260	MT524643.1	MT524682.1
<i>Bolitoglossa nussbaumi</i>	MVZ:Herp:231259	MT524644.1	MT524681.1
<i>Bolitoglossa odonnelli</i>	MVZ:Herp:263498	MT524645.1	MT524696.1
<i>Bolitoglossa rostrata</i>	MVZ:Herp:251521	KJ175099.1	KJ175107.1
<i>Bolitoglossa suchitanensis</i>	MVZ:Herp:269899	MT524654.1	MT524690.1
<i>Bolitoglossa zacapensis</i>	MVZ 257805	GU725456.1	GU725456.1

Apéndice 3. Script de RStudio para red de haplotipos.

```
rm(list=ls())

library(ape)
library(ggplot2)
library(pegas)

setwd("~/TESIS/Análisis diversidad genética/Network")

Seq <- read.dna("Cytb_NetworkwMex.fas", format="fasta")
Seq
Haps <- haplotype(Seq, strict = T)
Haps
hap.div(Seq)
Net <- haploNet(Haps)
plot(Net, size = attr(Net, "freq"), legend = c(-25, 30), fast = FALSE, col.link="black", col =
"green", bg="green", show.mutation = 1, threshold=0)
replot()
ind.hap <- with(stack(setNames(attr(Haps, "index"), rownames(Haps))), table(hap=ind,
individuals=rownames(Seq)[values]))
ind.hap
```

Apéndice 4. Códigos de haplotipos y localidades de colecta para el gen 16S.

Haplotipo	Nombre de espécimen	Localidad
I	<i>Bolitoglossa cuchumatana</i>	-
	<i>Bolitoglossa</i> sp. 18	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
II	<i>Bolitoglossa helmrichi</i>	-
	<i>Bolitoglossa</i> sp. 05	Ranchitos del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz
	<i>Bolitoglossa</i> sp. 06	Ranchitos del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz
	<i>Bolitoglossa</i> sp. 08	Ranchitos del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz
	<i>Bolitoglossa</i> sp. 09	Ranchitos del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz
	<i>Bolitoglossa</i> sp. 12	Ranchitos del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz
III	<i>Bolitoglossa</i> sp. 01	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
	<i>Bolitoglossa</i> sp. 02	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
	<i>Bolitoglossa</i> sp. 03	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
	<i>Bolitoglossa</i> sp. 13	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
	<i>Bolitoglossa</i> sp. 15	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
	<i>Bolitoglossa</i> sp. 16	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
	<i>Bolitoglossa</i> sp. 22	Chicamán, Quiché
	<i>Bolitoglossa</i> sp. 23	Chicamán, Quiché
IV	<i>Bolitoglossa</i> sp. 04	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
V	<i>Bolitoglossa</i> sp. 07	Ranchitos del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz
VI	<i>Bolitoglossa</i> sp. 14	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
VII	<i>Bolitoglossa</i> sp. 17	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
VIII	<i>Bolitoglossa</i> sp. 19	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
IX	<i>Bolitoglossa</i> sp. 21	Senahú, Alta Verapaz
X	<i>Bolitoglossa</i> sp. 24	Biotopo del Quetzal Mario Dary Rivera, Purulhá, Baja Verapaz

Apéndice 5. Códigos de haplotipos y localidades de colecta para el gen Cytb.

Haplotipo	Nombre de espécimen	Localidad
I	Bolitoglossa helmrichi	-
II	Bolitoglossa cuchumatana	-
III	Bolitoglossa sp. 01	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
IV	Bolitoglossa sp. 02	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
V	Bolitoglossa sp. 03	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
VI	Bolitoglossa sp. 04	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
VII	Bolitoglossa sp. 05	Ranchitos del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz
VIII	Bolitoglossa sp. 06	Ranchitos del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz
	Bolitoglossa sp. 08	Ranchitos del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz
	Bolitoglossa sp. 12	Ranchitos del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz
IX	Bolitoglossa sp. 07	Ranchitos del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz
X	Bolitoglossa sp. 09	Ranchitos del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz
XI	Bolitoglossa sp. 10	Ranchitos del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz
	Bolitoglossa sp. 19	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
XII	Bolitoglossa sp. 11	Ranchitos del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz
XIII	Bolitoglossa sp. 13	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
	Bolitoglossa sp. 16	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
	Bolitoglossa sp. 17	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
	Bolitoglossa sp. 18	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
	Bolitoglossa sp. 20	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
XIV	Bolitoglossa sp. 14	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
XV	Bolitoglossa sp. 15	Pamac II, San Cristóbal, Alta Verapaz
XVI	Bolitoglossa sp. 21	Senahú, Alta Verapaz
XVII	Bolitoglossa sp. 22	Chicamán, Quiché
XVIII	Bolitoglossa sp. 23	Chicamán, Quiché
XIX	Bolitoglossa sp. 24	Biotopo del Quetzal Mario Dary Rivera, Purulhá, Baja Verapaz

