

UNIVERSIDAD DEL VALLE
DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES



**Evaluación de la presencia del hongo quitridio
aatrachochytrium dendrobatidis EN ANFIBIOS (Anura
y Caudata) en siete departamentos y su distribución
potencial en Guatemala.**

Trabajo de investigación presentado por
Olga Zamora Jerez
para optar el grado académico de
Licenciada en Biología

Guatemala
2011

**Evaluación de la presencia del hongo quitridio
Batrachochytrium dendrobatidis en anfibios (Anura y
Caudata) en siete departamentos y su distribución
potencial en Guatemala**

UNIVERSIDAD DEL VALLE
DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES



**Evaluación de la presencia del hongo quitridio
Batrachochytrium dendrobatidis en anfibios (Anura y
Caudata) en siete departamentos y su distribución
potencial en Guatemala**

Trabajo de investigación presentado por
Olga Alejandra Zamora Jerez
para optar al grado de Licenciada en Biología

Guatemala

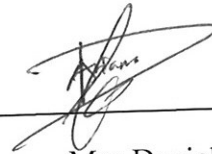
2011

: Principal

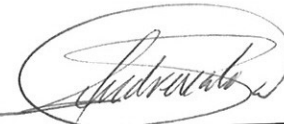


Msc. Daniel Ariano

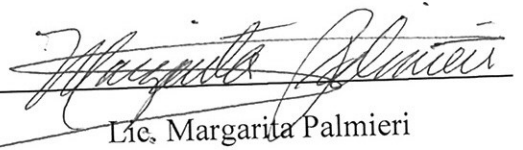
examinadora



Msc Daniel Ariano



Lic. Andrés Ávalos



Lic. Margarita Palmieri

obado el 29 de noviembre de 2011

A mi abuelito Gerardo Jerez Rivera

“siempre bonito”

Agradecimientos

Primero quiero agradecer a mis padres Gustavo y Olga, por enseñarme a ser una mejor persona cada día y el valor de una buena educación. Sin ustedes no podría haber cumplido mi meta. A mis abuelitos, en especial a mi abuelito Gerardo (Q.E.P.D.) los quiero mucho gracias por enseñarme a apreciar las cosas de la vida que realmente valen la pena. A mis hermanos y sobrinos: Paola, Alex, Luis, Scarlett, Cucho y Shorty por estar siempre a mi lado y lograr ponerme nerviosa cinco minutos antes de un examen importante.

A mi asesor Daniel Ariano por la ayuda y apoyo brindado durante el desarrollo del trabajo y a lo largo de la carrera, y por su amistad. A mi asesor Andrés Ávalos por toda la paciencia y ayuda brindada, por enseñarme a no rendirme y darme ánimos cuando algo salía mal. A Elena y Andrés por formarme como bióloga molecular, y ayudarme en todo momento. A la Licenciada Margarita Palmieri por guiarme y ayudarme durante toda la carrera. Al departamento de Biología por el equipo brindado para la realización de la tesis. A Paty, Don Joel y Fredy por tenerme paciencia y siempre sacarme de problemas.

A Gustavo por el apoyo, cariño y paciencia sobre todo en mis momentos de estrés, y por toda la ayuda brindada siempre.

A todos mis maestros a lo largo de mi vida, por enseñarme tanto dentro como fuera del aula. A mis compañeros universitarios en especial: Mile, Erick, Meme, Sofi, Pris, Javi, Eli, Pablo, Arturo, Zabdi, Claudia, Guido, Hugo, Daniela, Jeffrey y Juan Carlos por todo lo que hemos compartido y aprendido juntos.

A la Dra. Joyce Loncore del la Universidad de Maine por proporcionar las esporas para los controles y a Jeff Streicher por los consejos y contactos.

Al MUSHNAT y al proyecto FODECYT 70-2009 (Liza García, Gustavo Ruano, Jacobo Conde y Carlos Vásquez) por apoyarme para la realización de este trabajo, por la ayuda en el campo y por el material brindado para el mismo. A todas las personas que contribuyeron en la fase de campo, en especial: Don Chilo, Don Juan José, Don Roman y Gilberto y a Manuel Acevedo por la ayuda con la identificación de algunos individuos.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Agradecimientos	vi
Índice	viii
Índice de cuadros	viii
Índice de figuras	ix
Resumen	x
I. INTRODUCCIÓN	1
A. Antecedentes:	2
B. Justificación	13
C. Objetivos del proyecto	14
II. MÉTODOS	15
A. Trabajo de campo	
B. Extracción y cuantificación de ADN:	17
C. Procedimiento Reacción en Cadena de la Polimerasa	17
D. Análisis de datos:	18
III. RESULTADOS	20
IV. DISCUSIÓN	28
V. CONCLUSIONES	34
VI. RECOMENDACIONES	35
VII. LITERATURA CITADA	37

ÍNDICE DE CUADROS

No.	Contenido	
1	Receta de Master Mix para PCR para detección de <i>B. dendrobatidis</i>	17
2	Resultados de los análisis de <i>B. dendrobatidis</i> por familia.	20
3	Porcentaje de contribución al modelo de las variables climáticas	23
4	Áreas SIGAP con una probabilidad muy alta para <i>B. dendrobatidis</i> .	25
5	Áreas SIGAP con una probabilidad alta para <i>B. dendrobatidis</i> .	25
6	Áreas SIGAP con una probabilidad media para <i>B. dendrobatidis</i> :	26
7	Áreas SIGAP con una probabilidad baja para <i>B. dendrobatidis</i> :	26
8	Áreas SIGAP con una probabilidad muy baja para <i>B. dendrobatidis</i>	27

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Contenido	Página
1	Zoosporangio de <i>B. dendrobatidis</i> en piel de <i>Leptodactylus</i> . Ilustración de la sección longitudinal de la zoospora del parásito	7
2	quitridio Partes de los anfibios que fueron “hisopeadas” para la toma de muestra..	9
3	Mapa con las localidades muestreadas durante el estudio.	15
4	Diagrama de flujo de la extracción y cuantificación de ADN.....	16
5	Mapa de las localidades muestreadas. Modelo de la distribución potencial de <i>B. dendrobatidis</i> en Guatemala.	17
6	Modelo de la distribución potencial de <i>B. dendrobatidis</i> en Guatemala con la capa de información de las áreas protegidas del SIGAP.	22
7		23
8		24

Resumen

Batrachochytrium dendrobatidis es el hongo causante de la quitridiomycosis, una enfermedad infecciosa emergente que está acabando con las poblaciones de anfibios a nivel mundial. En Guatemala, Joseph Mendelson y colaboradores realizaron el primer reporte indirecto de *B. dendrobatidis* (Bd) en bosques nubosos de Purullá Baja Verapaz, en el 2004. Más recientemente, Sean Rovito determinó la presencia del patógeno en Guatemala por medio de métodos moleculares. En el 2010, el proyecto FODEYT 70-2009 realizó un estudio más extenso en tres departamentos, sin embargo ningún análisis molecular ha sido realizado dentro del país.

Se realizaron muestreos de anfibios en siete departamentos (Baja Verapaz, Chiquimula, Huehuetenango, Izabal, San Marcos, Suchitepéquez y Zacapa) desde agosto del 2010 a abril del 2011. El trabajo molecular se llevó a cabo en los laboratorios del departamento de Biología de la Universidad del Valle de Guatemala. Los análisis de detección se realizaron utilizando la técnica de *PCR* convencional, con los primers Bd1a y Bd2a. Se determinó que 16.67% de los individuos muestreados estaban infectados, siendo los género *Ptychohyla*, *Craugastor* y *Plectrohyla* los más afectados. Se llevó a cabo un modelo de la distribución potencial del hongo utilizando Maxent y variables climáticas de la base de datos WorldClim. Para realizar los mapas de modelos de distribución potencial se utilizó el programa DIVA GIS 7.3. Se determinó que las tierras altas del país (Sierras de Los Cuchumatanes, Sierra Madre Sur, Cadena Volcánica, Sierra de las Minas) son las más propensas al hongo debido a sus condiciones climáticas, mientras que las tierras bajas son las que tienen la probabilidad más baja de presencia del patógeno.

I. INTRODUCCIÓN

El declive de las poblaciones de anfibios es un problema de alcance global. Varias poblaciones alrededor del mundo han desaparecido debido a contaminación de hábitat, destrucción de bosques y calentamiento global. A estas amenazas se suma la enfermedad infecciosa emergente, quitridiomycosis. Esta es causada por un hongo patógeno, *Batrachochytrium dendrobatidis*, el cual crece en las partes queratinizadas de la piel de los anfibios. Se creía que el hongo los mataba a los individuos cubriendo la piel hasta asfixiarlos. Estudios recientes demuestran que al estar infectados, se da un desequilibrio en el nivel de electrolitos de sodio y cloro, lo que los lleva a un paro cardíaco (Voyles *et al.* 2009).

Los anfibios son un grupo muy importante para los ecosistemas, ya que forman parte esencial de cadenas tróficas y son depredadores de muchos insectos que son vectores de enfermedades humanas. La importancia de los anfibios no radica solamente en el nicho ecológico que cumplen, también son indicadores de contaminación y muchas sustancias médicas se han derivado a partir de sustancias secretadas por anfibios.

En el 2004, Joseph Mendelson III y colaboradores hicieron el primer reporte indirecto (renacuajos con partes bucales deformes) de *B. dendrobatidis* en bosques nubosos de Baja Verapaz. El Dr. Sean Rovito de la Universidad de Berkeley en California, ha realizado detecciones moleculares del patógeno en muestras de Guatemala. En el 2011 se ha detectado y diagnosticado en Guatemala por medio de la técnica *PCR* en tiempo real en tres departamentos: Zacapa, Baja Verapaz y San Marcos. Siendo los géneros *Ptychohyala*, y *Plectrohyla* los más afectados (Com pers. G Ruano 2011). Sin embargo ningún análisis molecular ha sido llevado a cabo dentro del país. Este estudio pretende dar información acerca del estado de las poblaciones de anfibios en diversas localidades de Guatemala, habiendo muestreado en Baja Verapaz, Chiquimula, Huehuetenango, Izabal San Marcos, Suchitepéquez y Zacapa.

A. ANTECEDENTES

1. Anfibios y su importancia. Los anfibios son componentes importantes dentro de los ecosistemas ya que pueden ser indicadores de cambios ambientales leves. Ciertas características de los anfibios como piel permeable (usado como un órgano respiratorio importante) los hace más sensibles a la contaminación del agua superficial y del manto freático, a cambios drásticos del clima, así como el aumento de la presencia de químicos en el ambiente y la radiación ultravioleta. Son los únicos tetrápodos que poseen un ciclo de vida bifásico y por ello son más sensibles a cualquier cambio ambiental, incluyendo terrestre o acuático. Por ello son organismos indicadores de la calidad de los ecosistemas (Lee, 2000).

Son el grupo animal más amenazado en la Tierra. Casi un tercio de las 6,485 especies de anfibios en el mundo se encuentran en peligro y por lo menos 150 especies han desaparecido en las últimas décadas. Las ranas adultas se alimentan de grandes cantidades de insectos, incluyendo vectores de enfermedades que pueden transmitir enfermedades fatales a los humanos (mosquitos de la malaria por ejemplo). Los anfibios también sirven como una importante fuente de alimento para una diversidad de depredadores, incluyendo peces, serpientes, aves y hasta monos. Por lo que su desaparición interrumpe las cadenas alimenticias y resulta en impactos negativos en los ecosistemas (Kriger 2009).

Muchas especies de ranas y salamandras requieren un hábitat apropiado tanto en ambientes acuáticos como terrestres y tienen una piel permeable que puede absorber fácilmente químicos tóxicos. La salud de las ranas es indicio de la salud de la biósfera como un todo (Kriger 2009). Los anuros son un grupo de especial importancia en los bosques nubosos dada su gran diversidad, y sobre todo su estrecha dependencia del húmedo y umbrío sotobosque de los Bosques Nubosos (Luna *et al.* 2001 *en* Hamilton 2001) permitiendo mayor actividad nocturna de los mismos (Joglar 1998 *en* Hamilton 2001). En los Bosques Nubosos de Sierra de las Minas se encontraron 35 especies de anfibios, 26 corresponden a anuros (Campbell *en* Pounds 2000 *en* Hamilton 2001).

Los anfibios han sobrevivido por 250 millones de años, habiendo sobrevivido incontables eras de hielo, impactos de asteroides y otras perturbaciones ambientales. Ahora un tercio de las especies de anfibios se encuentran en peligro de extinción. Esto debería servir como llamado de alerta de que estamos dañando drásticamente al ambiente (Kriger 2009).

Las ranas también han sido utilizadas en medicina. Estos animales producen una variedad de secreciones, muchas de las cuales tienen un potencial significativo para mejorar la salud humana por su uso como farmacéuticos. Aproximadamente 10% de los premios nobel en Fisiología y Medicina han resultado de investigaciones utilizando ranas. Cuando una especie de ranas desaparece, también lo hace la posibilidad de mejorar la medicina humana. Existen seis factores principales que afectan negativamente a los anfibios, y todos son consecuencias de la actividad humana: destrucción de hábitat, enfermedades infecciosas (quitridiomycosis), contaminación y pesticidas, cambio climático, especies invasoras y sobreexplotación para alimento y mascotas (Kriger 2009).

2. Quitridiomycosis, enfermedad infecciosa emergente. Una de las más grandes amenazas para las poblaciones de anfibios es la quitridiomycosis, la cual es una enfermedad infecciosa emergente en vida silvestre (Daszak *et al.* 2000 y Daszak *et al.* 1999 en Mazzoni 2003) causada por el hongo zoospórico, *Batrachochytrium dendrobatidis* (Daszak *et al.* 1999; Speare 1991 en Weldon *et al.* 2004). En vida silvestre, esta enfermedad puede ser capaz de causar pérdidas poblacionales catastróficas, a veces extinguiendo por completo poblaciones locales (Daszak *et al.* 1999 en Mazzoni 2003). El factor más importante que conduce a estas enfermedades en vida silvestre es la introducción antropogénica de patógenos a nuevas áreas geográficas (contaminación por patógeno) (Cunningham *et al.* 2003; Daszak *et al.* 2000; y Daszak *et al.* 2001 en Mazzoni *et al.* 2003).

Esta enfermedad fue descrita en 1998, y ahora ha sido detectada en por lo menos 385 especies de anfibios en 36 países. Fue propuesta como la causa de la muerte de poblaciones de ranas en los bosques nubosos de Australia y Panamá y fue

asociada con el declive de las poblaciones de ranas en América del Sur, Norte América, América Central, Nueva Zelanda, Europa y África (Kriger 2009 y Berger *et al.* 1998; Lips 1999; Bonaccorso *et al.* 2003; Bosh *et al.* 2000 *en* Weldon *et al.* 2004). Además es responsable de más de 100 extinciones de especies desde la década de los setenta (Kriger 2009).

En Mesoamérica, evidencia directa de declinación de anfibios por quitridiomycosis ha sido documentada en Panamá (Berger *et al.* 1998 *en* Mendelson *et al.* 2004), Costa Rica (Lips *et al.* 2003 *en* Mendelson *et al.* 2004) y México (Lips *et al.* 2004 *en* Mendelson *et al.* 2004). Evidencia indirecta de la enfermedad como partes de la boca de renacuajos perdidas o deformadas (Feliars *et al.* 2001 *en* Mendelson *et al.* 2004) ha sido reportada para Guatemala (Mendelson *et al.* 2004) y Honduras (McCranie y Wilson 2002 *en* Mendelson *et al.* 2004). Mendelson III y su equipo encontraron renacuajos muertos en un sitio de Sierra de las Minas, además reportaron observaciones a largo plazo de la declinación de ranas en un bosque húmedo de montaña en Purulhá, Baja Verapaz. En el 2010 y 2011 la quitridiomycosis ha sido detectada y diagnosticada por medio de la técnica PCR en tiempo real en tres departamentos: Zacapa, Baja Verapaz y San Marcos. Los géneros *Ptychohyala* y *Plectrohyla* los más afectados (Com pers G. Ruano 2011). Cheng *et al.* (2011) reportaron datos positivos en anfibios preservados que datan de 1994, no se cuentan con colectas anteriores debido al conflicto armado. Sin embargo, se cree que el hongo se encuentra en Guatemala desde la década de los ochenta, ya que se ha reportado en México desde los setentas y en Costa Rica a finales de los ochenta.

Se hipotetiza que el origen de la quitridiomycosis se dio en Sudáfrica, siendo portadores *Xenopus laevis*, *Afrana fuscigula* y *Strongylopus grayii* (Weldon 2002; Hopkins y Channing 2003; Lane y Weldon 2003 *en* Weldon 2004). Su dispersión global desde este continente se dio por la especie de la rana de uñas, *Xenopus laevis*. Luego de que en 1934 se desarrollara una prueba para embarazos humanos basados en ésta especie (Hey 1986 *en* Weldon 2004), enormes cantidades fueron capturados en el Sur de África y exportados alrededor del mundo. La prueba se basa en el principio de que la ovulación de *X. laevis* se inducía por la orina de las mujeres embarazadas, debido a los

altos niveles de la hormona gonadotropina (Hogben *et al.* 1931; Shapiro y Zwarenstein 1934 *en* Weldon 2004). Desde entonces el comercio global de esta especie fue masivo. Después de la introducción de pruebas de embarazo no biológicas, *X. laevis* se convirtió en un modelo importante para el estudio científico de inmunología, embriología y biología molecular (Weldon 2004). *X. laevis* ha sido utilizada para investigar mecanismos de amplexo, debido a que es fácil mantenerla en cautiverio (Shapiro 1936 *en* Weldon 2004).

La repentina aparición de la quitridiomycosis se debe a que *B. dendrobatidis* fue introducido recientemente en nuevas regiones infectando a nuevos hospederos (Daszak *et al.* 1999 *en* Weldon *et al.* 2004). La dispersión de *B. dendrobatidis* entre países se debe al transporte global de anfibios (Mazzoni *et al.* 2003; y Daszak *et al.* 1999; Speare 1991; Berger *et al.* 1999; Mutschmann, *et al.* 2000; *en* Weldon 2004). En el país al que llegaban las ranas, se escapaban y entraban en contacto con las poblaciones nativas dispersando la enfermedad (Weldon 2004). Otra forma de contagio se dio cuando agua en la que habitaban las ranas infectadas entraba en contacto con especies locales (Johnson y Speare 2003 *en* Weldon 2004).

A pesar de que *X. laevis* es la principal causante de la dispersión de *B. dendrobatidis* fuera de África, otras especies han distribuido el hongo entre y dentro de los países fuera del continente africano. La rana toro *Lithobates catesbeianus* ha sido propuesta como un importante vector, sobretodo por el comercio internacional como alimento, pero también entre países cuando individuos de las poblaciones comerciales han escapado y se han convertido en especies exóticas invasoras (Mazooni 2003 *en* Weldon 2004). La evidencia más antigua de ocurrencia de quitridiomycosis en *L. catesbeianus* es en 1978 en Carolina del Sur (Tinsley y McCoid 1996 *en* Weldon 2004), cuarenta años después de la primera evidencia encontrada en el Sur de África, pero los detalles en cuanto a qué tan intensa fue la búsqueda no están disponibles (Weldon 2004). La transmisión global de quitridiomycosis involucra una serie de pasos según Weldon (2004):

- La ocurrencia de *B. dendrobatidis* en un anfibio vector en el Sur de África, que es relativamente tolerante a la enfermedad (*X. laevis*).