Apéndice 6. Medidas de convergencia para el tamaño de la muestra en el análisis de MrBayes. Valor de tamaño de muestra estimado (ESS) y factor de reducción de escala potencial (PSRF+).

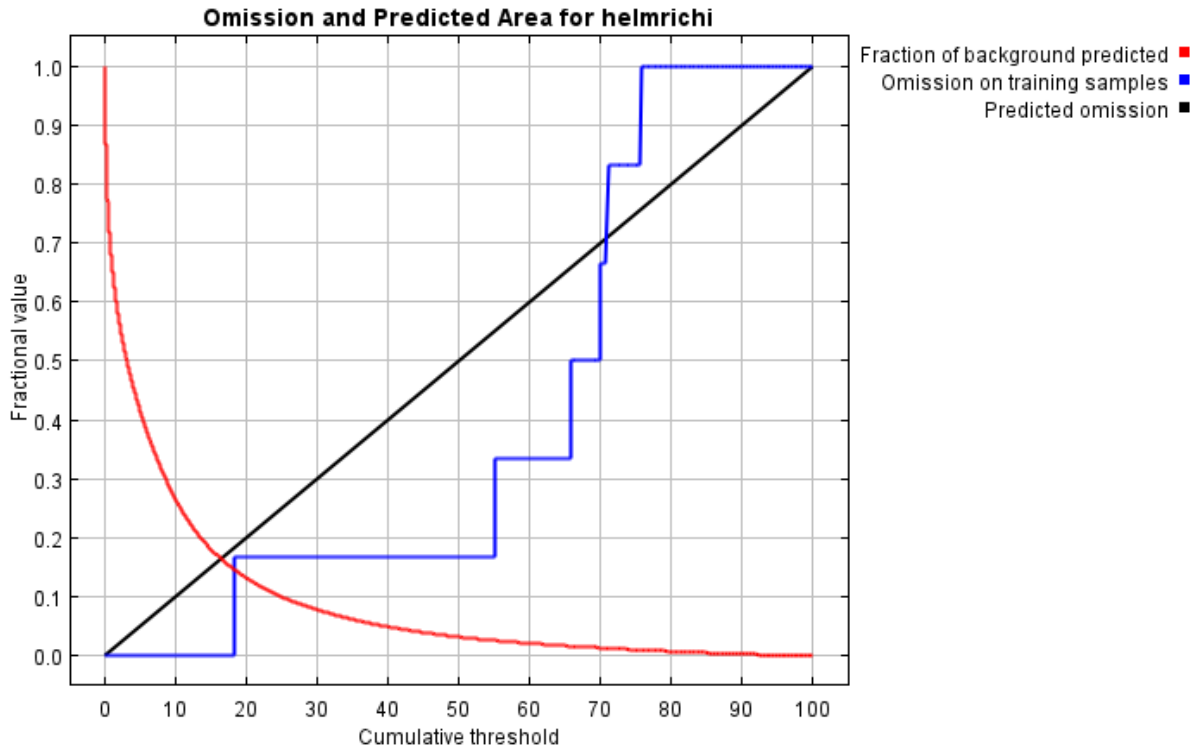
Parameter	Mean	Variance	95% HPD Interval		Median	min ESS*	avg ESS	PSRF+
			Lower	Upper				
TL	2.914488	7.720711	0.956507	7.821666	1.984903	830.84	869.98	1.000
r(A<->C)	0.036759	0.000039	0.024814	0.049231	0.036491	35823.80	36903.09	1.000
r(A<->G)	0.422044	0.001062	0.357976	0.485675	0.421704	12666.66	12962.76	1.000
r(A<->T)	0.046594	0.000039	0.034589	0.059028	0.046301	38093.24	38517.08	1.000
r(C<->G)	0.017912	0.000049	0.005440	0.031945	0.017225	32145.50	33082.20	1.000
r(C<->T)	0.471437	0.000966	0.409730	0.531727	0.471443	12853.66	13215.49	1.000
r(G<->T)	0.005254	0.000017	0.000001	0.013197	0.004350	36904.12	37169.57	1.000
pi(A)	0.316282	0.000153	0.291822	0.340319	0.316157	41231.42	42902.66	1.000
pi(C)	0.239402	0.000106	0.219414	0.259745	0.239300	40067.23	40819.28	1.000
pi(G)	0.151288	0.000101	0.131904	0.171123	0.151106	21450.08	21993.14	1.000
pi(T)	0.293028	0.000124	0.271339	0.315079	0.292971	37542.54	37928.55	1.000
alpha	1.247552	0.212682	0.179502	2.015536	1.244714	2416.78	2569.82	1.000
pinvar	0.547364	0.010383	0.321813	0.658097	0.574687	871.52	969.84	1.000
m{1}	0.597968	0.074536	0.129675	1.000022	0.603889	1022.14	1113.55	1.000