- Aumento repentino de la tasa de exportación en 1935 de este vector debido a los avances tecnológicos (prueba de embarazo de *Xenopus*).
- Establecimiento del patógeno por medio de *Xenopus* exportadas a nuevos sitios en otros países (posiblemente llegó a algunos países por el establecimiento de poblaciones ferales de *X. laevis*).
- La transmisión a otros anfibios vectores (alimento y comercio de mascotas), y
- La sucesiva transmisión a otros países por diferentes rutas de comercio de estos vectores clave que se mueven en grandes números, se establecen en poblaciones comerciales e interactúan cercanamente con ranas silvestres, lo cual lleva a poblaciones ferales (*R. catesbeiana* como alimento). La dispersión por poblaciones de anfibios nativos ocurrió en algún punto después de que *B. dendrobatidis* llegara a un sitio nuevo.

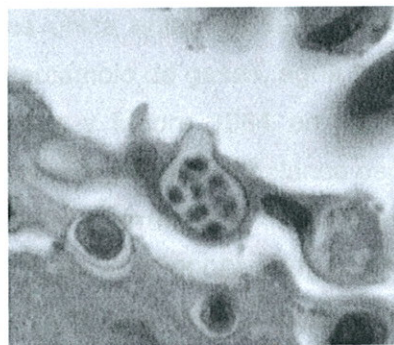
A pesar de todas las hipótesis del origen africano, estudios recientes realizados en Japón (Goka *et al.* 2009) podrían indicar que el origen del patógeno es asiático. En Japón se identificaron 26 haplotipos de la región ITS1-5.8S-ITS2 de *B. dendrobatidis*, además especies de anfibios como (*Andrias japonicus*) que presentan tolerancia al patógeno e incluso están infectadas con cepas únicas para la especie. Goka *et al.* 2009 encontraron especímenes de 1902 de *A. japonicus* fijados en formalina infectados con *B. dendrobatidis*. En general la prevalencia de quitridiomycosis es baja así como los niveles de zoosporas en individuos infectados. Se cree que el hongo puede llegar a ser endémico y comparte una historia evolutiva con especies nativas (Goka *et al.* 2009; Fisher 2009; Swei 2011).

3. Patología. La patología de la quitridiomycosis ha sido difícil de determinar porque las infecciones cutáneas por hongos son raramente fatales sin la ayuda de otros factores (Schaechter *et al.* 1998 en Voyles *et al.* 2009). Además, *B. dendrobatidis* se encuentra en un filo de hongos que no se conocía como patógeno de vertebrados (Longcore *et al.* 1999 en Voyles *et al.* 2009). Este hongo se encuentra confinado a las capas superficiales de la epidermis (Castro y Bolker 2005 y Berger 2005 en Voyles *et al.* 2009) con reacción mínima por parte del hospedero y sin cambios patológicos consistentes detectables bajo el microscopio de luz en órganos internos de anfibios

infectados (Berger *et al* 1998; Voyles *et al.* 2009). El análisis de la expresión diferencial de los genes de peptidasa sugieren que la patogenicidad puede tener bases genéticas (Rosenblum *et al.* 2008 *en* Voyles *et al.* 2009), sin embargo el determinar la causa de muerte ha sido difícil debido a que múltiples sistemas fisiológicos fallan antes de la muerte (Voyles *et al.* 2009).

En los anfibios adultos *B. dendrobatidis* coloniza solamente las células queratinizadas de la piel (Figura 1) y usualmente se puede encontrar en parches aislados en la parte ventral del animal, infectando mayormente la parte cercana a la ingle y la membrana interdigital de las extremidades posteriores (Longcore *et al.* 1999; Pessier *et al.* 1999 *en* Annis *et al.* 2004). Los animales infectados pueden tener infección en las superficies tanto ventral como dorsal (Parker *et al.* 2002 *en* Annis *et al.* 2004).

Figura 1
Zoosporangio de *B. dendrobatidis* en piel de *Leptodactylus*.



(Fotografía proporcionada por Dr. Allan Pessier del Zoológico del Laboratorio de enfermedades de anfibios del Zoológico de San Diego).

Se han encontrado esporangios en el estrato córneo y estrato granuloso de la epidermis, principalmente de los dedos y parte ventral del cuerpo, especialmente el parche pélvico hipervascularizado. Los cambios epidérmicos asociados a estos patógenos consisten en pérdida celular irregular, erosiones y segmentos de engrosamiento del *stratum corneum* (hiperqueratosis). Se encontraron cambios epidérmicos más profundos, que consistían en hiperplasia moderada del estrato intermedio (acantosis), sin embargo, no se encontraron infiltrados celulares típicos en

inflamaciones. También se han encontrado esporangios en las partes queratinizadas de la boca de renacuajos (Berger *et al.* 1998).

Algunos signos clínicos típicos de la infección en los adultos son la muda excesiva de la piel y la hiperemia (enrojecimiento) de la piel pálida. Los dedos normalmente son los primeros afectados. En renacuajos, la queratina del área bucal puede presentar deformaciones. No obstante, en varios brotes epidémicos, la muerte súbita ha sido la única manifestación clínica observada. Es muy probable que toda la sintomatología esté relacionada con alteraciones en la regulación osmótica de la piel, aunque la invasión de otros agentes secundarios también pudiera ocurrir en algunos casos (Angulo *et al.* 2006). La hiperplasia epidérmica puede causar serios problemas de respiración cutánea y osmorregulación debido a que este tipo de hongos infectan el parche pélvico, el cual es un sitio de absorción de agua en algunos anuros (Parson 1994 *en* Berger *et al.* 1998).

La piel de los anfibios es única entre los vertebrados terrestres porque está activamente involucrada en el intercambio de gases, agua y electrolitos (Heatwole *et al.* 1994; Boutilier *et al.* 1992; Deyrup y Moore 1964 *en* Voyles *et al.* 2009; Wright y Whitaker 2001). Debido a su papel en mantener el balance osmótico, otros estudios han sugerido que *B. dendrobatidis* puede interrumpir la osmorregulación cutánea (Berger *et al.* 1998; Voyles *et al.* 2007 *en* Voyles *et al.* 2009). Para mantener el balance osmótico, los anfibios deben mantener un ambiente interno hiperosmótico, comparado con el ambiente externo. Esto se logra gracias a una regulación en la absorción de electrolitos por la epidermis, que involucra a los canales de sodio y la bomba de Na^+/K^+ (Heatwole, 1994; Boutilier *et al.* 1992; Deyrup 1964 *en* Voyles *et al.* 2009; Wright y Whitaker 2001).

La infección por *B. dendrobatidis* predominantemente inhibe la absorción de sodio. Se ha encontrado que la respuesta a carbacol, que activa la secreción de cloro en la piel (Alvarado *et al.* 1995 *en* Voyles *et al.* 2009), y la respuesta a noradrenalina, que estimula la absorción de sodio y secreción de cloro (Castillo *et al.* 1997 *en* Voyles *et al.* 2009), indica una reducción en la actividad del canal de sodio y cloro en la piel de ranas enfermas. Los mecanismos bioquímicos de la interrupción de los canales son

desconocidos, pero se cree que se puede deber a la secreción de una toxina del hongo o daño directo a las células infectadas del hospedero. Estos resultados demuestran que *B. dendrobatidis* compromete el transporte de electrolitos, y por lo tanto, la función osmorreguladora de la piel (Voyles *et al.* 2009).

Se ha encontrado que se dan cambios mayores en las concentraciones de electrolitos en el plasma sanguíneo. Las concentraciones de sodio y potasio en el plasma son significativamente menores en las ranas enfermas. Además, se ha comprobado que existe una correlación negativa entre la intensidad de la infección y el cambio en las concentraciones de estos dos electrolitos en el plasma. Varias horas antes de la muerte, la actividad cardíaca de individuos severamente enfermos muestra patrones asociados a paro cardíaco o ritmo cardíaco asistólico en otros organismos incluyendo humanos (Paradis *et al.* 1996 *en* Voyles *et al.* 2009). El ritmo cardíaco asistólico ocurre cuando anomalías eléctricas causan que haya fallas en la contracción de corazón, flujo sanguíneo reducido, colapso circulatorio y por ende la muerte (Paradis *et al.* 1996 *en* Voyles *et al.* 2009). Se cree que en los anfibios la causa del ritmo cardíaco asistólico se debe a cambios en los electrolitos y/o acidosis (Voyles *et al.* 2009).

La enfermedad ha sido tratada con éxito en dendrobatidos bañando a las ranas moribundas por cinco minutos cada día, durante 11 días, con una suspensión de itraconazol al 0.01% en solución salina al 0.6%. Como la infección es superficial también se ha recomendado aplicar una pomada cutánea de itraconazol. Se han reportado otros hongos, como el *Cladosporium* sp. en *Rhinella marina*, los que pueden causar una dermatitis micótica (Wright y Whitaker 2001).

El diagnóstico de la enfermedad se ha realizado por histopatología de los tejidos afectados. En anfibios vivos se han usado dedos cortados y raspados de piel. El hongo puede también ser detectado utilizando técnicas de amplificación de fragmentos de ADN (reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, por sus siglas en inglés) de exudados de piel (Angulo *et al.* 2006). En el 2004 Boyle y colaboradores estandarizaron la detección por medio de PCR en tiempo real, la cual es la más utilizada actualmente.

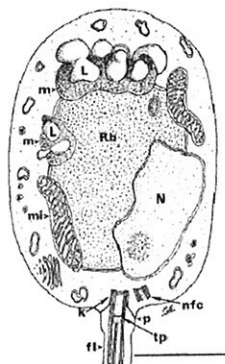
Sin embargo Goka *et al.* 2009 utilizó PCR anidado y concluye que los resultados son más confiables que los de PCR en tiempo real.

4. Descripción de *B. dendrobatidis*. Los miembros del filo Chytridiomycota son hongos heterotróficos omnipresentes y cosmopolitas (Sparrow 1960; Karling 1977 en Berger *et al.* 1998). Se encuentran principalmente en el suelo y agua donde actúan como saprófitos primarios, utilizando sustratos como quitina, detritos de plantas y queratina. Algunos géneros son anaerobios facultativos u obligados, y pueden ser parásitos obligatorios de hongos, algas, plantas vasculares, rotíferos, nemátodos o insectos. *B. dendrobatidis* es la primera especie del filo, parásita de vertebrados (Barr 1990 en Berger *et al.* 1998).

El hongo presenta un talo que soporta una red de rizoides y un esporangio con pared suave y forma esférica a subesférica. Cada esporangio produce un solo tubo de descarga. Las zoosporas presentan un cuerpo elongado-ovoide y un flagelo posterior. Además tienen un área central de ribosomas que usualmente se presentan como esferas de ribosomas unidas a la membrana entre la masa ribosomal principal (Berger *et al.* 1998).

El área central del ribosoma está rodeada por una cisterna simple de retículo endoplasmático, dos a tres mitocondrias y un microcuerpo extenso (complejo globular de lípidos). El microcuerpo se encuentra rodeado por cuatro a seis glóbulos de lípidos (tres anteriores y tres laterales), algunos parecen unidos a una cisterna (Ver Figura 2) (Berger *et al.* 1998).

Figura 2
 Ilustración de la sección longitudinal de la zoospora del parásito quitridio encontrado en la epidermis de anfibios australianos y panameños



El dibujo se basó en el estudio de secciones delgadas de zoosporas dentro del esporangio. No se utilizaron especímenes fijados en glutaraldehído. Por esa razón no se observan bien algunas regiones del kinetosoma. El complejo de microcuerpo - glóbulos lipídicos y algunos detalles del anclamiento del flagelo se pueden observar. En algunas secciones pareciera que dos complejos microcuerpo-glóbulos lipídicos estuvieran presentes, pero no se sabe si esto representa un complejo simple enrollado alrededor de una región ribosómica. La sección transversal y longitudinal del flagelo está dibujado un poco más grande que la escala para demostrar adecuadamente los aspectos del anclamiento del flagelo. Rb: área ribosómica; N: núcleo; L: glóbulo lipídico; m: microcuerpo; mi: mitocondria; k: kinetosoma; p: anclamiento del kinetosoma al plasmalemma; tp: plato terminal; nfc: centriolo no funcional; fl: flagelo. (Bar=1 μ l) (Berger *et al.* 1998).

5. Modelos de distribución de especie. Los modelos de distribución de especies (SDM: *species distribution models*, en inglés) son modelos empíricos que determinan la presencia de una especie utilizando variables ambientales que afectan su supervivencia. Pueden ser utilizados para resolver muchos problemas ecológicos y ambientales teóricos y prácticos, como probar hipótesis biogeográficas, ecológicas y

evolutivas, invasión de especies, efectos del cambio climático y para planificación y selección de áreas de reserva para la conservación (Lui *et al.* 2009).

El modelo de nicho ecológico Maxent es un modelo estadístico, basado en la “teoría de la máxima entropía”. Es una herramienta para realizar predicciones o inferencias a partir de información incompleta, es decir, cuando no se tienen datos de ausencia verificados luego de realizar un muestreo, sino un grupo de ocurrencia o presencia conocidos (Phillips y Dudik, 2008). El modelo emplea un algoritmo determinístico para estimar la probabilidad de distribución más apropiada. En general, este algoritmo detecta las relaciones no aleatorias entre dos conjuntos de datos: a) los registros georreferenciados de la presencia de las especies, y b) un conjunto de coberturas tipo raster, de datos digitales que representan a las variables físico-químicas potencialmente pertinentes para determinar la distribución de las especies en una escala particular de análisis (Phillips *et al.* 2006).

Maxent ofrece muchas ventajas, entre ellas: (1) requiere solamente datos de presencia, junto con información ambiental del área de estudio; (2) utiliza datos categóricos y continuos y se pueden incorporar interacciones entre diferentes variables; (3) se generan algoritmos eficientes que garantizan la óptima (máxima entropía) probabilidad de distribución; (4) los resultados son continuos, permitiendo hacer distinciones pequeñas entre las diferentes áreas del modelo; (5) Maxent también puede ser utilizado con datos de presencia/ausencia utilizando modelos condicionales (Phillips *et al.* 2006). Además estos programas son de libre acceso y pueden ser descargados en línea.

6. Sistema de áreas protegidas, SIGAP. Las áreas protegidas son las que tienen por objeto la conservación, el manejo racional y la restauración de la flora y fauna silvestre, recursos conexos y sus interacciones naturales y culturales, que tengan alta significación por su función o sus valores genéricos, históricos, escénicos, recreativos, arqueológicos y protectores; para de preservar el estado natural de las comunidades bióticas, de los fenómenos geomorfológicos únicos, de las fuentes y suministros de

agua, de las cuencas críticas de los ríos, de las zonas protectoras de los suelos agrícolas, y así mantener opciones de desarrollo sostenible (CONAP 2011).

Sistema guatemalteco de Áreas Protegidas (SIGAP de aquí en adelante) es el conjunto de todas las áreas protegidas del país y las entidades que las administran. Fue creado para lograr los objetivos de conservación, rehabilitación y protección de la diversidad biológica y los recursos naturales del país. Actualmente, el SIGAP está conformado por 219 áreas protegidas localizadas en el territorio nacional (CONAP 2011).

El SIGAP tiene como metas fundamentales lograr la representatividad de las distintas comunidades naturales; mantener los procesos ecológicos y evolutivos que crean y soportan la diversidad biológica; mantener poblaciones viables de especies; conservar grandes áreas de hábitat naturales que puedan responder a perturbaciones de gran escala y largo plazo; y garantizar a las poblaciones humanas el mantenimiento de legados culturales y los bienes y servicios esenciales para su vida (Corrales 1998 *en* Corral 2004).

B. JUSTIFICACIÓN

Los anfibios están desapareciendo rápidamente debido a pérdida de hábitat, comercio y enfermedades. Es necesario comenzar a tomar medidas de conservación para asegurar la sobrevivencia de las poblaciones. Estos animales también son muy útiles para el ser humano, ya que son depredadores de vectores de enfermedades (como mosquitos) (Krieger 2009). Muchas especies secretan compuestos que pueden ser utilizados en medicina. Cada vez que se pierde una especie se pierde una oportunidad de curar alguna enfermedad. Por ejemplo *Rheobatrachus silus*, es una rana extinta, cuyos compuestos del sistema digestivo pudieron haber sido utilizados para curar la gastritis (Tyler *et al.* 1983).

La importancia de este estudio radica en la conservación de estos organismos, así como en la creación de programas de prevención de esparcimiento del patógeno a nuevos hábitats. En Guatemala existen ciento cuarenta y tres especies de anfibios,

distribuidos en tres órdenes, diez familias y treinta y seis géneros. Son el grupo con mayor número de especies endémicas nacionales con cuarenta y cinco especies (veinticinco especies de ranas, diecinueve de salamandras y un sapo) (Acevedo 2006). Según la lista de CONAP (2001) de especies amenazadas de extinción hay cincuenta y dos especies de Anura amenazados. Es necesario contar con información de las especies portadoras para el país, para tener conocimiento de qué especies pueden llegar a ser solamente portadoras asintomáticas, como *Plectrohya matudai* (Amphibia web 2011) o pueden llegar a sufrir la infección hasta la etapa letal.

Es necesario conocer qué poblaciones están siendo afectadas y cómo evitar que el patógeno se extienda a nuevas localidades. Debido a que no se pueden tomar medidas de erradicación del hongo en un área en la que ya se haya establecido es importante la creación de programas de prevención de dispersión.

C. Objetivos del proyecto

1. Objetivo general:

- Determinar la presencia del hongo *Batrachochytridium dendrobatidis* en poblaciones de anfibios de los órdenes Anura y Caudata en diversas localidades de Guatemala.

2. Objetivos específicos

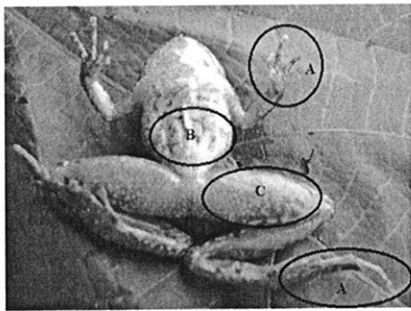
- Generar un modelo de distribución potencial de *B. dendrobatidis* en Guatemala con base a datos de presencia del mismo.
- Analizar la amenaza que *B. dendrobatidis* representa para las poblaciones de anfibios presentes dentro del SIGAP.
- Recomendar medidas de prevención de esparcimiento del patógeno a nuevas localidades.

II. MÉTODOS

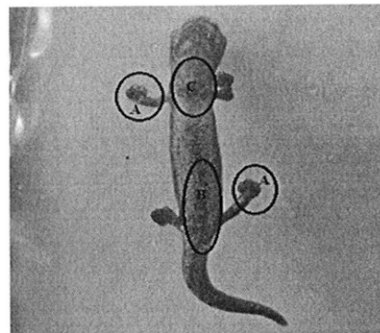
A. TRABAJO DE CAMPO

Se realizaron muestreos en los siguientes departamentos: Baja Verapaz, Chiquimula, Huehuetenango, Izabal, San Marcos, Suchitepéquez y Zacapa (Figura 4). En cada localidad (apéndice B) se realizaron muestreos por el método de relevamiento de encuentros visuales (por sus siglas en inglés VES, visual encounter survey). Este método consiste en ir realizando colectas libres de los organismos que se van encontrando en el lugar. Cada individuo fue manipulado utilizando guantes de látex para evitar infectar a individuos sanos. Las colectas se colocaron en bolsas plásticas y se les asignó un código. Se tomaron los datos de microhábitat y hora de cada colecta. Se realizó la toma de muestra por medio de la técnica de hisopado (swabbing en inglés) (Brem *et al.* 2007), la cual consiste en pasar un hisopo estéril por las extremidades, abdomen e ingle (ranas) y parte gular en el caso de las salamandras, ya que son las partes donde se ha registrado hay mayor susceptibilidad por el hongo (Brem *et al.* 2007; Longcore *et al.* 1999; Pessier *et al.* 1999 en Annis *et al.* 2004). Se pasó el hisopo cinco veces en cada parte mencionada y diez veces en el caso de la parte gular en las salamandras (Figura 3).

Figura 3
Fotografías de campo
Partes de los anfibios que fueron “hisopeadas”
para la toma de muestra. a. *Craugastor* de la Trinidad, San Marcos



L. García 2011



A. Zamora 2011

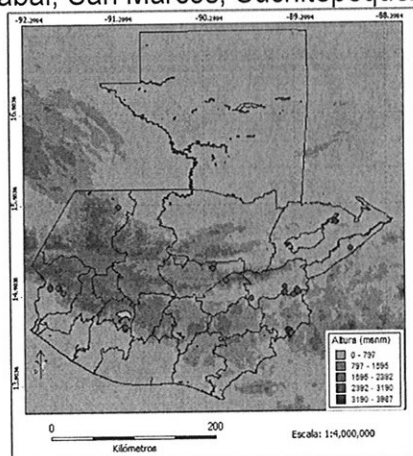
La toma de muestras se llevó a cabo utilizando guantes de látex los cuales se cambiaron entre individuos. A cada muestra se le agregó una gota de etanol al 95%, se dejó secando al aire libre, y se almacenó el hisopo en tubos de 1.2 ml rompiendo el mango contra la pared del tubo. En el campo las muestras fueron transportadas en hieleras con hielo, al llegar a la ciudad se trasladaron al refrigerador -20°C , del laboratorio C-212 de la Universidad del Valle de Guatemala, para evitar la degradación del ADN. Luego de cada toma de muestra, los guantes utilizados, basura de los hisopos y cualquier material involucrado fue desechado en bolsas plásticas bien rotuladas. Éstas fueron descartadas en contenedores de ECOTERMO para su adecuado manejo.

Se clasificó cada individuo utilizando guías de campo para la región. Los individuos que no se pudieron clasificar o que fueron utilizados para estudios sanguíneos de otro proyecto fueron sacrificados utilizando Cloretone y fijados con formol. Estos individuos forman parte de la colección de referencia del Museo de Historia Natural de la Universidad de San Carlos de Guatemala (MUSHNAT).

Antes de entrar y salir de las localidades muestreadas se lavaron las botas de los investigadores con una solución de cloro al 1% (Speare *et al.* 2004) a partir de una solución de cloro comercial (5.25%) para evitar la propagación del patógeno.

Figura 4

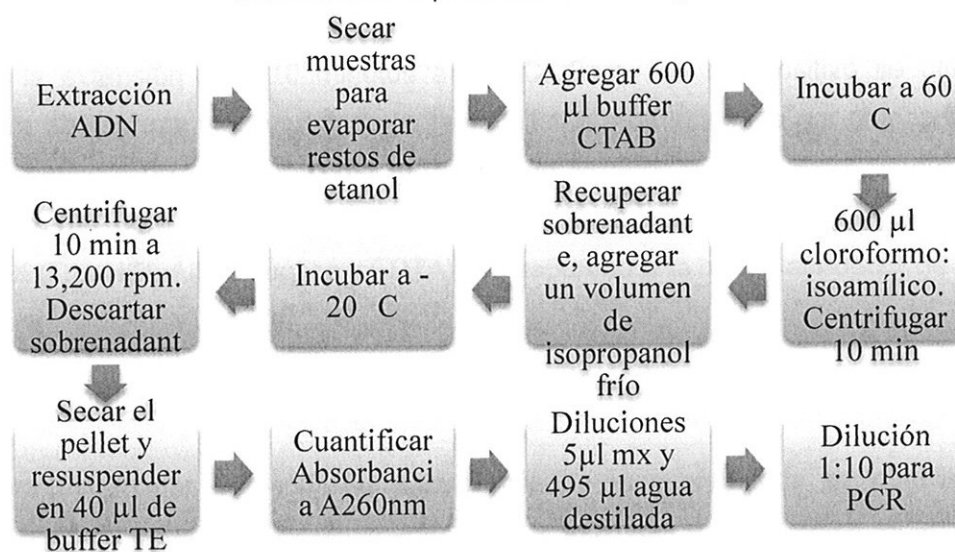
Mapa con las localidades muestreadas durante el estudio. Los departamentos muestreados fueron: Baja Verapaz, Chiquimula, Huehuetenango, Izabal, San Marcos, Suchitepéquez y Zacapa.



B. Extracción y cuantificación de ADN

Figura 5

Diagrama de flujo de la extracción y cuantificación de ADN. La extracción es una modificación al protocolo de Zolan y Puk



kila (1986). Ver apéndice F.

C. PROCEDIMIENTO REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Cuadro 1

Receta de Master Mix para PCR para detección de *B. dendrobatidis*

Reactivo	[Final]	Volumen n=1
Agua	----	13.5 ul
Buffer 10X	1X	2.5 ul
MgCl ₂ 25 mM	1 mM	1 ul
dNTPs 2.5 mM	0.2 mM	1.25 ul
Bd 1a* 25 uM	1 uM	0.75 ul
Bd 2a* 25 uM	1 uM	0.75 ul
BSA 10mg/mL	400pg/UL	1 ul
Taq Pol 5U/ml	1 U	0.2 ul
ADN	----	4 ul
Total		25 ul

* Bd1a: 5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3';
Bd2a: 5'-CATGGT TCATATCTGTCCAG-3'.

Se utilizó BSA para evitar la inhibición de la actividad polimerasa con posibles contaminantes como ADN de otros organismos, como el proveniente de los individuos muestreados y partículas del suelo (Garland *et al.* 2011). Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: Desnaturalización: 10 min a 93 °C; 35 ciclos: 45 segundos a 93 °C, 45 segundos a 60 C (Tm de Bd1a y Bd2a) y 1 minuto a 72 °C por último la extensión final 10 minutos a 72 °C. Como control positivo se utilizó una muestra de esporas inactivadas de la cepa JEL423 proporcionada por el laboratorio de la Dra Loncore de la Universidad de Maine en Estados Unidos. Para determinar los resultados se corrieron geles de agarosa al 2% (0.60 g de agarosa y 30 mL de buffer TAE 1X (Tris-HCl, Ácido acético y EDTA). Se esperaba una banda alrededor de 300 pb.

D. ANÁLISIS DE DATOS

Para determinar qué individuos están siendo más afectados se obtuvieron los porcentajes de enfermos por especie y por localidad. Se determinó cuál es la localidad más afectada y las posibles causas de la incidencia (condiciones climáticas, contaminación, invasión del hombre).

Con ayuda del programa Diva Gis 7.3 se georeferenciaron los puntos de las localidades con individuos positivos. La modelación de distribución potencial de *B. dendrobatidis* en el país se llevó a cabo con el programa Maxent 3.3.3 (Phillips *et al.* 2006). Se utilizaron las variables climáticas de la base de datos Worldclim (resolución 2.5 min = ~5 kms): Temperatura media anual, rango de temperatura diurna, cambio de temperatura a lo largo de la temporada, temperatura máxima del mes más tibio, temperatura mínima de mes más frío, precipitación anual, precipitación de mes más húmedo, precipitación de mes más seco y cambio de la precipitación a lo largo de la temporada. Se escogieron estas variables en base a los requerimientos del patógeno para sobrevivir. El programa se corrió con los siguientes parámetros: 1000 iteraciones bootstrap como máximo, 75% de los datos fueron utilizados como puntos de entrenamiento (training points) y el 25 % como puntos de validación (test points).

Se corrieron 100 replicas del modelo, de las cuales se escogieron los 10 mejores modelos dependiendo del valor del área bajo la curva (AUC) donde se observó la capacidad de discriminación de una presencia (sensibilidad) versus la capacidad de discriminar una ausencia (especificidad) (Phillips y Dudik 2008). De estos 10 modelos se determinó la media del valor de probabilidad de prevalencia de 0 a 1 para cada píxel y este fue el valor final asignado a los píxeles del modelo final.

El modelo final fue editado en Diva Gis 7.3 se utilizó una capa con datos de las áreas protegidas para determinar el impacto que el patógeno puede llegar a tener en estas y de esta forma tomar medidas de prevención para evitar su dispersión.

III. RESULTADOS

Se obtuvo un resultado positivo para *B. dendrobatidis* en 16.67% de los individuos, siendo los géneros *Ptychohyla* y *Craugastor* los que presentaron el mayor número de individuos portadores. *Pt. hypomykter*, *Pt. salvadorensis* y *C. rhodophis* fueron las especies con mayor número de individuos positivos, cuatro individuos para la primera (Zacapa y Baja Verapaz), tres individuos para la segunda (Chiquimula) y tres individuos para la última especie (Suchitepéquez). Otras especies portadoras fueron: *Bolitoglossa dunnii*, *B. heireias*, *Craugastor bocourti*, *C. lineatus*, *Craugastor sp.* *Engystomops pustulosus*, *Lithobates maculatus*, *Plectrohyla matudai*, *Pt. euthysanota* y *Smilisca baudinii* (apéndice A). La familia más afectada fue Hylidae con 13 individuos, seguida por Craugastoridae con 6 individuos (Cuadro 2). Otras familias positivas para *B. dendrobatidis* fueron Plethodontidae, Leptodactylidae y Ranidae. Las especies: *B. dunnii*, *C. rhodopis*, *C. lineatus*, *E. pustulosus*, *L. maculatus*, *Pt. euthysanota*, *Pt. salvadorensis* y *S. baudinii* son nuevos reportes de especies positivas para Guatemala. Con excepción de *Pt. euthysanota* y *S. baudinii* estas especies también son nuevos reportes en general.

Cuadro 2
Resultados de los análisis de *B. dendrobatidis* por familia

Familia	Género	Colectadas	Positivas
Bufonidae	<i>Incilius</i>	1	0
Centrolenidae	<i>Hyalinobatrachyum</i>	2	0
Craugastoridae	<i>Craugastor</i>	41	6
Hylidae	<i>Dendropsophus</i>	1	0
	<i>Plectrohyla</i>	25	2
	<i>Ptychohyla</i>	28	9
	<i>Smilisca</i>	4	2
	<i>Tlalochohyla</i>	2	0
Leptodactylidae	<i>Engystomops</i>	2	2
Microhylidae	<i>Hypopachus</i>	2	0
Plethodontidae	<i>Bolitoglossa</i>	21	2
	<i>Cryptotriton</i>	1	0
	<i>Oedipina</i>	2	0
Ranidae	<i>Lithobates</i>	12	1
Total		144	24

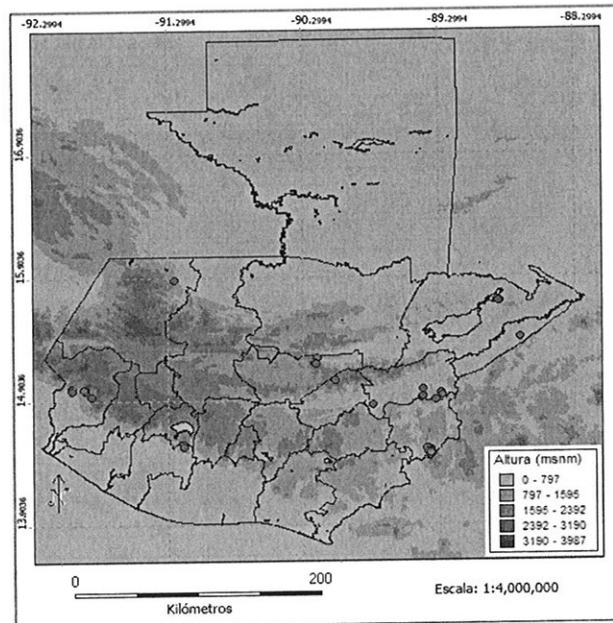
Debido a que no se pudo contar con un número de muestra significativo en todas las localidades, así como por cada una de las especies muestreadas no se puede determinar una prevalencia real para todas las especies. En el caso de los géneros con tamaños de muestra mayor a 25 se determinó que *Ptychohyla* tiene la mayor prevalencia con 32.14% de los individuos positivos, seguido por *Craugastor* con 14.63% de positivos y por último *Plectrohyla* con un porcentaje de 8% (Figura 10 en apéndice B).

Por departamento se obtuvieron los siguientes resultados positivos: 5 individuos en Baja Verapaz; 5 individuos en Suchitepéquez; 5 individuos positivos en Zacapa; 4 individuos en Chiquimula; 4 individuos en San Marcos; 1 individuo en Izabal y ningún individuo para Huehuetenango (Figura 6).

Con base en las muestras obtenidas por localidad y el número de individuos positivos, Suchitepéquez fue el departamento en el que se encontró un mayor número de individuos positivos con el 35.71% de individuos portadores. De estos tres pertenecían a la especie *C. rhodphis* y dos a *Pt. euthysanota*. El segundo departamento más afectado fue Baja Verapaz con 23.81% de individuos afectados (un *C. bocourti*, un *C. lineatus* y tres *Pt. hypomykter*). En este caso los individuos afectados pertenecen a cuatro localidades: Piedras Quebradas Chilascó, Biotopo del Quetzal y Río El Cafetal. Le sigue Chiquimula (19%) con dos especies infectadas: una *B. heiroreias* y tres *Pt. salvadorensis* estas pertenecen a tres localidades: El Musgal y Plan de la Arada en Aldea Santa Rosalía y Finca Río Frío. En el caso de San Marcos se encontró que 16% de las colectas de dos localidades (La Trinidad, Tajumulco y Caserío Nuevo San Francisco) estaban infectadas, dos *P. matudai*, un *Craugastor* y una *L. maculatus*. En Zacapa 15.63% de los individuos estaban infectados en dos localidades: Finca Bella Vista en Montañas las Granadillas y Bosque Municipal de la Unión, las especies infectadas fueron: una *Pt. hypomykter*, dos *E. pustulosus* y dos *S. baudini*. En Izabal solamente se encontró una *B. dunni* positiva para Sierra Caral y en Huehuetenango no se encontró ningún individuo positivo (Figura 10 en apéndice B).

Figura 6

Mapa con las localidades muestreadas.
Los puntos rojos son las localidades en las que se determinó la presencia de *B. dendrobatidis*.



Se hizo un modelo de la distribución potencial del hongo (Figura 7) utilizando el programa Maxent 3.3.3 (Phillips *et al.* 2006) y variables ambientales de la base de datos Worldclim. Para escoger el modelo que predice la distribución del hongo se seleccionaron los 10 modelos con el mejor AUC (área bajo la curva), el estuvo entre 0.9987 y 0.9982. Los valores de AUC de todas las réplicas variaron entre 0.9987 y 0.9922. A partir de estas capas se obtuvo la media por pixel y 5 rangos de probabilidad de presencia del hongo siendo estos los siguientes: Muy alta: 0.7716 a 1.000; Alta: 0.5788 a 0.7716; Media: 0.3861 a 0.5788; Baja 0.1934 a 0.3861 y Muy baja: 0.1934 a 0.000. Las variables climáticas con mayor porcentaje de contribución al modelo (cuadro 4) fueron: el cambio de la temperatura durante la temporada con un 53.08% , seguida por la precipitación del mes más seco y la temperatura máxima del mes más tibio con 11.89% y 11.14% respectivamente.

Cuadro 3
Porcentaje de contribución al modelo de las variables climáticas

VARIABLES CLIMÁTICAS	Porcentaje de contribución %
Cambio de la temperatura durante la temporada	53.08
Precipitación del mes más seco	11.89
Temperatura máxima del mes más tibio	11.14
Precipitación del mes más húmedo	9.45
Media de la temperatura anual	3.8
Temperatura mínima del mes más frío	3.34
Media mensual del rango de temperatura diurno	2.95
Precipitación anual	2.2
Cambio de la precipitación durante la temporada	2.08

Figura 7
Modelo de la distribución potencial de *B. dendrobatidis* en Guatemala.

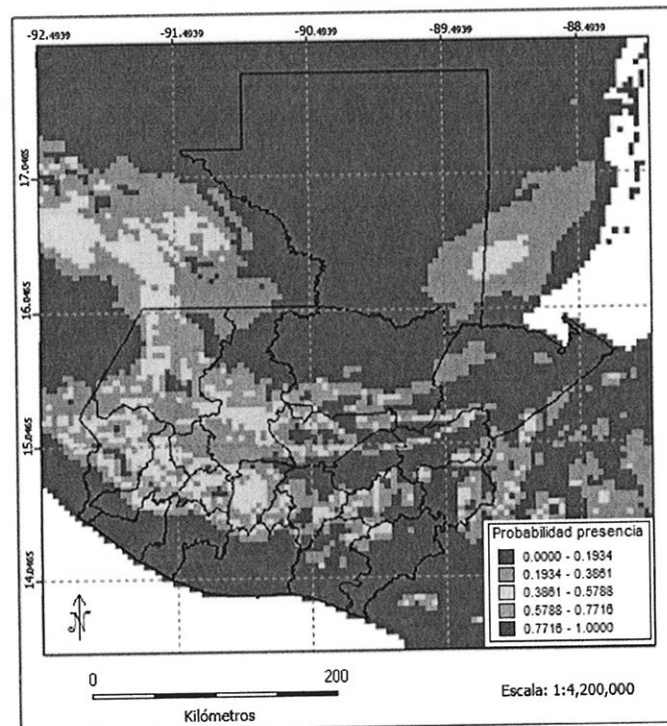
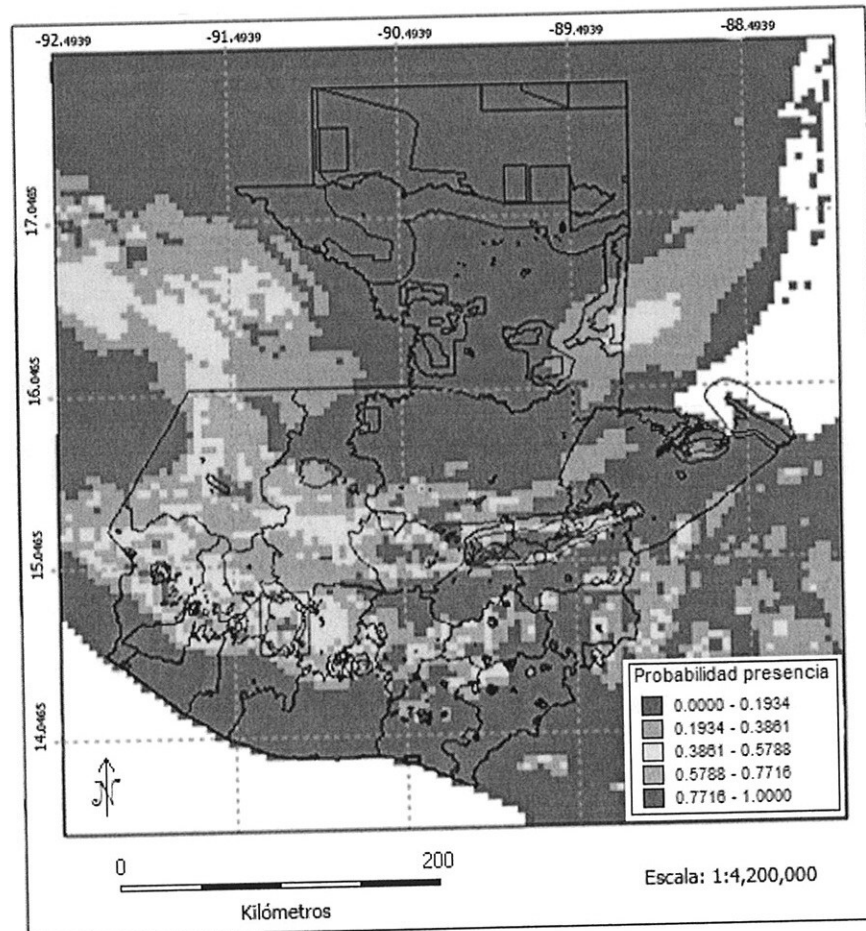


Figura 8
 Modelo de la distribución potencial de *B. dendrobatidis* en Guatemala con la capa de información de las áreas protegidas del SIGAP.