* Convergence diagnostic (ESS = Estimated Sample Size); min and avg values correspond to minimal and average ESS among runs.
ESS value below 100 may indicate that the parameter is undersampled.
+ Convergence diagnostic (PSRF = Potential Scale Reduction Factor; Gelman and Rubin, 1992) should approach 1.0 as runs converge.

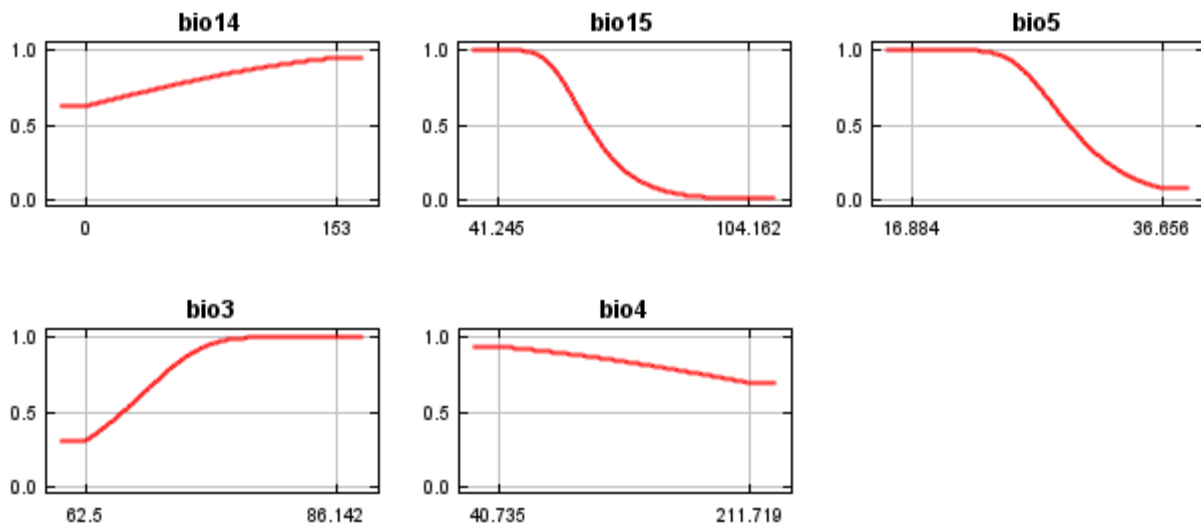
Apéndice 7. Códigos de las variables bioclimáticas para el análisis de Maxent.