Se encontró que en las áreas con mayor elevación (y áreas adyacentes) de la Sierra Madre Sur, Sierra de las Minas y Cerro Miramundo en Jalapa y Sierra de los Cuchumatanes en Huehuetenango, existe una probabilidad de presencia muy alta para *B. dendrobatidis* (Figura 8). Las áreas dentro del SIGAP que se encuentran amenazadas son:

Cuadro 4

Áreas SIGAP con una probabilidad muy alta para *B. dendrobatidis*.

Departamento	Área SIGAP
	Reserva de Biosfera (RB) Sierra de las Minas (áreas elevadas)
Alta Verapaz	Reserva Natural Privada (RNP) Chelemhá y K'anti Shul
Baja Verapaz	Biotopo Protegido (BP) Mario Dary y RNP adyacentes
Quiché	RNP Finca Rústica Chimel
Huehuetenango	Reserva Forestal Municipal (RFM) Todos los Cuchumatanes
San Marcos	Parte alta de las Zona de Veda Definitiva (ZVD) del Volcán Tajumulco
Quetzaltenango	ZVD Volcán Chicabal
Sacatepéquez	ZVD Volcanes Acatenango y Fuego
Totonicapán	Parte alta del Parque Regional Municipal (PRM) Los Altos de San Miguel Totonicapán

Dentro de las áreas con probabilidad alta de presencia del hongo se encuentran las áreas con alturas altas-medias de la RB Sierra de las Minas y la Sierra Madre Sur, Sur de Alta Verapaz, centro de Huehuetenango y Quiché, parte de Jalapa. Dentro de las áreas SIGAP con una alta propensión al patógeno se encuentran las siguientes:

Cuadro 5

Áreas SIGAP con una probabilidad alta para *B. dendrobatidis*.

Departamento	Área SIGAP
	RB Sierra de las Minas (alturas intermedias)
Quiché	Parte Sur de la RB Visis Cabá
San Marcos	ZVD Volcán Tacaná
Quetzaltenango	ZVD Volcán Lacandón
Quetzaltenango	PRM Saqbé
Sololá	Parte del Área de Uso Múltiple (AUM) Lago de Atitlán
Chimaltenango	PRM Astillero Municipal de Tecpán
Guatemala	Reserva Protectora de Manantiales Cerro Alux
Sacatepéquez	ZVD volcán de Agua
Jalapa	ZVD volcanes Tobón y Jumay
Zacapa	ZVD Santa Rosalía
Zacapa	Parte del PRM La Unión
Chiquimula	RB Trifinio

Las áreas con probabilidad media son áreas de alturas intermedias en el Norte de Alta Verapaz, Centro de Quiché, Huehuetenango y áreas asociadas a la Sierra Madre Sur y Cadena Volcánica, Sierra de las Minas y Este del departamento de Guatemala. Las áreas protegidas que entran dentro de este rango son las siguientes

Cuadro 6
Áreas SIGAP con una probabilidad media para *B. dendrobatidis*.

Departamento	Área SIGAP
Baja Verapaz	RNP Peña del Ángel
Alta Verapaz	PN Las Victorias
Huehuetenango	PRM Montaña Aq'ema
San Marcos	PRM Astillero de San Marcos
Quetzaltenango	PRM Saqbé
	ZVD Volcán Tolimán
	Parque Nacional El Baúl
Totonicapán	ZVD Volcán Coxliquel
Sololá	AUM Cuenca de Lago de Atitlán
Suchitepéquez	RNP Los Andes
	RNP Los Trrales
Sacatepéquez	ZVD Volcán de Agua
Sacatepéquez-Escuintla	ZVD Volcán Acatenango
Escuintla-Guatemala	PN Volcán de Pacaya
Zacapa	Parque Regional Municipal La Unión
Jalapa	Zona de Veda Definitiva volcán Alzatate
	Zona de Veda Definitiva volcán Jumay

Entre las áreas en las que la probabilidad de distribución del hongo es baja se encuentran: partes bajas de Huehuetenango, Quiché, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Totonicapán, parte Oeste de Izabal, Sureste de Petén y partes bajas de Guatemala. Las áreas SIGAP que entran en este mismo rango son:

Cuadro 7
Áreas SIGAP con una probabilidad baja para *B. dendrobatidis*.

Departamento	Área SIGAP
Petén	Zona de Amortiguamiento complejo III
	Zona de Amortiguamiento parte Este complejo IV
Izabal	AUM Río Sarstún
Alta Verapaz	Monumento Natural Semuc Champey
Quiché	Parte de Reserva de Biosfera VisisCabá
	RNP Finca La Gloria
	PRM La Vega del Zope

Continuación Cuadro 7

Departamento	Área SIGAP
Totonicapán	PN Riscos de Momostenango
Jalapa	PRM Volcán Alzatate PRM Volcán Suchitán
Santa Rosa	ZVD Volcán Cruz Quemada ZVD Volcán Jumaytepeque
Jutiapa	RNP Finca de la Comunidad de Quezada
Chiquimula	Parte externa Reserva de Biósfera Trifinio
Zacapa	Parte de PRM La Unión
El Progreso	RNP El Risco RNP El Roble

La probabilidad más baja de presencia de Bd se da en las áreas bajas del país como: Petén, mayor parte de Izabal, Norte de Alta Verapaz y Quiché, Bosque seco de Baja Verapaz, Sur del país, Valle del Motagua y Oriente de Guatemala. Las áreas SIGAP que se encuentran dentro este rango son:

Cuadro 8
Áreas SIGAP con una probabilidad muy baja para *B. dendrobatidis*

Departamento	Área SIGAP
Petén	La Zona de Usos Múltiples y Zona de Amortiguamiento de La Reserva de Biosfera Maya PN Tikal PN Yaxhá-Nakúm-Naranjo PN Mirador-Río Azul Biotopo Protegido (BP) Dos Lagunas BP San Miguel La Palotada-El Zotz
Izabal	Refugio de Vida Silvestre Punta de Manabique Refugio de Vida Silvestre Bocas del Pochic Reserva Protectora de Manantiales Cerro San Gil AUM Río Sarstún PRM Montaña Chiclera ZVD Bahía de Santo Tomás BP Chocón Machacas
Alta Verapaz	PN Río Dulce PN Laguna Lachúa Monumento Natural Semuc Champey PN Laguna Lachúa PN Grutas de Lanquín
Baja Verapaz	PRM Los Cerritos-El Postezuelo
Guatemala	PN Naciones Unidas
Retahuleu	RNP Manchón Guamuchal
Escuintla	PN Sipacate-Naranjo
Santa Rosa	ZVD Volcán Cerro Redondo PN Laguna del Pino
Jutiapa	ZVD Volcanes Moyuta, Chingo, Las Víboras, Amayo Ixtepeque y Tahal
Jalapa-Chiquimula	Área de Uso Múltiple Volcán y Laguna de Ipala
Zacapa	PN Cerro Miramundo PRM Niño dormido
El Progreso	PRM Lo de China y Cerro Jesús

IV. DISCUSIÓN

Se colectaron muestras en siete departamentos: Baja Verapaz, Chiquimula, Huehuetenango, Izabal, San Marcos, Suchitepéquez y Zacapa. Se determinó que el 16.67% (24 de 144 muestras analizadas) de los individuos eran portadores de *B. dendrobatidis* (apéndice A). Los géneros *Ptychohyla* y *Craugastor* fueron los más afectados, siendo las especies *Pt. hypomykter* y *Pt. salvadorensis* las que presentaron un mayor número de individuos positivos. Los géneros *Ptychohyla* y *Plectrohyla* también han sido los más afectados en otros estudios realizados en el país (com pers. G. Ruano 2011).

La familia Hylidae es la más afectada con trece individuos positivos (cuadro 1) dentro de los géneros: *Ptychohyla*, *Plectrohyla* y *Smilisca*. En otros países se ha demostrado que los hílidos son especies muy susceptibles al hongo y han tenido pérdidas poblacionales severas (Murray *et al.* 2009). Posiblemente se debe a que estas especies están bastante asociadas a cuerpos de agua, el cual es el medio de dispersión del patógeno. La mayor parte de las *Ptychohyla* y *Plectrohyla* fueron colectadas a la orilla de ríos o muy cerca de éstos. La segunda familia más afectada fue Craugastoridae, con 14.63% de individuos positivos, estas ranas se encuentran dentro del bosque, y no están tan asociadas a los cuerpos de agua, sin embargo se encontró que individuos de diferentes especies son portadoras.

Se determinó que las tierras altas (mayores a 2400 m) tienen una probabilidad alta o muy alta de presencia de Bd y ésta aumenta a medida que aumenta la elevación, sobre todo en Sierra de las Minas y Los Cuchumatanes. Mientras que en áreas con elevaciones intermedias entre 1500 y 2400 mSNM la probabilidad de presencia es media. El hecho de que estas áreas tengan una probabilidad mayor a 0.38 (38%) se debe a que en la mayor parte, la zona de vida predominante son bosques nubosos, en los que las condiciones son buenas para el crecimiento del hongo (temperaturas medias, sombra y humedad). En áreas en las que la probabilidad es baja, la elevación es menor a los 1500 mSNM. Las áreas con probabilidad muy baja tienen una elevación

temperaturas suelen ser más elevadas (costas, selvas tropicales, bosques secos, etc) y, exceptuando las selvas tropicales, no llueve mucho.

El Cuadro 3 indica que la variable climática que más contribuyó al modelo fue el cambio de la temperatura durante la temporada (con un efecto del 53.08%), seguido por la precipitación del mes más seco (con una contribución del 11.89%) y la temperatura máxima del mes más tibio (con un efecto del 11.14%). Para el crecimiento ideal del hongo se necesitan ambientes húmedos (relacionado con precipitación o microhábitat) y rangos de temperatura entre 17 a 25°C (Andre *et al.* 2008). Se cree que a altas temperaturas el hongo no sobrevive debido a la desecación y a que los individuos tienen una tasa de cambio de la epidermis más rápido por lo que el ciclo de vida del hongo no se completa (Berger *et al.* 2005). En estudios realizados en Australia (Kriger y Hero 2006) se ha demostrado que el hongo crece mejor a temperaturas menores a 20°C y se encontró que los niveles de infección eran altos incluso a los 12.3°C. Sin embargo no se sabe qué ocurre a temperaturas menores.

Si se observa el mapa (Figura 6) con las localidades con resultados positivos para el hongo se puede ver que la temperatura promedio en estas localidades se encuentra entre 17 y 22°C, exceptuando Chiquimula y Zacapa en los que la temperatura va entre 22 y 26°C (Figura 10 en apéndice C). Al ver el modelo se determinó que la temperatura promedio en áreas con probabilidad muy alta, alta y media de presencia de Bd se encuentra dentro de los rangos óptimos para el crecimiento del patógeno. Así como se pudo determinar que en la mayor parte de áreas con baja y muy baja probabilidad la temperatura media puede llegar a ser menor a 12°C o mayor a 25°C. Estos datos concuerdan con los datos teóricos de sobrevivencia del hongo, e indican la importancia de la temperatura en su desarrollo y en su capacidad para sobrevivir en el hospedero.

En el caso de la precipitación media anual (Figura 11 en apéndice C), la mayor parte de las localidades positivas tienen una precipitación entre 1500 y 2500 mm. En el caso de las localidades de San Marcos y Suchitepéquez, la precipitación media anual se encuentra entre 3500 y 4500 mm Según el modelo las áreas más propensas (probabilidad media a muy alta) al hongo son en las que la precipitación media anual se

encuentra entre 1500 y 2500 mm en el caso del área de Los Cuchumatanes, entre 2500 y 3500 mm para el área de Sierra de las Minas y parte central de la Cadena Volcánica y entre 3500 y 4500 mm para el área de Occidente de la Sierra Madre Sur. La mayor parte de las áreas con probabilidad baja, o muy baja la precipitación media anual se encuentra entre 650 y 1500 mm. Estos datos indican que la precipitación es una variable que puede afectar la incidencia del patógeno, sin embargo se cree que la temperatura podría llegar a ser una variable más importante.

Las áreas dentro del SIGAP con una probabilidad alta o muy alta (cuadros 4 y 5) de presencia del hongo como RB Sierra de las Minas, BP Mario Dary y en general el área de las Verapaces, obtuvieron una calificación "aceptable" para la efectividad del manejo en la Evaluación de Gestión del SIGAP (2005). En el caso de las áreas SIGAP del altiplano occidental y altiplano central se obtuvo una calificación de "regular" y "poco aceptable" respectivamente. Por último, la ZVD de los Volcanes Acatenango y Fuego obtuvieron una calificación "no aceptable". Estos resultados no son satisfactorios ya que son áreas con probabilidad muy alta de Bd y es necesario un manejo más efectivo con planes de conservación y prevención urgentes para evitar la dispersión de patógeno.

Rovito *et al.* (2009) propuso que el declive de poblaciones de *Pseudoeurycea rex*, *P. goebeli* y *P. brunata* desde finales de los setenta y principios de los años ochenta puede estar asociado a *B. dendrobatidis*. La distribución de estas salamandras (figuras 30-32 del apéndice E) se encuentra en localidades en las que la probabilidad de presencia del patógeno es muy alta (Figura 7). Estos datos le dan mayor peso al modelo de distribución potencial generado en Maxent. Otra especie de la que se han reportado declives es *P. exspectata*, se cree que es debido a pérdida de hábitat. El rango de distribución de esta especie es Cerro Miramundo (Figura 33 del apéndice E) en Jalapa, según el modelo esta localidad tiene una probabilidad de presencia del patógeno muy alta por lo que se hipotetiza que el declive de esta especie también se puede deber a *B. dendrobatidis*. *Bromelohyla bromeliacia* es otra especie común en la década de los setenta y en los últimos años no se ha encontrado con la misma frecuencia (com pers. Campbell 2010). Al observar la distribución de esta especie (Figura 34 del apéndice E) se puede determinar que su rango se encuentra dentro de las localidades con probabilidad alta y muy alta de presencia.

El número de especies infectadas por localidad no es muy alto, sin embargo el hecho de que doce de catorce localidades muestreadas presenten individuos positivos indica que este se encuentra bastante esparcido en el país (apéndice B), sobretodo en áreas con elevaciones medias a altas y con precipitación entre 900 y 1500 mm. A pesar de encontrar organismos infectados, ninguno presentaba los síntomas clásicos de infección por *B. dendrobatidis*, como pocos reflejos y debilidad. Además no se encontraron poblaciones muertas, como se ha visto en otros países (Berger *et al.* 1998; Lips 1999; Bonaccorso *et al.* 2003; Bosh *et al.* 2000 en Weldon *et al.* 2004; Mendelson *et al.* 2004; Kriger 2009).

Existe la hipótesis de que este patógeno se encuentra en Guatemala, desde la década de los ochenta (Cheng *et al.* 2011) y se cree que algunos de los organismos que encontramos ahora son descendientes de las poblaciones que sobrevivieron y son tolerantes. “La regla de las 10,000 zoosporas” de Vredenburg dice que el hospedero tiene una infección letal cuando el conteo de zoosporas es mayor al umbral letal de 10,000 zoosporas (Kinney *et al.* 2011). Al cuantificar muestras positivas del país por medio de PCR en tiempo real se ha determinado que la mayor parte de anfibios infectados en Guatemala no tienen niveles altos de zoosporas (G. Ruano com pers. 2011). Se puede hipotetizar que los sobrevivientes únicamente son portadores con niveles bajos niveles de zoosporas y es por esto que no se ha tenido grandes pérdidas poblacionales. Sin embargo se necesita más estudios y monitoreos de incidencia de Bd para poder determinar si las poblaciones de especies infectadas se mantienen estables. Así como estudiar la genética del hongo para determinar si existe diversidad de haplotipos como se ha encontrado en Asia (Goka *et al.* 2009). Medir variables ambientales y cambios dentro de los ecosistemas es de suma importancia. Existe la hipótesis de que el patógeno se encuentra esparcido mundialmente desde hace muchas décadas y que los lugares en los que se ha dado grandes epidemias se puede deber a cambios ambientales, esta es la hipótesis del patógeno endémico (Fisher *et al.* 2009 en Amfibie y Nederland. 2010).

Se sabe que la mayor parte de la dispersión del patógeno se ha dado por la actividad humana e introducción antropogénica del patógeno (Cunningham *et al.* 2003; Daszak *et al.* 2000; y Daszak *et al.* 2001 en Mazzoni *et al.* 2003). Muchos de los lugares con muestras positivas son bosques en buenas condiciones en los que entran muchas personas, ya sean científicos, turistas o trabajadores de campo. Estos probablemente portan las esporas en equipo, zapatos o llantas de los vehículos y las transportan de un sitio a otro. Esto hace que la educación ambiental sea una parte importante para la conservación de anfibios, es necesaria la creación de programas de prevención del patógeno.

La técnica de *PCR* convencional es una técnica eficiente para la detección de *Batrachochytrium dendrobatidis*. Los primeros Bd1a y Bd2a amplifican una secuencia de 300 pb (apéndice D) dentro de la región ITS1-ITS2. Al realizar la optimización del *PCR* con los controles positivos extraído de esporas JEL 423 se determinó que el *PCR* es bastante sensible, por lo que la concentración de ADN no debía ser muy alta ya que se inhibía el proceso. Cuando se realizó la amplificación con controles a 1.3 ng/ μ l, 2.6 ng/ μ l y 3.9 ng/ μ l el resultado fueron bandas intensas (Figura 12). Las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro a una absorbencia de 260 nm y a partir de este resultado se realizaban las diluciones de ADN a 1 ng (concentración óptima a la que se obtenía amplificación con los controles). Se realizó *PCR* con muestras que se sabía eran positivas y las bandas eran muy tenues y en algunos casos no se miraban del todo. Se cree que al cuantificar las muestras de ADN ésta podía incluir ADN del organismo al que se le tomó la muestra o contaminantes del ambiente y por ello los resultados de la cuantificación podía llegar a ser diferentes. Se realizó una modificación al programa de *PCR* propuesto por Annis *et al.* 2004, se aumentaron los ciclos de amplificación de 30 a 35.