Código	Variable bioclimática
BIO1	Temperatura promedio anual
BIO2	Rango diurno promedio
BIO3	Isotermalidad
BIO4	Temperatura estacionaria
BIO5	Temperatura máxima del mes más cálido
BIO6	Temperatura mínima del mes más frío
BIO7	Rango de temperatura anual
BIO8	Temperatura promedio del trimestre más húmedo
BIO9	Temperatura promedio del trimestre más seco
BIO10	Temperatura promedio del trimestre más cálido
BIO11	Temperatura promedio del trimestre más frío
BIO12	Precipitación anual
BIO13	Precipitación del mes más húmedo
BIO14	Precipitación del mes más seco
BIO15	Precipitación estacionaria
BIO16	Precipitación del trimestre más húmedo
BIO17	Precipitación del trimestre más seco
BIO18	Precipitación del trimestre más cálido
BIO19	Precipitación del trimestre más frío

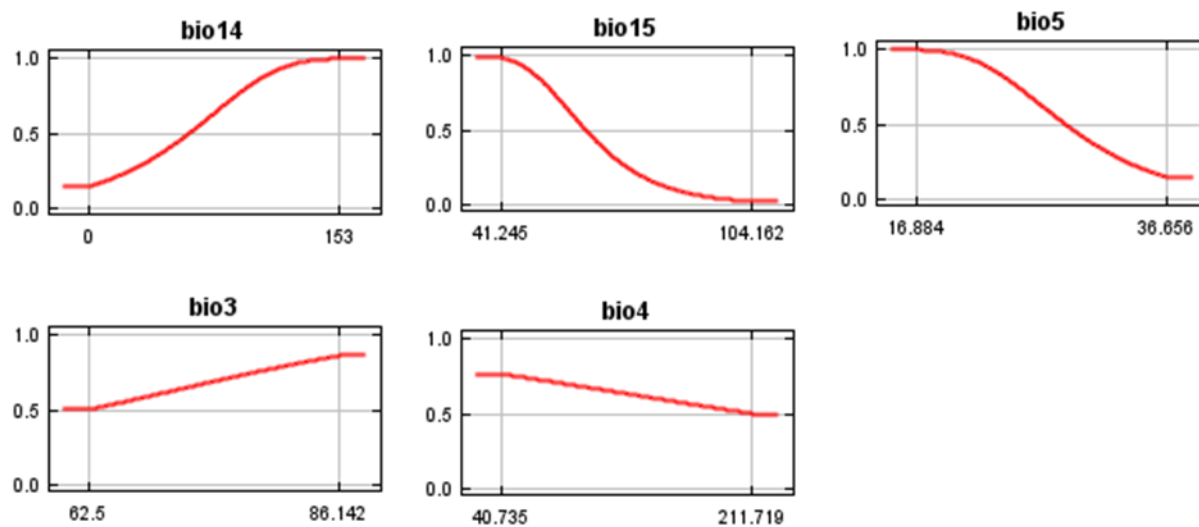
Apéndice 8. Análisis de omisión/comisión para datos de colecta en la modelación de Maxent.



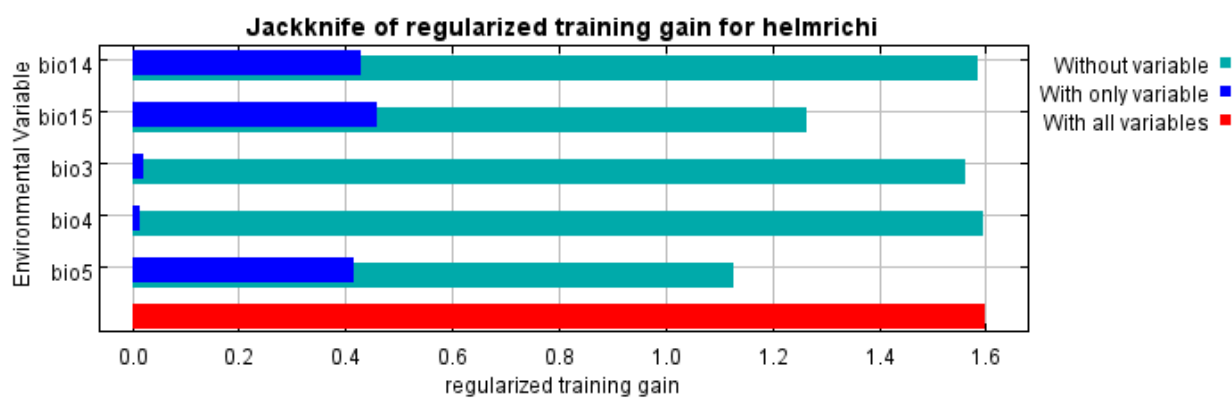
Apéndice 9. Curvas de respuesta según la probabilidad de presencia para datos de colecta.