Se agregó BSA a una concentración de 400 ng/ μ l y 4 μ l de una dilución de ADN 1:10 (Garland *et al.* 2011). El BSA se agregó con el objetivo de evitar la inhibición del *PCR* ya que muchas de las muestras al ser tomadas en el campo y directamente de la piel de los animales podrían haber estado contaminadas con tierra o como ya se mencionó con ADN del anfibio. Luego de hacer un *PCR* utilizando dos "master mix",

uno con BSA y otro sin BSA, se determinó que agregar BSA mejora notablemente los resultados. A pesar de las modificaciones realizadas algunas bandas obtenidas en los resultados positivos eran tenues (fig. 14-19), esto probablemente se debe a que los individuos infectados no tenían un número de zoosporas no era muy elevado. El problema es que se pueden llegar a dar falsos positivos, es decir, que una muestra tenga un resultado positivo cuando en realidad es negativo. Para evitar falsos negativos, Goka *et al.* 2009 han recomendado realizar un PCR anidado, amplificando primero la región ITS con primers generales y luego la región de interés con primers específicos, obteniendo resultados exitosos.

V. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron resultados positivos en el 16.67% de los individuos colectados, siendo los géneros *Ptychohyla* y *Craugastor* los más afectados. La familia Hylidae obtuvo más resultados positivos con 13 (22.41%) individuos, seguida por la familia Craugastoridae con 6 (14.63%) individuos positivos.
2. Las especies: *B. dumni*, *C. lineatus*, *C. rhodopsis*, *E. pustulosus*, *L. maculatus*, *Pt. euthysanota*, *Pt. salvadorensis* y *S. baudinii* son nuevos reportes de especies portadoras para Guatemala.
3. Los departamentos con resultados positivos fueron: Baja Verapaz, Chiquimula, Izabal, San Marcos, Suchitepéquez y Zacapa representado doce localidades positivas de catorce muestreadas. Solamente en Huehuetenango no se encontraron individuos positivos.
4. El modelo de distribución potencial del hongo muestra que las tierras altas del país como: la Sierra de los Chuchumatanes, Sierra Madre Sur y la Cadena Volcánica y Sierra de las Minas tienen una probabilidad muy alta o alta de presencia de *B. dendrobatidis*. Mientras que las tierras bajas tienen la probabilidad de presencia más baja.
5. Las variables más importantes en la distribución del hongo son el cambio de la temperatura y la precipitación del mes más seco, variables determinantes para la presencia de *B. dendrobatidis*.
6. El modelo de distribución potencial tiene mayor peso al observar que datos geográficos de especies que han sufrido declives poblacionales en Guatemala concuerdan con las localidades que el modelo predice que tendrían alta y muy alta probabilidad de presencia de *B. dendrobatidis*.

VI. RECOMENDACIONES

- Las medidas de prevención en el campo son muy importantes cuando se trata de enfermedades infecciosas. Lavar las botas, equipo e idealmente las llantas del carro con una solución de cloro al 1% es indispensable para no propagar el patógeno.
- Es de suma importancia que al trabajar y coleccionar anfibios se utilicen guantes desechables entre individuos y que estos se guarden en diferentes bolsas. De esta forma se evita la diseminación del hongo entre individuos y falsos positivos al realizar las detecciones.
- Los programas de conservación de anfibios deben tener cierto enfoque a la educación ambiental, ya que mucha de la dispersión del hongo se ha dado por el hombre. Es necesario que la población en general esté consciente del problema. Es muy importante que investigadores y estudiantes de carreras como Biología, Ecoturismo, Agronomía, Arqueología, Ingeniería Ambiental y asociadas tengan conocimiento del tema y de las medidas básicas para evitar la dispersión. Es necesario mejorar el manejo de las áreas protegidas del país.
- Los protocolos (Goka *et al.* 2009 y Garland *et al.* 2011) para realizar la detección molecular de Bd mejoran notablemente los resultados. Se recomienda realizar un PCR anidado para determinar si la detección de muestras de ADN con baja concentración mejora. Además si solamente se quiere conocer la presencia o ausencia del patógeno es mucho más barato utilizar la técnica de PCR convencional.
- Las muestras de ADN de Bd pueden encontrarse contaminadas ya que la muestra se toma directamente de la piel de un organismo silvestre. Es por ello

que la estabilidad de las muestras puede variar por lo que el transporte adecuado es de suma importancia.

VII. LITERATURA CITADA

- Acevedo, M. 2006. *Anfibios y reptiles de Guatemala una breve síntesis con bibliografía en Cano, E. 2006. Biodiversidad de Guatemala. Volumen I. Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala. 674 pp.*
- Amfibie, R. y V. Nederland. 2010. *Literature review on Batrachochytrium dendrobatidis. Stichting RAVON. Equipo de Especies Invasoras (TIE), Ministerio de Agricultura, Naturaleza y Alientos Holanda. 37 pp*
- Andre, S.; J. Parker, C. Briggs. 2008. *Effect of temperature on host response to Batrachochytrium dendrobatidis infection in the mountain yellow-legged frog (Rana mucosa). Journal of wildlife diseases 44(3):716-720*
- Angulo, A.; J. Ruede-Almonacid, J. Rodríguez-Mahecha y E. La Marca. 2006. *Técnicas de inventario y monitoreo para los anfibios de la Región Tropical Andina. Conservación Internacional, Serie Manuales de Campo.*
- Annis, S.; F. Dastoor, H. Ziel, P. Daszak y J. Longcore. 2004. *A DNA-Based assay identifies Batrachochytrium dendrobatidis in amphibians. Journal of Wildlife Diseases 40(3):420-428.*
- Berger, L.; R. Speare, P. Daszak, E. Green, A. Cunningham, L. Goggin, R. Slocombe, M. Ragan, A. Hyatt, K. McDonald, H. Hines, K. Lips, G. Marantelli y H. Parkes. 1998. *Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. Proceedings of the National Academy of Science 95:9031-9036.*
- Berger, L.; A. Hyatt, R. Speare y J. Loncore. 2005. *Life cycle stages of the amphibian chytrid Batrachochytrium dendrobatidis. Diseases of Aquatic Organisms 68:51-63.*

- Boyle, D. G.; D.B. Boyle, V, Olsen, J. A. Morgan y A. D. Hyatt. 2004. *Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (Batrachochytrium dendrobatidis) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay*. Diseases of aquatic organisms 60(2): 141-8.
- Cheng, T.; S. Rovito, D. Wake y V. Vredenburg. 2011. *Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen Batrachochytrium dendrobatidis*. Proceedings of the National Academy of Science 108(23):9502-9507.
- Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP). 2001. *Listado de especies de fauna silvestre amenazadas de extinción (Lista Roja de Fauna)*. Publicado en Diario de Centro América.
- Corral, L. 2004. *Análisis del estado actual del Sistema guatemalteco de áreas protegidas basado en un diagnóstico de Estado, Presión, Impacto y Respuesta (EPIR)*. Trabajo de Graduación, Licenciatura en Biología. Universidad del Valle de Guatemala. 122 pp
- Cunningham, A.A.; P. Daszak, J.P. Rodríguez. 2003. *Pathogen pollution: defining a parasitological threat to biodiversity conservation*. Journal of Parasitology 89:78-83.
- Cruz, G.; M. Acevedo y J. Lee. 2008. *Bromelidhyla bromeliacia*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2011.1. En: www.iucnredlist.org.
- Daszak, P.; A.A. Cunningham y A.D. Hyatt. 2000. *Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health*. Science 287:443-449.
- Fisher, M.C.; T.W. Garner y S.F. Walker. 2009. *Global emergence of Batrachochytrium dendrobatidis and amphibian chytridiomycosis in space, time and host (Abstract)*. Annual Reviews 63:291-310.

- Fisher, M.C.; 2009. *Endemic and introduced haplotypes of Batrachochytrium dendrobatidis in Japanese amphibians: sink or source?* Molecular ecology, 18(23): 4731-4733.
- Garland, S.; J. Wood, y L. Skerratt. 2011. *Comparison of sensitivity between real-time - detection of a TaqMan assay for Batrachochytrium dendrobatidis and conventional detection.* Diseases of Aquatic Organisms 94(2):101-105.
- Goka, K.; J. Yokoyama, Y. Une, T. Kuroki, K. Suzuki, M. Nakahara, A. Kobayashi, S. Inaba, T. Mizutani y A. Hyatt. 2009. *Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan.* Molecular ecology 18(23):4757-74
- Hamilton, L. 2001. *Una campaña por los bosques nublados: ecosistemas únicos y valiosos en peligro.* En: Kappelle y Brown. 2001. *Bosques nublados del neotrópico. Primera Edición. Editorial INBio.* Instituto Nacional de Biodiversidad, INBio. Costa Rica. 740 pp
- IUCN 2011. *IUCN Red List of Threatened Species.* Versión 2011.1. En: www.iucnredlist.org
- Kinney V.; J. Heemeyer, A. Pessier, M. Lannoo. 2011. *Seasonal Pattern of Batrachochytrium dendrobatidis infection and mortality in Lithobates areolatus: Affirmation of Vredenburg's "10,000 Zoospore Rule".* PLoS ONE 6(3).
- Kruger, K.; J. Hero. 2006. *Large-scale seasonal variation in the prevalence and severity of chytridiomycosis.* Journal of Zoology 271:352-359.
- Lee, J.C. 2000. *A field guide to the amphibians and reptiles of the Maya world: the lowlands of Mexico, Northern Guatemala, and Belize.* Universidad de Cornell, Nueva York. Estados Unidos. 402 pp.

- Mendelson III, J.R.; E.D. Brodie, J.H. Malone, M.E. Acevedo, M.A. Baker, N.J. Smatresk y J.A. Campbell. 2004. *Factors associated with the catastrophic decline of a cloud forest frog fauna in Guatemala*. Journal of Tropical Biology 52 (4):991-1000.
- Murray, K.; R. Speare, L. Skeratti y R. Woods. 2009. *Chytridiomycosis – amphibian chytrid fungus in Australia*. Fact sheet. Australia Wildlife Health Network.
- Liu, C.; M. White y G. Newell. 2009. *Measuring the accuracy of species distribution models: a review*. MODSIM COngress, Cairns, Victoria 4241-4247.
- Phillips, S.; R. Anderson, y R. Schapire. 2006. *Maximum entropy modeling of species geographic distributions*. Ecological Modelling 190(3-4):231-259.
- Phillips, S. y J. Dudik. 2008. *Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation*. Ecography 31:161-175.
- Rovito, S.; G. Parra-Olea, C. Vásquez, T. Papenfuss y D. Wake. 2009. *Dramatic declines in neotropical salamander populations are an important part of the global amphibian crisis*. Proceedings of the National Academy of Science. Early edition:1-6.
- Skerratti, L.F.; L. Berger, H. Hines, K. McDonald, D. Mendez y R. Speare. 2008. *Survey protocol for detecting chytridiomycosis in all Australian frogs populations*. Diseases of Aquatic Organisms 80:85-94.
- Speare, R., L. Berger, L.F. Skerratt, R. Alford, D. Mendez, S. Cashins, N. Kenyon, K. Hauselberger, J. Rowley. 2004. *Hygiene Protocol for handling amphibians in field studies*. Journal of Fish Diseases 10-13
- Swei, A.; J. Rowley, D. Rödder, M. Diesmos, A. Diesmos, C. Briggs, R. Brown, T. Cao, T. Cheng, R. Chong, B. Han, J.M. Hero, H. Hoang, M. Kusriani, D. Le, J. McGuire, M. Meegaskumbura, M.S. Min, D. Mulcahy, T. Neang, S. Phimmachak, D. Rao,

N. Reeder, S. Schovile, N. Sivongxay, N. Srei, M. Sto, B. Stuart, L. Torres, D. Tran, T. Tunstall, D. Vieites y V. Vredenburg. 2011. *Is Chytridiomycosis an Emerging Infectious Disease in Asia?* PLoS ONE 6(8)

Tyler, M.; D. Sheaman, R. Franco, P. O'Brien, R. Seamark. 1983. Inhibition of gastric acid secretion in the gastric brooding frog, *Rheobatrachus silus*. *Science* 222(4591):609-610.

Voyles, J.; S. Young, L. Berger, C. Campbell, W. Voyles, A. Dinudom, D. Cook, R. Webb, R. Alford, L. Skerratt y R. Speare. 2009. *Pathogenesis of Chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines*. *Science* 326:582-585

Wright, K. M. y B.R. Whitaker. 2001. *Amphibian medicine and captive husbandry*. Krieger Publishing Company. Malabar, Florida. 499 pp.

DOCUMENTOS ELECTRÓNICOS CONSULTADOS:

AmphibiaWeb: *Information on amphibian biology and conservation*. 2011. *An Overview of Chytridiomycosis*. Berkeley, California. En: <http://amphibiaweb.org/>

Brem, F.; J.R. Mendelson III y K. Lips. 2007. *Field sampling protocol for Batrachochytrium dendrobatidis from living amphibians, using alcohol preserved swabs*. Versión 1. Conservation International, Arlington, Virginia, Estados Unidos. En: <http://www.amphibianark.org/pdf/Field%20sampling%20protocol%20for%20amphibian%20chytrid%20fungi%201.0.pdf>. 10pp

- Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP). 2011. *Sistema Guatemalteco de Áreas Protegidas*. En: <http://www.conap.gob.gt/biodiversidad/sigap>
- Griger, K. 2009. Chytridiomycosis. NGO *Save the Frogs!* En: <http://www.savethefrogs.com/why-frogs/index.html>
- , 2009. *Why frogs are important?* NGO *Save the Frogs!* En: <http://www.savethefrogs.com/why-frogs/index.html>
- Mazzoni, R.; A. Cunningham, P. Daszak, A. Apolo, E. Perdomo y G. Speranza. 2003. *Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (Rana catesbeiana) farmed for international trade*. *Emerging Infectious Diseases* 9 (8). 4pp. En: <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/papers/mazzoni-2003.pdf>
- Weldon, C.; L. du Preez, A. Hyatt, R. Muller y R. Speare. 2004. *Origin of the amphibian chytrid fungus*. *Emerging Infectious Diseases* 10(12). En: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/10/12/03-0804_article.htm
- Zolan, M.; y P. Pukkila. 1986. *Inheritance of DNA methylation in Coprinus cinereus*. *Molecular and cellular biology* 6(1):195-200. En: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=367498&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

COMUNICACIÓN PERSONAL:

Lic. Gustavo Ruano. 2011. Biólogo Universidad de San Carlos de Guatemala, Investigador Principal Proyecto FD 70-2009: "Evaluación de la incidencia de Quitridiomycosis en anfibios en tres regiones de endemismo: Los casos de los bosques nubosos de Zacapa, Baja Verapaz y San Marcos, Guatemala".

Dr. Jonathan Campbell. 2010. Biólogo Universidad de Arlington, Texas. Amphibian Ark Workshop: Amphibian Conservation Needs Assessment for Guatemalan species. 4 al 6 de febrero 2010. Museo de Historia Natural, Escuela de Biología, USAC.

Apéndice A

Cuadros resultados

Resultados de especies muestreadas en diferentes localidades del género *Bolitoglossa*

Especie	Total muestreado	Positivas
<i>Rufescens</i>	6	0
<i>Flavimembris</i>	3	0
<i>Helmrichi</i>	4	0
<i>Conanti</i>	3	0
<i>Mexicana</i>	1	0
<i>Dunni</i>	1	1
<i>Engelhardti</i>	1	0

Resultados de especies muestreadas en diferentes localidades del género *Crougastor*

Especie	Total muestreado	Positivas
<i>Heiroleias</i>	2	1
sp.	9	1
<i>Bocourti</i>	1	1
<i>Laticeps</i>	4	0
<i>lineatus</i>	6	1
<i>loki</i>	1	0
<i>rhodopis</i>	6	3
<i>rostralis</i>	1	0
<i>sabrinus</i>	9	0

Resultados de especies muestreadas en diferentes localidades

Género	Especie	Total muestreado	Positivas
<i>Cryptotriton</i>	<i>veraepacis</i>	1	0
<i>Dendropsophus</i>	<i>microcephalus</i>	1	0
<i>Engystomops</i>	<i>pustulosus</i>	2	2
<i>Hyalinobatrachium</i>	<i>fleishmanni</i>	2	0
<i>Hypopachus</i>	<i>variolosus</i>	2	0
<i>Incilius</i>	<i>campbelli</i>	1	0
<i>Lithobates</i>	<i>berlandieri</i>	4	0
<i>Lithobates</i>	<i>forreri?</i>	1	0
<i>Lithobates</i>	<i>maculatus</i>	6	1
<i>Lithobates</i>	sp.	1	0
<i>Plectrohyla</i>	sp.	8	1
<i>Plectrohyla</i>	<i>matudai</i>	11	2
<i>Plectrohyla</i>	<i>sagorum</i>	5	0
<i>Plectrohyla</i>	<i>hartwegii</i>	1	0
<i>Plectrohyla</i>	<i>guatemalensis</i>	1	0
<i>Oedipina</i>	<i>elongata</i>	2	0
<i>Ptychohyla</i>	<i>eutysanota</i>	3	1
<i>Ptychohyla</i>	<i>hypomykter</i>	11	4
<i>Ptychohyla</i>	<i>salvadorensis</i>	13	3
<i>Smilisca</i>	<i>baudinii</i>	4	2
<i>Tlalochohyla</i>	<i>picta</i>	2	0

Apéndice B

Localidades muestreadas

Resultados por localidades muestreadas

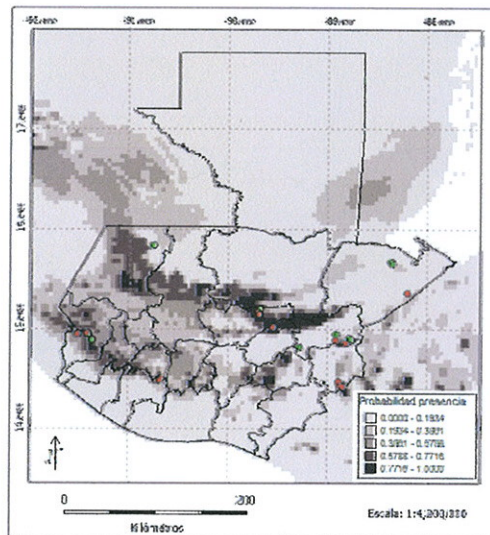
Departamento	Municipio	Localidad	Total muestreado	Total +	
Baja Verapaz	Purulhá	Finca Sachut	3	0	
		Biotopo del Quetzal	8	2	
		Río El Cafetal	7	2	
Chiquimula	Salamá	Piedras Quebradas, Chilascó	3	1	
		Esquipulas	Plan de la Arada	16	1
			Finca Río Frío	1	1
Huehuetenango	Barillas	El Musgal	4	2	
		Finca Buenos Aires Chiblac	8	0	
Izabal	Livingston	Finca La Sirena	20	0	
		Morales	3	1	
San Marcos	San Pablo	Caserío Nuevo San Francisco	4	3	
		San Rafael Pie de La Cuesta	8	0	
	Tajumulco	La Trinidad	13	1	
Suchitepéquez	Patulul	Finca Los Andes	14	5	
Zacapa	La Unión	Bosque municipal de La Unión	14	4	
		Zacapa	Finca Las Granadillas	17	1
	Cabañas	Reserva El Heloderma	1	0	
Total			144	24	

Apéndice C

Mapas

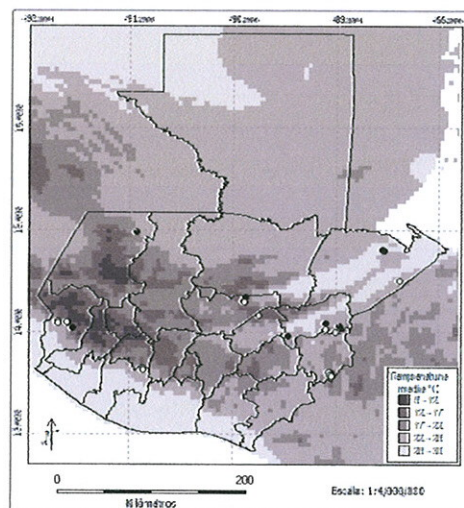
Figura

Mapa de la distribución potencial de *B. dendrobatidis* en Guatemala con los puntos muestrados en este estudio (puntos rojos:=localidades positivas).



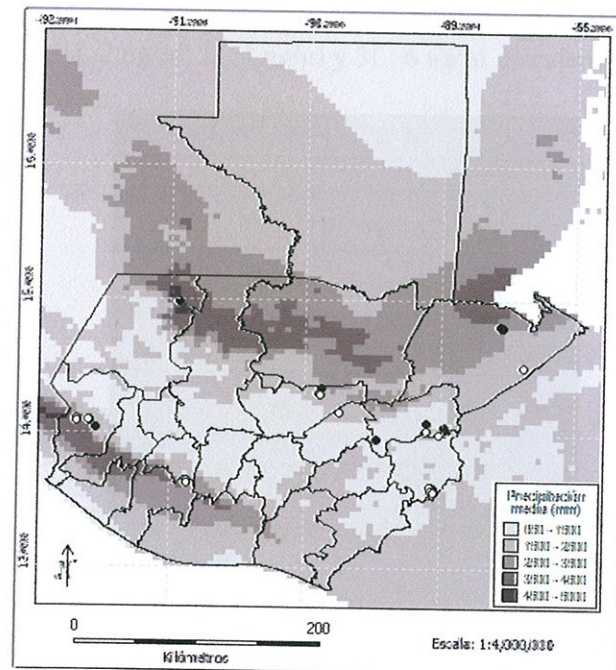
Figura

Mapa de las localidades muestradas en el estudio (puntos blancos= localidades positivas) con capa de información de temperatura media anual. Los datos de temperatura fueron obtenidos de la base de datos de Worldclim.



Figura

Mapa de las localidades muestreadas en el estudio (puntos blancos= localidades positivas) con capa de información de precipitación mínima. Los datos de precipitación fueron obtenidos de la base de datos de Worldclim

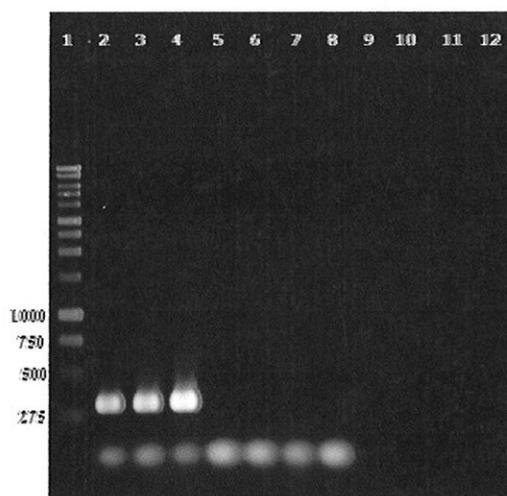


Apéndice D

Geles de agarosa

Figura

Gel de agarosa 1.2 % de PCR del control positivo JEL 423 (H) y de controles negativos de levadura (L). La concentración de las muestras era: 1H: 1.33 ng/ μ l; 2H: 2.66 ng/ μ l; 3H: 3.99 ng/ μ l; 1L:2 ng/ μ l; 2L:4 ng/ μ l y 3L: 6 ng/ μ l. Escalera: 1 kb.

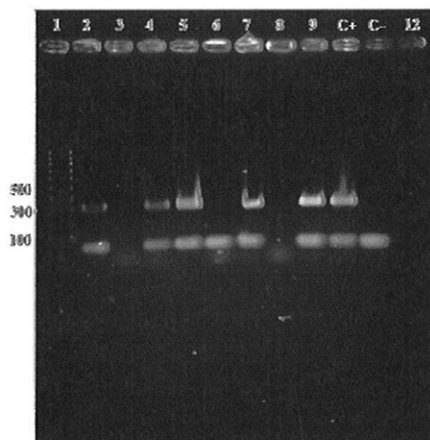


Mapa

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mx	1kb	1H	2H	3H	1L	2L	3L	B	--	--	--	--

Figura

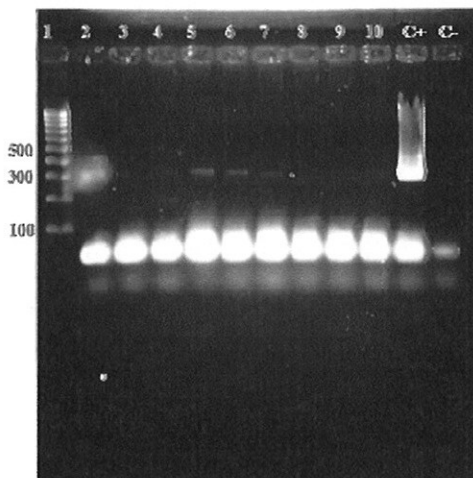
Gel agarosa 2% de PCR para determinar inhibición de la polimerasa. Se utilizó las muestras negativas 11, 91 y 93 a estas se les agregó 0.5 µl de control positivo. Se realizaron dos master mix uno sin BSA y otro con BSA. Escalera: 100pb. Se puede observar que las muestras en las que se utilizó el master mix con BSA obtuvieron un mejor resultado.



Mapa:	Sin BSA						Con BSA					
Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mx	100pb	11	91	93	C+	B	11	91	93	C+	C-	--

Figura

Gel agarosa 2% de PCR muestras BAZ 19-27. Las muestras 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26 y 27 dieron un resultado positivo para Bd. Escalera: 100pb

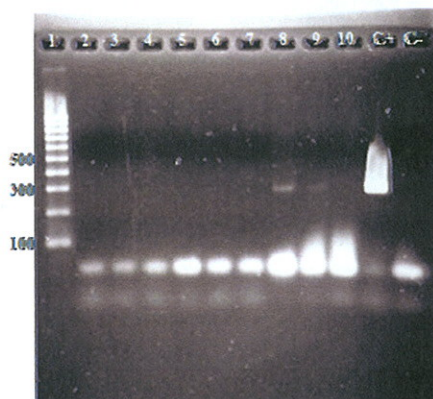


Mapa

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mx	100pb	19	20	21	22	23	24	25	26	27	C+	C-

Figura

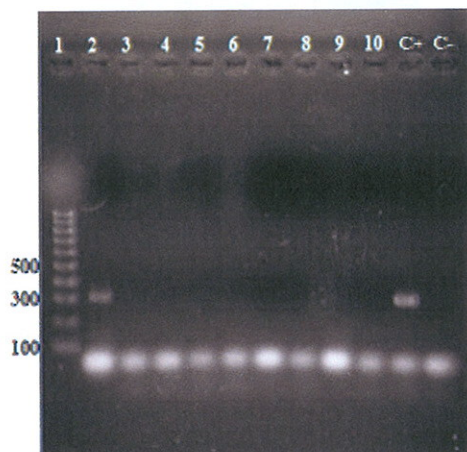
Gel agarosa 2% de PCR muestras BAZ 46-54. Las muestras 52 y 53 dieron un resultado positivo para Bd. Escalera: 100pb

**Mapa**

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mx	100pb	46	47	48	49	50	51	52	53	54	C+	C-

Figura

Gel agarosa 2% de PCR de muestras BAZ 100-109. La muestra 100 dio resultado positivo para Bd. Escalera:100pb

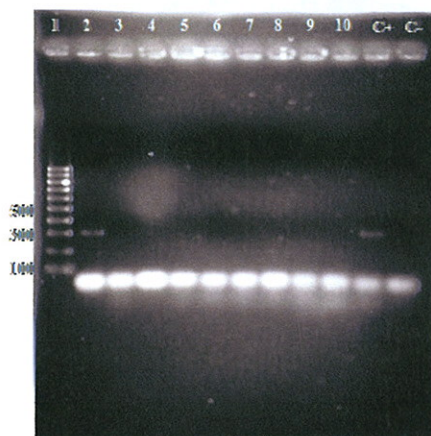


Mapa

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mx	100pb	100	101	102	103	104	105	106	107	109	C+	C-

Figura

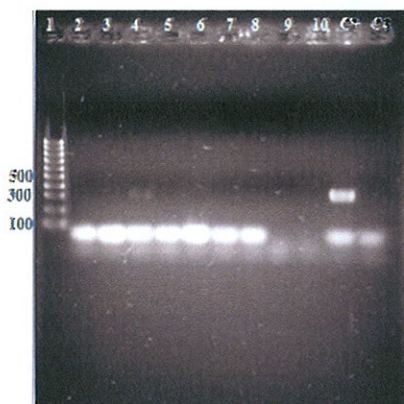
Gel agarosa 2% de PCR de muestras BAZ 110-121. La muestra 110 dio resultado positivo para Bd. Escalera:100pb

**Mapa**

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mx	100pb	110	111	112	113	117	118	119	120	121	C+	C-

Figura

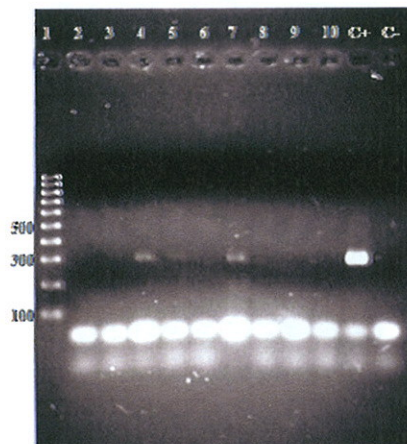
Gel agarosa 2% de PCR de muestras BAZ 122-130. La muestra 124 dio resultado positivo para Bd. Escalera:100pb

**Mapa:**

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mx	100pb	122	123	124	125	126	127	128	129	130	C+	C-

Figura

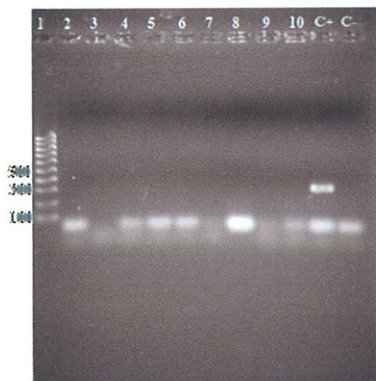
Gel agarosa 2% de PCR de muestras BAZ 140-G (guante de secreción de *B. flavimembris*)
 . La muestra 142 y 145 dieron un resultado positivo para Bd. Escalera:100pb

**Mapa**

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mx	100pb	140	141	142	143	144	145	146	147	G	C+	C-

Figura

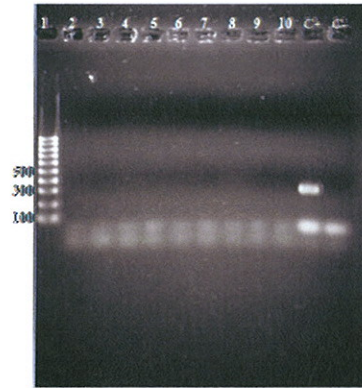
Gel agarosa 2% de PCR de muestras BAZ 1-9. Escalera:100pb

**Mapa**

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mx	100pb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C+	C-

Figura

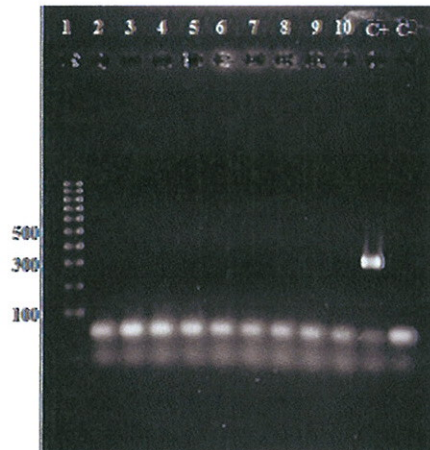
Gel agarosa 2% de PCR de muestras BAZ 10-18. Escalera:100pb

**Mapa**

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mx	100pb	10	11	12	13	14	15	16	17	18	C+	C-

Figura

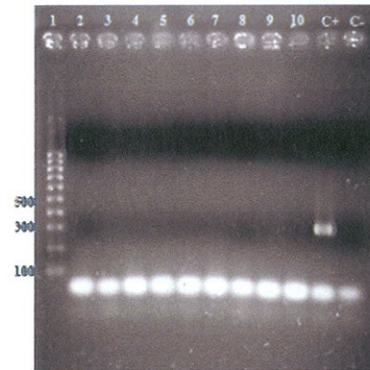
Gel agarosa 2% de PCR muestras BAZ 37-45. Escalera: 100pb

**Mapa**

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mx	100pb	37	38	38	40	41	42	43	44	45	C+	C-

Figura

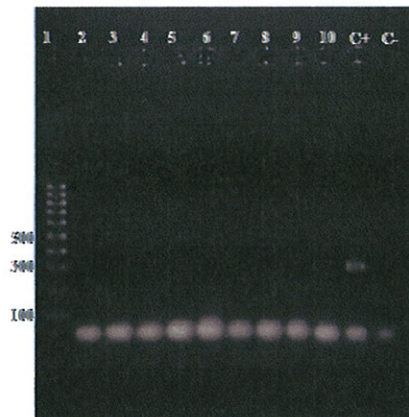
Gel agarosa 2% de PCR muestras BAZ 55-63. Escalera: 100pb

**Mapa**

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mx	100pb	55	56	57	58	59	60	61	62	63	C+	C-

Figura

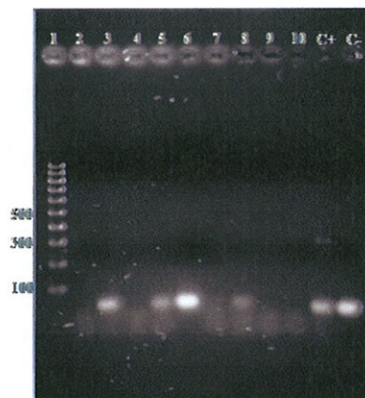
Gel agarosa 2% de PCR muestras BAZ 64-72. Escalera: 100pb

**Mapa**

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mx	100pb	64	65	66	67	68	69	70	71	72	C+	C-

Figura

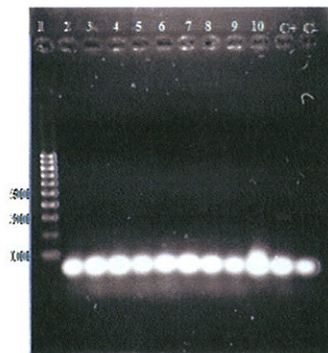
Gel agarosa 2% de PCR de muestras BAZ 73-81. Escalera:100pb

**Mapa**

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mx	100pb	73	74	75	76	77	78	79	80	81	C+	C-

Figura

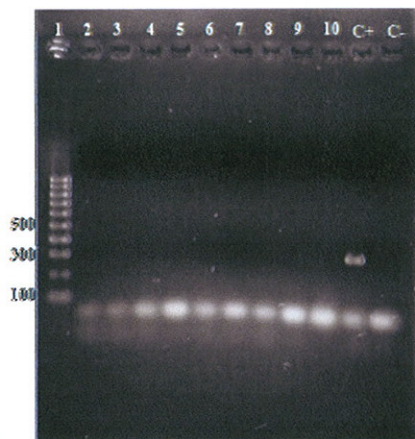
Gel agarosa 2% de PCR de muestras BAZ 82-90. Escalera:100pb

**Mapa**

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mx	100pb	82	83	84	85	86	87	88	89	90	C+	C-

Figura

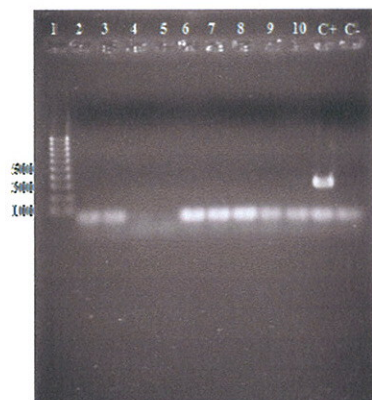
Gel agarosa 2% de PCR de muestras BAZ 91-99. Escalera:100pb

**Mapa**

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mx	100pb	91	92	93	94	95	96	97	98	99	C+	C-

Figura

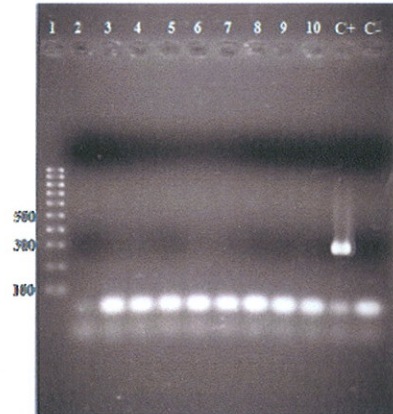
Gel agarosa 2% de PCR de muestras BAZ 110-121. Escalera:100pb

**Mapa**

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mx	100pb	110	111	112	113	117	118	119	120	121	C+	C-

Figura

Gel agarosa 2% de PCR de muestras BAZ 131-139. Escalera:100pb

**Mapa**

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mx	100pb	131	132	133	134	135	136	137	138	139	C+	C-

Apéndice E

Distribución de especies de anfibios que han presentado declives poblacionales



Figura Rango de distribución de *P. brunnata* (IUCN 2011).



Figura Rango de distribución de *P. goebeli* (IUCN 2011).



Figura Rango de distribución de *P. rex* (IUCN 2011).



Figura Rango de distribución de *P. expectata* (IUCN 2011).



Figura Rango de distribución de *Bromeliohyala bromeliacia* (IUCN 2011).

Apéndice F

Protocolo de extracción de ADN

Se realizó la modificación al protocolo de Zolan y Pukkila (1986).

1. Se secó el hisopo con la muestra en la campana de flujo laminar para que los restos de etanol se evaporen.
2. Se agregó 600 µl de buffer de extracción (1% CTAB, 0.7 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 10mM de EDTA y 1% de 2-mercaptoetanol) a cada muestra.
3. Las muestras se incubaron a 60 °C por cuatro horas en el caso de los hisopos delgados y por siete horas en el caso de los hisopos gruesos.
4. Se eliminó el hisopo y se agregó 600 µl de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1.
5. Las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 13,200 rpm.
6. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml.
7. Se agregó un volumen de isopropanol frío e incubó a -20 °C para que se precipitaran los ácidos nucleicos.
8. Las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 13,200 rpm y se descartó el sobrenadante. Se dejó secando el pellet hasta que todos los restos de isopropanol se evaporaran.
9. Por último se resuspendió el ADN en 40 µl de buffer TE (10mM Tris-HCl; 50mM EDTA).

Apéndice G
Fotografías de campo (O.A. Zamora 2010-2011)



Figura *Plectrohyla hartwegii* colectada en el Biotopo Mario Dary, Baja Verapaz.



Figura *Bolitoglossa daryorum* colectada en Piedras Quebradas, Chilascó, B. Verapaz.



Figura *Plectrohyla quecchi* colectada en el Biotopo Mario Dary, B. Verapaz.



Figura. *Bolitoglossa rufescens* colectada en Bosque Municipal La Unión, Zacapa.



Figura *Bolitoglossa helmrichi* colectada en el Biotopo Mario Dary, B. Verapaz.



Figura. *Lithobates* sp. colectada en La Unión, Zacapa.



Figura. *Plectrohyla matudai* colectada en Finca Buena Vista, Montañas Las Granadillas, Zacapa



Figura. *Craugastor lineatus* colectado en La Trinidad, Tajumulco, San Marcos



Figura. *Ptychohyla hypomykter* colectada en Finca Buena Vista, Zacapa. Este individuo tuvo resultado positivo para Bd.