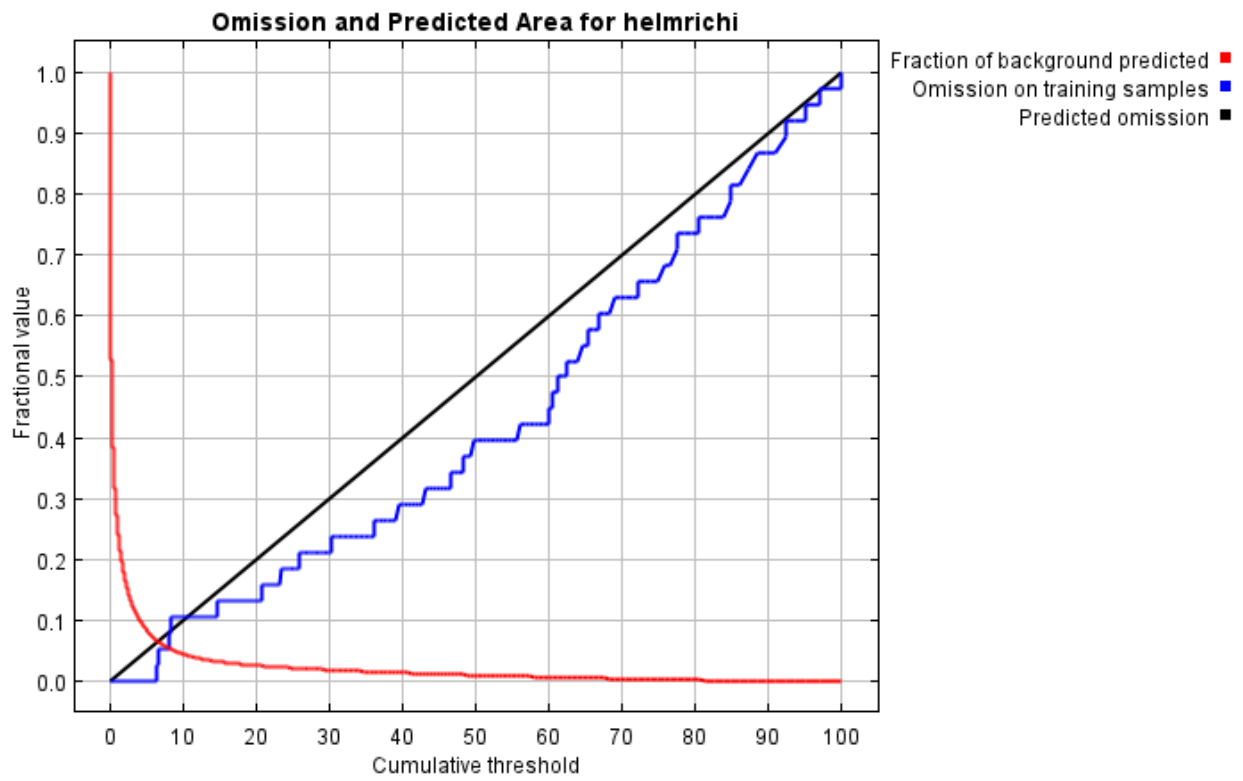
Apéndice 10. Curvas de respuesta según la probabilidad de presencia para datos de colecta.
Variables solas.