Figura. *Bolitoglossa flavimembris* colectada en La Trinidad, Tajumulco, San Marcos



Figura. *Smilisca baudinii* colectada en Finca Buena Vista, Montañas Las Granadillas, Zacapa.



Figura. *Bolitoglossa engelhardti* colectada en Reserva del Quetzal, San Rafael Pie de la Cuesta, San Marcos.



Figura. *Plectrohyla sagorum* colectada en Reserva del Quetzal, San Rafael Pie de la Cuesta, San Marcos.



Figura. *Lithobates maculatus* colectada en Aldea Santa Rosalía, Esquipulas, Chiquimula



Figura. *Ptychohyla salvadorensis* colectada en Aldea Santa Rosalía, Esquipulas, Chiquimula



Figura. *Bolitoglossa rufescens* colectada en Finca La Sirena, Izabal



Figura. *Bolitoglossa heiroreias* colectada en Reserva El Durasnal, Aldea Santa Rosalía, Chiquimula

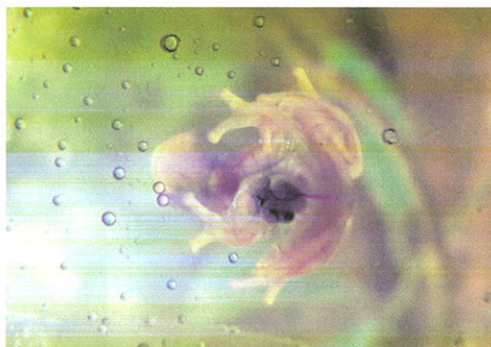


Figura. *Hyalinobatrachium fleischmanni* colectada en Finca La Sirena, Izabal



Figura
Bolitoglossa mexicana colectada en Finca La Sirena, Izabal



Figura
Ptychohyla euthysanota colectada en Finca Los Andes, Suchitepéquez



Figura
Buscando salamandras en Finca Buena Vista, Zacapa.



Figura 57
“Don Chilo” de la Aldea Santa Rosalía, Esquipulas, desinfectando sus botas.




Apéndice H

Permisos de colecta del CONAP

Figura

Licencia de investigación del CONAP


Formo 13

CONSEJO NACIONAL DE AREAS PROTEGIDAS
CONAP
 PRESIDENCIA DE LA REPUBLICA
 GUATEMALA, C. A.

Nº 00437 -A

LICENCIA DE INVESTIGACION

Nº 003-2013

Nombre: Carlos Roberto Viquez Arceán
 Nacionalidad de: Guatemalteco Identificación: 1203240
 Institución: Museo de Historia Natural, Escuela de Biología, USAC
 Si existe contrato administrativo que ampara esta Licencia, especificar referencias: _____

 Título de la Investigación: "Evaluación de la Biodiversidad de Coleópteros en Colecciones de Insectos de los Coleos de las Bases de Datos de Zonas Bajas Verdes, San Marcos, Guatemala"

 Institución nacional que avala la investigación: Museo de Historia Natural, Escuela de Biología, USAC

 Nombre e identificación de otras investigaciones participativas:
 1. Cuatro Ruinas A-1 1866140
 2. La Cueva T-2 63439
 3. José de Guzmán A-1 80268
 4. Alejandra Zamora A-1 172847
 5. _____
 El solicitante ha sido autorizado por el Consejo Nacional de Areas Protegidas para efectuar la investigación que se describe en los términos siguientes:

Fecha de Emisión: Guatemala, 23 de junio de 2013
 Fecha de Vencimiento: Guatemala, 23 de junio de 2013

CONSEJO NACIONAL DE AREAS PROTEGIDAS (CONAP)
GUATEMALA, C.A.

Nº 12820

Localidades, especies e información de las colectas

Eficiencia de Colecta o Aprovechamiento de Vida Silvestre

1. Nombre o razón social: Carlos Rojas y Asociados
 Dirección: Calle Mariscal Cruz 1-67, Zona 10
 Teléfono: 5224-9267 Identificación: A-1-500800
2. Tipo de colecta: comercial científica aficionada
3. No. de registro: 103-2006

4. Especies a colectar:

ESPECIES	CANTIDAD	FORMA
Aibos	5 por especies	Preservados/Tubo en alcohol
Sangre de araña	1 por especie	En vial
	100	

5. Ubicación de la colecta o aprovechamiento: San Marcos, Zona Bajío, Zona 10
6. Número de registro de la propiedad: _____
7. Técnicas de colecta autorizadas: colecta manual
8. Nombre de colector(es) autorizado(s) e identificación: Guillermo Reina A.S. # 1320183; Lisa Castro C. # 1320183
José Carlos A. # 1320183; Margarita Zamora # 1320183
9. Localidad de traspaso de material colectado: Municipio Hecus, Actual Escuela de Siquia, USAC
- Lugar y fecha de emisión: Guatemala 23 de junio de 2011
- Válido hasta: Guatemala 23 de junio de 2011

dice I

Cuadro
Localidades, especies e información de las colectas

Municipio, Departamento	Localidad	Coord.	MSN M	#	Género	Especie	Micro hábitat	Colectores	# colecta	Hora	Fecha
La Unión, Zacapa	Quebrada antes de cumbre de bosque municipal	14.95835;-89.28226	1216	Baz 001	<i>Bolitoglossa</i>	<i>rufescens</i>	Hoja	J. Conde	AJCP 117	23:10	04/IX/10
La Unión, Zacapa	Quebrada antes de cumbre de bosque municipal	14.95835;-89.28226	1216	Baz 002	<i>Craugastor</i>	<i>laticeps</i>	Hoja	G. Ruano	GRF 276	23:00	04/IX/10
La Unión, Zacapa	Carretera entrada a La Unión	14.95835;-89.28226	1216	Baz 003	<i>Lithobates</i>	<i>berlandieri</i>	Charca de carretera	J. Conde, A. Zamora, C. Vásquez, L. García, G. Ruano	CRVA 2075	23:00	05/IX/10
La Unión, Zacapa	Carretera entrada a La Unión	14.95835;-89.28226	1216	Baz 004	<i>Lithobates</i>	<i>berlandieri</i>	Charca de carretera	J. Conde, A. Zamora, C. Vásquez, L. García, G. Ruano	CRVA 2076	23:00	05/IX/10
La Unión, Zacapa	Carretera entrada a La Unión	14.95835;-89.28226	1216	Baz 005	<i>Lithobates</i>	<i>berlandieri</i>	Charca de carretera	J. Conde, A. Zamora, C. Vásquez, L. García, G. Ruano	CRVA 2077	23:00	05/IX/10
La Unión, Zacapa	Carretera entrada a La Unión	14.95835;-89.28226	1216	Baz 006	<i>Lithobates</i>	<i>berlandieri</i>	Charca de carretera	J. Conde, A. Zamora, C. Vásquez, L. García, G. Ruano	AJCP 118	23:00	05/IX/10
Las Granadillas, Zacapa	RNP Bosque de Finca Bella Vista	14.98928;-89.42013	1222	Baz 007	<i>Craugastor</i>	<i>laticeps</i>	Hojas ca	J. Conde, A. Zamora, C. Vásquez, L. García, G. Ruano	CRVA 2086	22:07	08/IX/10
Las Granadillas, Zacapa	RNP Bosque de Finca Bella Vista	14.98928;-89.42013	1222	Baz 008	<i>Hypopachus</i>	<i>variolosus</i>	Hojas ca	J. Conde, A. Zamora, C. Vásquez, L. García, G. Ruano	AJC 123	22:32	08/IX/10
Las Granadillas, Zacapa	RNP Bosque de Finca Bella Vista	14.98928;-89.42013	1222	Baz 009	<i>Craugastor</i>	sp.	Hojas ca	J. Conde, A. Zamora, C. Vásquez, L. García, G. Ruano	LGR 014	22:25	08/IX/10
Las Granadillas, Zacapa	Quebrada Este RNP Bosque Finca Bella Vista	14.92646;-89.42097	1212	Baz 010	<i>Bolitoglossa</i>	<i>rufescens</i>	Hojas ca	J. Conde, A. Zamora, C. Vásquez, L. García, G. Ruano	LGR 017	21:45	08/IX/10
Las Granadillas, Zacapa	Quebrada Este RNP Bosque Finca Bella Vista	14.92646;-89.42097	1212	Baz 011	<i>Craugastor</i>	<i>rostralis</i>	Hojas ca	J. Conde, A. Zamora, C. Vásquez, L. García, G. Ruano	GRF 286	22:25	08/IX/10
Las Granadillas, Zacapa	Quebrada Este RNP Bosque Finca Bella Vista	14.92646;-89.42097	1212	Baz 012	<i>Bolitoglossa</i>	<i>rufescens</i>	Hojas ca	J. Conde, A. Zamora, C. Vásquez, L. García, G. Ruano	OAZ 96	22:06	08/IX/10
Las Granadillas, Zacapa	Quebrada Este RNP Bosque Finca Bella Vista	14.92646;-89.42097	1212	Baz 013	<i>Craugastor</i>	<i>laticeps</i>	Hojas ca	J. Conde, A. Zamora, C. Vásquez, L. García, G. Ruano	AJCP 126	22:17	08/IX/10
Las Granadillas, Zacapa	Quebrada Este RNP Bosque Finca Bella Vista	14.92646;-89.42097	1212	Baz 014	<i>Craugastor</i>	<i>laticeps</i>	Hojas ca	J. Conde, A. Zamora, C. Vásquez, L. García, G. Ruano	AJCP 127		08/IX/10
Las Granadillas, Zacapa	Quebrada Este RNP Bosque Finca Bella Vista	14.92646;-89.42097	1212	Baz 015	<i>Hypopachus</i>	<i>variolosus</i>	Hojas ca	J. Conde, A. Zamora, C. Vásquez, L. García, G. Ruano	CRVA 2087	18:55	08/IX/10
Las Granadillas, Zacapa	Quebrada Oeste RNP Bosque Finca Bella Vista	14.92966;-89.41877	1242	Baz 016	<i>Plectrohyla</i>	<i>matudai</i>		A. Zamora, Jacabo Conde, G. Ruano	NC	15:53	09/IX/10
Las Granadillas, Zacapa	Quebrada Oeste RNP Bosque Finca Bella Vista	14.92966;-89.41877	1242	Baz 017	<i>Smilisca</i>	<i>baudinii</i>		A. Zamora, Jacabo Conde, G. Ruano	AJCP 128	16:58	09/IX/10

Municipio, Departamento	Localidad	Coord.	MSN M	#	Género	Especie	Micro habitat	Colectores	# colecta	Hora	Fecha
Las Granadillas, Zacapa	Quebrada Oeste RNP Bosque Finca Bella Vista	14.92966;-89.41877	1242	Baz 018	<i>Plectrohyla</i>	<i>matudai</i>		A. Zamora, C. Vásquez, L. García, G. Ruano	NC		09/IX/10
Las Granadillas, Zacapa	Quebrada Oeste RNP Bosque Finca Bella Vista	14.92966;-89.41877	1242	Baz 019	<i>Ptychohyla</i>	<i>hypomykter</i>		A. Zamora, C. Vásquez, L. García, G. Ruano	AJCP 131		09/IX/10
La Unión, Zacapa	Carretera camino a Jocotán	14.90651;-89.3247	1345	Baz 020	<i>Erythronotus</i>	<i>pustulosus</i>	Suelo	A. Zamora, C. Vásquez, L. García, G. Ruano	LGR 021	21:20	12/IX/10
La Unión, Zacapa	Carretera camino a Jocotán	14.90651;-89.3247	1345	Baz 021	<i>Erythronotus</i>	<i>pustulosus</i>	Suelo	A. Zamora, C. Vásquez, L. García, G. Ruano	CRVA 2112	21:20	12/IX/10
La Unión, Zacapa	Carretera camino a Jocotán	14.90651;-89.3247	1345	Baz 022	<i>Smilisca</i>	<i>baudini</i>		A. Zamora, C. Vásquez, L. García, G. Ruano	CRVA 2110	21:20	12/IX/10
La Unión, Zacapa	Carretera camino a Jocotán	14.90651;-89.3247	1345	Baz 023	<i>Smilisca</i>	<i>baudini</i>		A. Zamora, C. Vásquez, L. García, G. Ruano	CRVA 2111	21:20	12/IX/10
Caserio Nuevo San Francisco, San Marcos	Quebrada camino a Finca Argentina	15.00421;-92.01503	971	Baz 024	<i>Lithobates</i>	<i>maculatus</i>	Hoja	G. Ruano	GRF 296	19:30	25/IX/10
Caserio Nuevo San Francisco, San Marcos	Quebrada camino a Finca Argentina	15.00421;-92.01503	971	Baz 025	<i>Lithobates</i>	<i>maculatus?</i>	Hojarasca	G. Ruano	GRF 297	19:30	25/IX/10
Caserio Nuevo San Francisco, San Marcos		14.99035;-92.01421	874	Baz 026	<i>Craugastor</i>	sp.	Hojarasca	G. Ruano	GRF 298	06:45	26/IX/10
Caserio Nuevo San Francisco, San Marcos		14.99035;-92.01421	874	Baz 027	<i>Plectrohyla</i>	<i>matudai</i>	Hoja	G. Ruano	GRF 300	06:45	26/IX/10
Santa Bárbara, Suchitepéquez	Finca Los Andes	14.54922;-91.182	1470	Baz 028	<i>Craugastor</i>	<i>rhodophis</i>	Hojarasca	G. Ruano, L. García	NC	14:15	29/IX/10
Santa Bárbara, Suchitepéquez	Cafetal UE, Finca Los Andes	14.54491;-91.1815	1386	Baz 029	<i>Craugastor</i>	<i>rhodophis</i>	Palo en cafetal	G. Ruano, L. García	NC	21:18	29/IX/10
Santa Bárbara, Suchitepéquez	Finca Los Andes	14.54922;-91.182	1470	Baz 030	<i>Craugastor</i>	sp.		G. Ruano, L. García	GRF 321		29/IX/10
Santa Bárbara, Suchitepéquez	Finca Los Andes	14.54922;-91.182	1470	Baz 031	<i>Craugastor</i>	<i>rhodophis</i>		G. Ruano, L. García	GRF 320		29/IX/10
Santa Bárbara, Suchitepéquez	Finca Los Andes	14.54922;-91.182	1470	Baz 032	<i>Craugastor</i>	<i>rhodophis</i>		G. Ruano, L. García	GRF 318		29/IX/10

Municipio, Departamento	Localidad	Coord.	MSN M	#	Género	Especie	Micro hábitat	Colectores	# colecta	Hora	Fecha
Santa Bárbara, Suchitepéquez	Quebrada Santa Mónica, Finca Los Andes	14.53344;-91.1869	1243	Baz 033	<i>Plectrohyla</i>	<i>sagorum</i>	Quebrada	G. Ruano, L. García	GRF 309	23:30	29/X/10
Santa Bárbara, Suchitepéquez	Quebrada Santa Mónica, Finca Los Andes	14.53344;-91.1869	1243	Baz 034	<i>Ptychohyla</i>	<i>euthysanota</i>	Hoja	G. Ruano, L. García	GRF 312	23:50	29/X/10
Santa Bárbara, Suchitepéquez	Quebrada Santa Mónica, Finca Los Andes	14.53344;-91.1869	1243	Baz 035	<i>Ptychohyla</i>	<i>euthysanota</i>	Hoja	G. Ruano, L. García	GRF 311	00:00	29/X/10
Santa Bárbara, Suchitepéquez	Quebrada Santa Mónica, Finca Los Andes	14.53344;-91.1869	1243	Baz 036	<i>Ptychohyla</i>	<i>euthysanota</i>	Hoja de platano	G. Ruano, L. García	GRF 313	00:00	29/X/10
Santa Bárbara, Suchitepéquez	Cafetal UE, Finca Los Andes	14.54491;-91.1815	1386	Baz 037	<i>Craugastor</i>	<i>rhodophis</i>	Cafetal	G. Ruano, L. García	GRF 308	21:30	29/X/10
Santa Bárbara, Suchitepéquez	Cafetal UE, Finca Los Andes	14.54491;-91.1815	1386	Baz 038	<i>Craugastor</i>	<i>rhodophis</i>	Hojas ca	G. Ruano, L. García	GRF 306	20:51	29/X/10
Santa Bárbara, Suchitepéquez	Finca Los Andes	14.54922;-91.182	1470	Baz 039	<i>Lithobates</i>	<i>maculatus</i>		G. Ruano, L. García	GRF 327		
Santa Bárbara, Suchitepéquez	Bosque Manaqui	14.53344;-91.1869	1243	Baz 040	<i>Plectrohyla</i>	<i>matudai</i>	Hoja	G. Ruano, L. García	GRF 317	22:20	30/X/10
Tajumulco, San Marcos	La Trinidad, Quebrada Río Tzoc	14.99493;-91.91782	1759	Baz 041	<i>Plectrohyla</i>	<i>matudai</i>	Arroyo	J. Conde, C. Vásquez	AJCP 145	23:17	09/XI/10
Tajumulco, San Marcos	La Trinidad, Quebrada Río Tzoc	14.99493;-91.91782	1759	Baz 042	<i>Plectrohyla</i>	<i>matudai</i>	Arbustos	J. Conde, C. Vásquez, L. García, G. Ruano, A. Zamora y R. Romero	CRVA 2343	23:17	09/XI/10
Tajumulco, San Marcos	La Trinidad, Sector Chiquiluite	14.99352;-91.91702	1870	Baz 043	<i>Bolitoglossa</i>	<i>flavimembris</i>	Bromelia	J. Conde, C. Vásquez, L. García, G. Ruano, A. Zamora y R. Romero	AJCP 140	11:37	09/XI/10
Tajumulco, San Marcos	La Trinidad, Sector Chiquiluite	14.99352;-91.91702	1870	Baz 044	<i>Bolitoglossa</i>	<i>flavimembris</i>	Bromelia	J. Conde, C. Vásquez, L. García, G. Ruano, A. Zamora y R. Romero	CRVA 2325	10:45	09/XI/10
San Rafael Pie de la Cuesta, San Marcos	Reserva del Quetzal	14.93889;-91.87347	1758	Baz 045	<i>Plectrohyla</i>	<i>sagorum</i>	Hojas	J. Conde, C. Vásquez	CRVA 2378	22:30-23:00	14/XI/10
San Rafael Pie de la Cuesta, San Marcos	Reserva del Quetzal	14.93889;-91.87347	1758	Baz 046	<i>Plectrohyla</i>	<i>sagorum</i>	Hojas	J. Conde, C. Vásquez	CRVA 2377	22:30-23:00	14/XI/10
San Rafael Pie de la Cuesta, San Marcos	Reserva del Quetzal	14.93889;-91.87347	1758	Baz 047	<i>Plectrohyla</i>	<i>sagorum</i>	Hojas	J. Conde, C. Vásquez	NC	22:30-23:00	14/XI/10