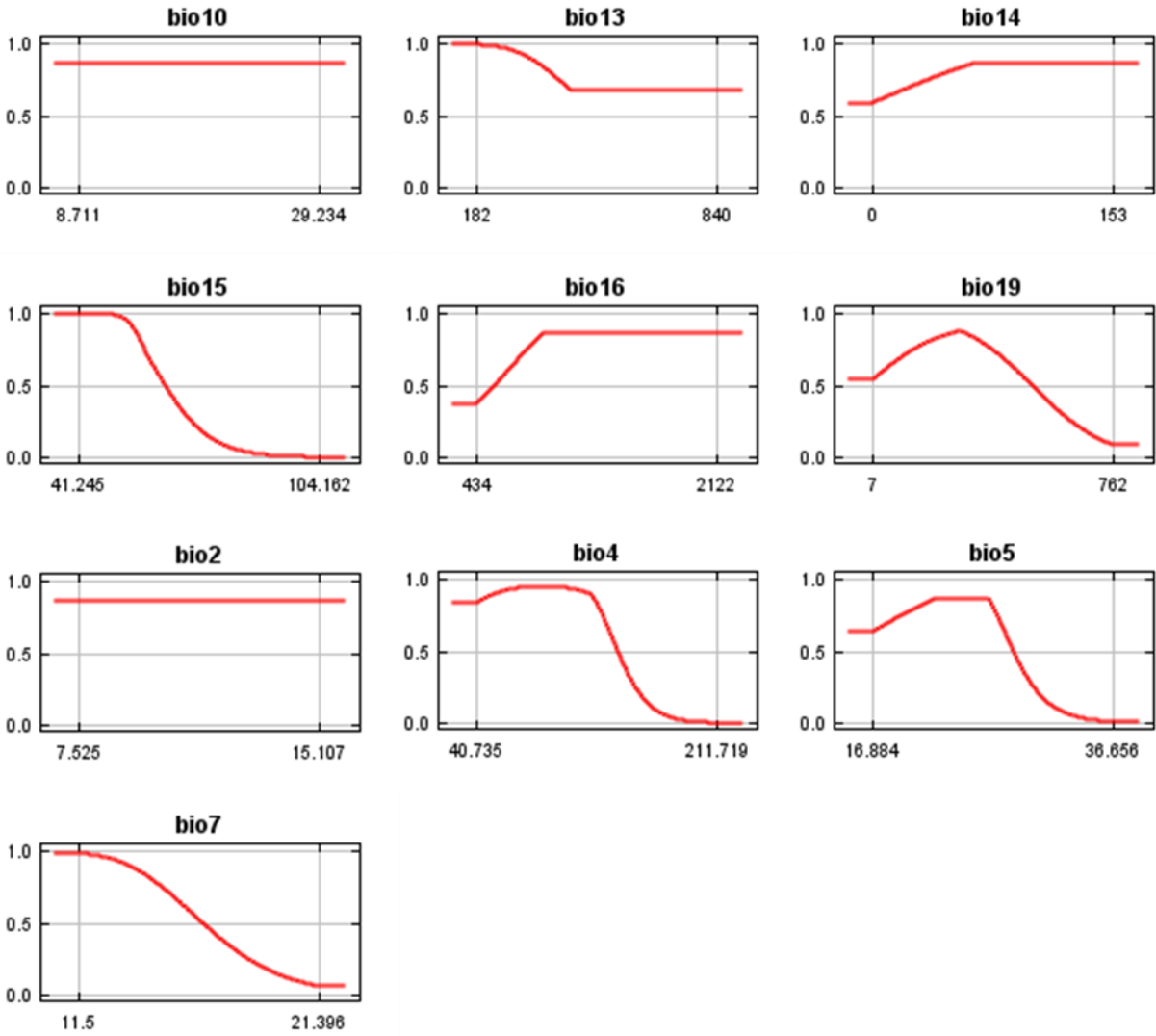
Apéndice 11. Análisis de Jackknife para la contribución de las variables ambientales.



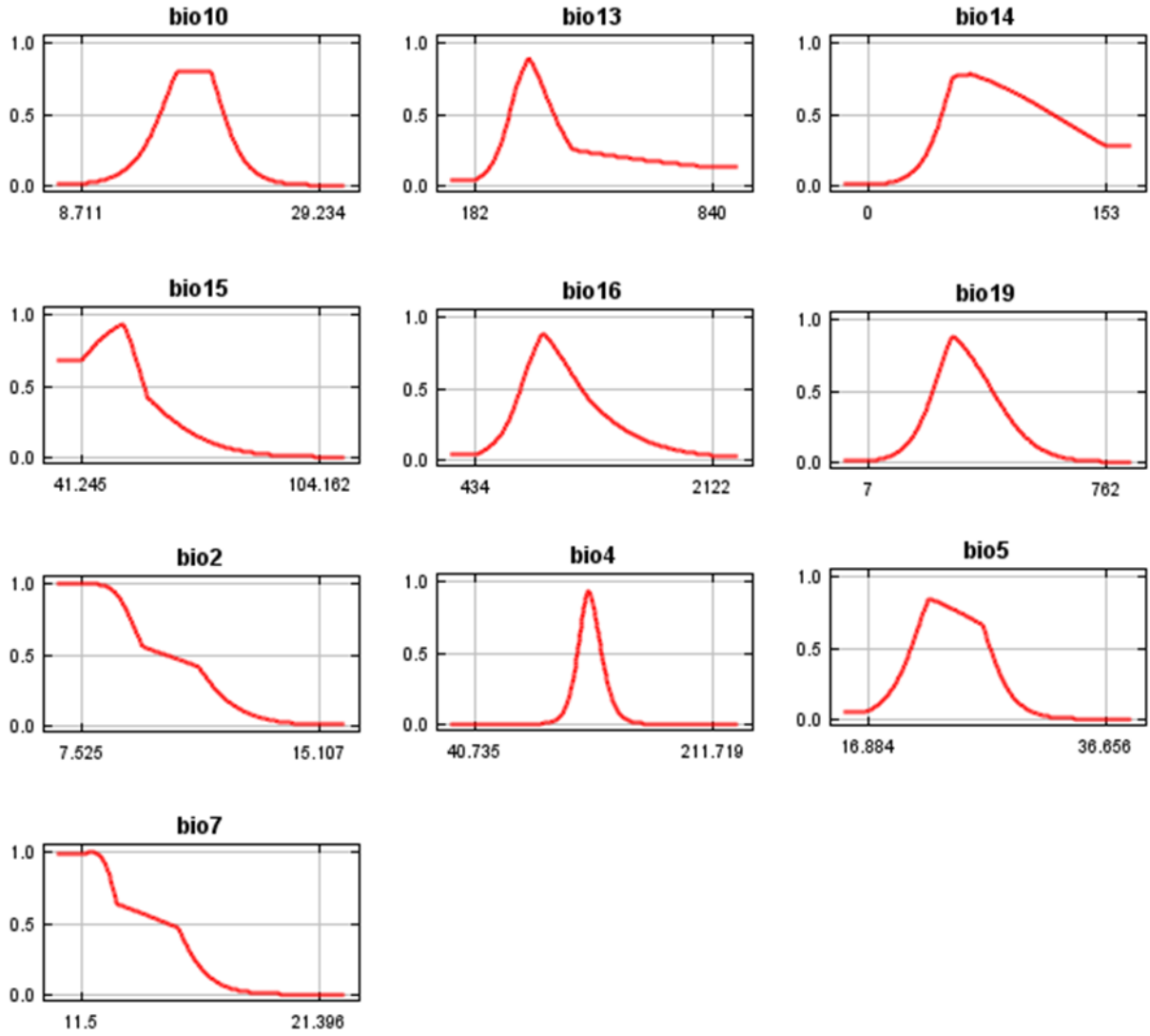
Apéndice 12. Análisis de omisión/comisión para datos de ocurrencia en la modelación de Maxent.



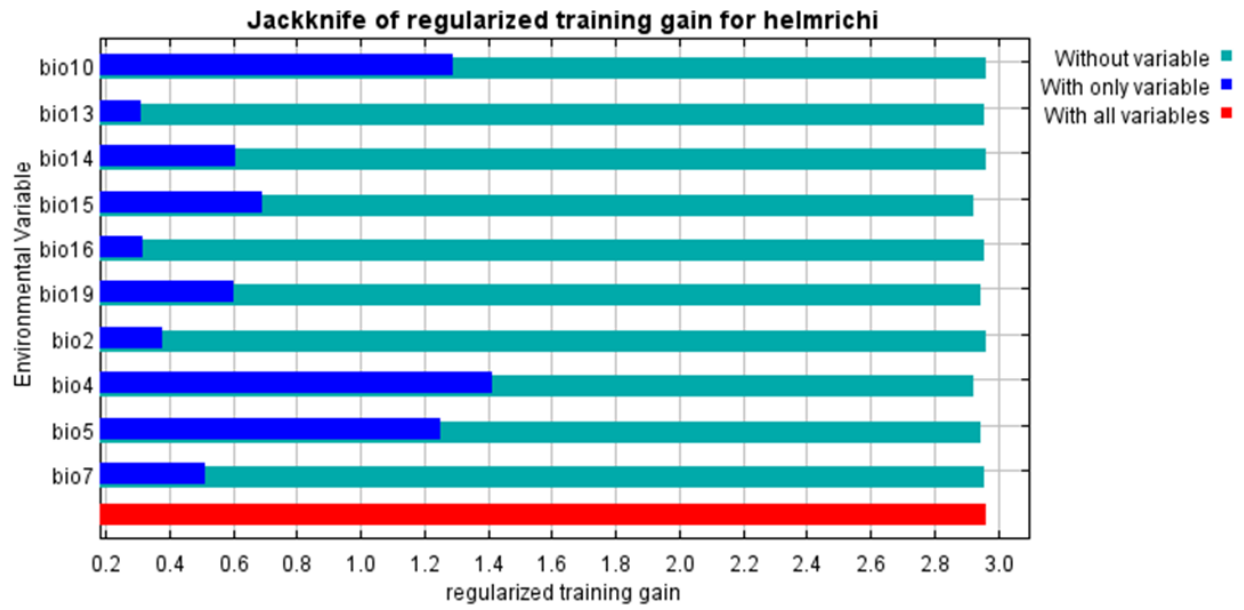
Apéndice 13. Curvas de respuesta según la probabilidad de presencia para datos de ocurrencia.



Apéndice 14. Curvas de respuesta según la probabilidad de presencia para datos de ocurrencia.
Variables solas.



Apéndice 15. Análisis de Jackknife para la contribución de las variables ambientales.



Apéndice 16. Cara de aprobación del comité de ética, uso y cuidado animal CEUCA-UVG.



**Comité de Ética, para el Uso y Cuidado Animal de la
Universidad del Valle de Guatemala
CEUCA - UVG**

Investigador Principal: Olga Alejandra Zamora Jerez
Tesista: Flor De María Morales Arroyo
Edificio y oficina: NA
E-Mail: oazamora@uvg.edu.gt / mor17290@uvg.edu.gt
Teléfono: 42166900
Número de propuesta: I-2021 (2)

Guatemala, 2 agosto 2021

Estimadas investigadoras,

Por este medio se hace constar que la propuesta titulada "Diferenciación genética de poblaciones de *Bolitoglossa helmrichi* (Caudata: Plethodontidae) en Alta Verapaz y Baja Verapaz, Guatemala" ha sido revisado por miembros del comité de Ética, para el Uso y Cuidado Animal de la Universidad Del Valle de Guatemala (CEUCA – UVG).

Se ha realizado una revisión del protocolo con el fin de asegurar el trato ético a los animales que serán utilizados para cumplir con los propósitos de la investigación. Se ha determinado que se cumple con los requisitos necesarios, así como también se ha cumplido con los procedimientos y lineamientos descritos por el comité.

Por este medio se le informa que se autoriza realizar la práctica con animales tal y como se describe en el protocolo mencionado por un período de un año a partir de la fecha de la presente carta. Se le solicita que, si hubiese necesidad de hacer cualquier otra modificación a lo descrito en la propuesta, se comunique de nuevo con el comité para que dichas enmiendas sean evaluadas previamente y de esa manera que se pueda garantizar que se cumple a cabalidad con los lineamientos del CEUCA-UVG. Solicitamos también al finalizar el estudio pueda remitir un reporte de los resultados al comité.

Sin otro particular quedo a sus órdenes,



MV Vanessa Granados B
Médico Veterinario
Colegiado 997
CEUCA - UVG
Comité de Ética, Uso y Cuidado Animal
Universidad del Valle de Guatemala.