Municipio, Departamento	Localidad	Coord.	MSN M	#	Género	Especie	Micro hábitat	Colectores	# colecta	Hora	Fecha
San Rafael Pie de la Cuesta, San Marcos	Reserva del Quetzal	14.93889;-91.87347	1758	Baz 048	<i>Plectrohyla</i>	<i>sagorum</i>	Hojas	J. Conde, C. Vásquez	NC	22:30-23:00	14/XI/10
San Rafael Pie de la Cuesta, San Marcos	Reserva del Quetzal	14.93889;-91.87347	1758	Baz 049	<i>Craugastor</i>	<i>lineatus</i>	Hojas	G. Ruano, L. García, A. Zamora	GRF 343	23:05	14/XI/10
Salamá, Baja Verapaz	Chilascó, Piedras Quebradas	15.06489;-90.06073	2122	Baz 050	<i>Bolitoglossa</i>	<i>helmrichi</i>	Tallo	J. Conde, E. Leiva, A. Zamora	OAZ 034	21:30	24/II/11
Salamá, Baja Verapaz	Chilascó, Piedras Quebradas	15.06315;-90.06183	1997	Baz 051	<i>Bolitoglossa</i>	<i>helmrichi</i>	Hoja	J. Conde, A. Zamora, L. García	LGR 040A	22:09	25/II/11
Salamá, Baja Verapaz	Chilascó, Piedras Quebradas	15.06315;-90.06183	1997	Baz 052	<i>Craugastor</i>	<i>bocourti</i>		J. Conde, A. Zamora, L. García	LGR 041	22:43	25/II/11
Purullá, Baja Verapaz	Biotopo del Quetzal (Sendero de los Helechos)	15.21101;-90.21598	1790	Baz 053	<i>Craugastor</i>	<i>lineatus</i>	Suelo	C. Vásquez, A. Zamora	AJCP 171	22:53	26/II/11
Purullá, Baja Verapaz	Biotopo del Quetzal (Sendero de los Helechos)	15.21101;-90.21598	1790	Baz 054	<i>Bolitoglossa</i>	<i>helmrichi</i>	Hoja	C. Vásquez, A. Zamora	CRVA 2453	22:52	26/II/11
Purullá, Baja Verapaz	Biotopo del Quetzal (Sendero de los Helechos)	15.21101;-90.21598	1790	Baz 055	<i>Plectrohyla</i>	<i>pokomchi</i>	Hoja	C. Vásquez, A. Zamora	CRVA 2452	22:15	26/II/11
Purullá, Baja Verapaz	Biotopo del Quetzal (Sendero de los Helechos)	15.21101;-90.21598	1790	Baz 056	<i>Craugastor</i>	<i>lineatus</i>	Orilla sendero	C. Vásquez, A. Zamora	OAZ 039	22:20	26/II/11
Purullá, Baja Verapaz	Biotopo del Quetzal (Sendero de los Helechos)	15.21101;-90.21598	1790	Baz 057	<i>Plectrohyla</i>	<i>queechi</i>	Hoja orillario	C. Vásquez, A. Zamora	CRVA 2451	22:10	26/II/11
Purullá, Baja Verapaz	Biotopo del Quetzal (Sendero de los Helechos)	15.21101;-90.21598	1790	Baz 058	<i>Cryptotriton</i>	<i>veraepacis</i>	Hoja en pared	C. Vásquez, A. Zamora	OAZ 038	22:01	26/II/11
Purullá, Baja Verapaz	Finca Sachut, sendero hacia la izquierda	15.24221;-90.1917	1668	Baz 059	<i>Craugastor</i>	<i>lineatus</i>	Hojas	L. García, C. Vásquez, A. Zamora	CRVA 2470	22:01	28/II/11
Purullá, Baja Verapaz	Finca Sachut, sendero hacia arriba	15.24221;-90.1917	1605	Baz 060	<i>Bolitoglossa</i>	<i>helmrichi</i>	Tronco helecho	L. García, E. Leiva, A. Zamora, J. Conde, C. Vásquez	NC	23:00	28/II/11
Purullá, Baja Verapaz	Finca Sachut, sendero hacia la izquierda	15.24221;-90.1917	1668	Baz 061	<i>Craugastor</i>	<i>lineatus</i>	Hoja	L. García, E. Leiva, A. Zamora, J. Conde, C. Vásquez	OAZ 42	22:06	29/II/11
Huehuetenango	Aldea Buenos Aires Chiblac	15.87882;-91.24893		Baz 062	<i>Craugastor</i>	<i>xucanebi</i>		J.M. Pérez, M. Oliva, E. López	NC		
Huehuetenango	Aldea Buenos Aires Chiblac	15.87882;-91.24893		Baz 063	<i>Craugastor</i>	<i>xucanebi</i>		J.M. Pérez, M. Oliva, E. López	NC		

Municipio, Departamento	Localidad	Coord	MSN M	#	Género	Especie	Micro hábitat	Colectores	# colecta	Hora	Fecha
Huehuetena	Aldea Buenos Aires Chiblac	15.87882;-91.24893		Baz 064	<i>Craugastor</i>	<i>lineatus?</i>		J.M. Pérez, M. Oliva, E. López	NC		
Huehuetena	Aldea Buenos Aires Chiblac	15.87882;-91.24893		Baz 065	<i>Craugastor</i>			J.M. Pérez, M. Oliva, E. López	NC		
Huehuetena	Aldea Buenos Aires Chiblac	15.87882;-91.24893		Baz 066	<i>Craugastor</i>			J.M. Pérez, M. Oliva, E. López	NC		
Huehuetena	Aldea Buenos Aires Chiblac	15.87882;-91.24893		Baz 067	<i>Craugastor</i>	<i>xucanebi</i>		J.M. Pérez, M. Oliva, E. López	NC		
Huehuetena	Aldea Buenos Aires Chiblac	15.87882;-91.24893		Baz 068	<i>Craugastor</i>	<i>xucanebi?</i>		J.M. Pérez, M. Oliva, E. López	NC		
Huehuetena	Aldea Buenos Aires Chiblac	15.87882;-91.24893		Baz 069	<i>Hyalinobatrachium</i>	<i>fleischmanni</i>		J.M. Pérez, M. Oliva, E. López	NC		
La Union, Zacapa	Cumbre de Bosque Municipal	14.94364;-89.27607	1452	Baz 070	<i>Bolitoglossa</i>	<i>rufescens</i>	Hoja	L. García, J. Conde, C. Vásquez, G. Ruano, A. Zamora	NC	24:10:00	22/II/11
Las Granadillas, Zacapa	RNP Bosque de Finca Bella Vista	14.98928;-89.42013	1222	Baz 071	<i>Lithobates</i>	sp.	Sobre río	J. Conde, C. Vásquez	AJCP 194	23:00	23/II/11
Las Granadillas, Zacapa	RNP Bosque de Finca Bella Vista	14.98928;-89.42013	1222	Baz 072	<i>Psychohyla</i>	<i>hypomykter</i>	Hoja	J. Conde, C. Vásquez	AJCP 205	23:00	24/II/11
Las Granadillas, Zacapa	RNP Bosque de Finca Bella Vista	14.98928;-89.42013	1222	Baz 073	<i>Psychohyla</i>	<i>hypomykter</i>	Hoja	J. Conde, C. Vásquez	CRVA 2534	23:10	24/II/11
Las Granadillas, Zacapa	RNP Bosque de Finca Bella Vista	14.98928;-89.42013	1222	Baz 074	<i>Plectrohyla</i>	<i>matudai</i>	Tallo	J. Conde, C. Vásquez	AJCP 204	22:36	24/II/11
La Union, Zacapa	Brecha 2 Timuxan	14.90733;-89.32535	1227	Baz 075	<i>Bolitoglossa</i>	<i>conanti</i>	Hoja	L. García, J. Conde, C. Vásquez	LGR 076	22:35	26/II/11
La Union, Zacapa	Brecha 2 Timuxan	14.90733;-89.32535	1227	Baz 076	<i>Bolitoglossa</i>	<i>conanti</i>	Hoja	L. García, J. Conde, C. Vásquez	CRVA 2540	20:03	26/II/11
La Union, Zacapa	Brecha 2 Timuxan	14.90733;-89.32535	1227	Baz 077	<i>Bolitoglossa</i>	<i>conanti</i>	Hoja	L. García, J. Conde, C. Vásquez	LGR 070	20:50	26/II/11
Livingston, Izabal	Finca La Sirena (Lado Norte)	15.71485;-88.86066	10	Baz 078	<i>Tlalocohyla</i>	<i>picta</i>	Hoja	E. López, M. Oliva, A. Zamora, D. Ariano	NC	20:26	04/III/11
Livingston, Izabal	Finca La Sirena (Lado Norte)	15.71485;-88.86066	10	Baz 079	<i>Tlalocohyla</i>	<i>picta</i>	Hoja	E. López, M. Oliva, A. Zamora, D. Ariano	NC	20:31	04/III/11
Livingston, Izabal	Finca La Sirena (Lado Norte)	15.71485;-88.86066	10	Baz 080	<i>Dendropsophus</i>	<i>microcephalus</i>	Tallo	E. López, M. Oliva, A. Zamora, D. Ariano	NC	20:35	04/III/11

Municipio, Departamento	Localidad	Coord.	MSN M	#	Género	Especie	Micro hábitat	Colectores	# colecta	Hora	Fecha
Livingston, Izabal	Finca la Sirena. Sendero de campamento	15.70139;-88.85222	135	Baz 081	<i>Craugastor</i>	<i>sabrinus</i>	Hojarascas	E. López, M. Oliva, A. Zamora	NC	16:05	05/III/11
Livingston, Izabal	Finca la Sirena. Sendero de campamento	15.70139;-88.85222	135	Baz 082	<i>Craugastor</i>	sp.	Hojarascas	E. López, M. Oliva, A. Zamora	NC	20:00	05/III/11
Livingston, Izabal	Finca la Sirena. Sendero de campamento	15.70139;-88.85222	135	Baz 083	<i>Craugastor</i>	<i>sabrinus</i>	Pared	E. López, M. Oliva, A. Zamora	NC	20:07	05/III/11
Livingston, Izabal	Finca la Sirena. Sendero de campamento	15.70139;-88.85222	135	Baz 084	<i>Bolitoglossa</i>	<i>rufescens</i>	Hoja	E. López, M. Oliva, A. Zamora	NC	20:15	05/III/11
Livingston, Izabal	Finca la Sirena. Sendero de campamento	15.70139;-88.85222	135	Baz 085	<i>Craugastor</i>	<i>sabrinus</i>	Hoja	E. López, M. Oliva, A. Zamora	NC	21:14	05/III/11
Livingston, Izabal	Finca la Sirena. Sendero de campamento	15.70139;-88.85222	135	Baz 086	<i>Craugastor</i>		Hoja	E. López, M. Oliva, A. Zamora	NC	21:21	05/III/11
Livingston, Izabal	Finca la Sirena. Sendero de campamento	15.70139;-88.85222	135	Baz 087	<i>Craugastor</i>	<i>sabrinus</i>	Hoja	E. López, M. Oliva, A. Zamora	NC	21:24	05/III/11
Livingston, Izabal	Finca La Sirena. Sendero cataratas	15.70001;-88.84989	95	Baz 088	<i>Craugastor</i>	<i>sabrinus</i>	Hojarascas	E. López, M. Oliva, A. Zamora	NC	21:34	05/III/11
Livingston, Izabal	Finca La Sirena. Sendero cataratas	15.70001;-88.84989	95	Baz 089	<i>Craugastor</i>	<i>sabrinus</i>	Hojarascas	E. López, M. Oliva, A. Zamora	NC	21:41	05/III/11
Livingston, Izabal	Finca La Sirena. Sendero cataratas	15.70001;-88.84989	95	Baz 090	<i>Craugastor</i>		Piedra	E. López, M. Oliva, A. Zamora	NC	22:15	05/III/11
Livingston, Izabal	Finca La Sirena. Sendero cataratas	15.70001;-88.84989	95	Baz 091	<i>Hyalinobatrachium</i>	<i>fleischmanni</i>	Hoja	E. López, M. Oliva, A. Zamora	NC	21:43	05/III/11
Livingston, Izabal	Finca La Sirena. Sendero cataratas	15.70001;-88.84989	95	Baz 092	<i>Craugastor</i>	<i>sabrinus</i>	Piedras	E. López, M. Oliva, A. Zamora	NC	22:25	05/III/11
Livingston, Izabal	Finca La Sirena. Campamento	15.70096;-88.8518	105	Baz 093	<i>Bolitoglossa</i>	<i>rufescens</i>	Palmeria	D. Ariano	NC	10:30	05/III/11
Livingston, Izabal	Finca La Sirena. Sendero cataratas	15.70001;-88.84989	95	Baz 094	<i>Bolitoglossa</i>	<i>mexicana</i>	Hoja	D. Ariano	NC	18:40	05/III/11
Livingston, Izabal	Finca La Sirena. Pocita del campamento	15.70096;-88.8518	105	Baz 095	<i>Incilius</i>	<i>campbelli</i>	Suelo	D. Ariano	NC	19:00	05/III/11
Livingston, Izabal	Finca La Sirena. Campamento	15.70096;-88.8518	105	Baz 096	<i>Craugastor</i>	<i>sabrinus</i>	Hojarascas	D. Ariano	NC	19:30	05/III/11
Livingston, Izabal	Finca La Sirena. Pocita del campamento	15.70096;-88.8518	105	Baz 097	<i>Craugastor</i>	<i>sabrinus</i>	Piedras	D. Ariano	NC	19:00	05/III/11

Municipio, Departamento	Localidad	Coord.	MSN M	#	Género	Especie	Micro hábitat	Colectores	# colecta	Hora	Fecha
Morales, Izabal	Sierra de Caral	15.40708;-88.69541	540	Baz 098	<i>Oedipina</i>	<i>elongata</i>		J.M. Pérez, M. Oliva, D. Da Costa, M. Acevedo, A. Zamora			02/XII/11
Morales, Izabal	Sierra de Caral	15.40708;-88.69541	540	Baz 099	<i>Oedipina</i>	<i>elongata</i>	Hojarascas	J.M. Pérez, M. Oliva, D. Da Costa, M. Acevedo, A. Zamora		21:00	04/XII/11
Morales, Izabal	Sierra de Caral	15.40708;-88.69541	540	Baz 100	<i>Bolitoglossa</i>	<i>duani</i>		J.M. Pérez, M. Oliva, D. Da Costa, M. Acevedo, A. Zamora			02/XII/11
Cabañas, Zacapa	Reserva del Heloderma (Quebrada Calderón)	14.868;-89.79	600	Baz 101	<i>Smilisca</i>	<i>baudini</i>	Sobrerío	E. López, M. Oliva, A. Zamora	NC	21:35	19/II/11
San Rafael Pie de la Cuesta, San Marcos	Reserva del Quetzal	14.93889;-91.87347	1758	Baz 102	<i>Plectrohyla</i>	<i>sagorum</i>	Tallo	L. García, E. López, E. Leiva	NC	23:28	26/II/11
San Rafael Pie de la Cuesta, San Marcos	Reserva del Quetzal	14.93889;-91.87347	1758	Baz 103	<i>Bolitoglossa</i>	<i>engelhardti</i>	Dentro tronco	E. López, L. García, E. Leiva	OAZ 049	24:35:00	26/II/11
San Rafael Pie de la Cuesta, San Marcos	Reserva del Quetzal	14.93889;-91.87347	1758	Baz 104	<i>Bolitoglossa</i>	<i>flavimembris</i>	Varanda	A. Zamora, G. Ruano, E. López, L. García, E. Leiva	OAZ 051	22:57	25/III/2011
Tajumulco, San Marcos	Aldea La Trinidad	14.99993;-91.92301	1723	Baz 105	<i>Plectrohyla</i>	<i>matudai</i>	Hoja sobre quebrada	G. Ruano, L. García, A. Zamora, E. López, R. Romero	GRF 422	23:58	08/IV/11
Tajumulco, San Marcos	Aldea La Trinidad	14.99993;-91.92301	1723	Baz 106	<i>Plectrohyla</i>	<i>matudai</i>	Tallo	G. Ruano, L. García, A. Zamora, E. López, R. Romero	NC	24:01	09/IV/11
Tajumulco, San Marcos	Aldea La Trinidad	14.99993;-91.92301	1723	Baz 107	<i>Plectrohyla</i>	<i>matudai</i>	Hoja	G. Ruano, L. García, A. Zamora, E. López, R. Romero	NC	24:04	09/IV/11
Tajumulco, San Marcos	Aldea La Trinidad	14.99993;-91.92301	1723	Baz 108	<i>Plectrohyla</i>	<i>matudai</i>	Hoja en tronco	G. Ruano, L. García, A. Zamora, E. López, R. Romero	OAZ 057	24:05	09/IV/11
Tajumulco, San Marcos	Aldea La Trinidad	14.99993;-91.92301	1723	Baz 109	<i>Plectrohyla</i>	<i>guatemalensis</i>	Hoja	G. Ruano, L. García, A. Zamora, E. López, R. Romero	OAZ 054	24:06	09/IV/11
Tajumulco, San Marcos	Aldea La Trinidad	14.99993;-91.92301	1723	Baz 110	<i>Plectrohyla</i>	<i>matudai</i>	Hoja	G. Ruano, L. García, A. Zamora, E. López, R. Romero	OAZ 055	24:04	09/IV/11
Tajumulco, San Marcos	Aldea La Trinidad	14.99993;-91.92301	1723	Baz 111	<i>Plectrohyla</i>	<i>matudai</i>	Hoja en quebrada	G. Ruano, L. García, A. Zamora, E. López, R. Romero	NC	24:11	09/IV/11
Tajumulco, San Marcos	Aldea La Trinidad	14.99993;-91.92301	1723	Baz 112	<i>Plectrohyla</i>	<i>matudai</i>	Hoja en quebrada	G. Ruano, L. García, A. Zamora, E. López, R. Romero	OAZ 056	24:13	09/IV/11
Tajumulco, San Marcos	Aldea La Trinidad	14.99993;-91.92301	1723	Baz 113	<i>Craugastor</i>	<i>loki</i>	Hojarascas	G. Ruano, L. García, A. Zamora, E. López, R. Romero	LGR 081	24:23	09/IV/11

Municipio, Departamento	Localidad	Coord.	MSN M	#	Género	Especie	Micro hábitat	Colectores	# colecta	Hora	Fecha
Purulhá, Baja Verapaz, Chiquimula	Aldea Santa Rosalía, Río Piedra (sendero)	15.20053;-90.20636;-89.36172	1616	Baz 117	<i>Plectrohyla</i>	<i>salvadorensis</i>	Hoja	G. Ruano, L. García, C. Vázquez, Zamora, J. Conde	CRVA 2020	21:22	15/V/10
Baja Verapaz	Aldea Santa Rosalía, Cafetal Plan de La A. sendero	15.20053;-90.20636	1616	Baz 118	<i>Psychohyla</i>	<i>hypomykter</i>	Rama	C. Vázquez, Zamora, J. Conde	NC	21:30	16/V/10
Chiquimula	Aldea Santa Rosalía, Cafetal Plan de La A. sendero	14.50263;-89.36172	1368	Baz 135	<i>Psychohyla</i>	<i>salvadorensis</i>	Hoja	G. Ruano, L. García, S. Secaira, A. Zamora	OAZ 070	21:29	12/V/11
Verapaz	Aldea Cafetal Santa Rosalía	90.20636	1616	Baz 119	<i>Psychohyla</i>	<i>hypomykter</i>	Rama	Zamora, J. Conde	NC	20:00	16/V/10
Purulhá, Baja Verapaz, Chiquimula	Rosalía, Río Plan de La A. sendero (Cafetal)	14.50063;-90.20474	1848	Baz 120	<i>Psychohyla</i>	<i>hypomykter</i>	Arbust Hoja	G. Ruano, L. García, C. Vázquez, Zamora, J. Conde	GRZ 086	20:48	10/V/10
Purulhá, Baja Verapaz, Chiquimula	Aldea Santa Rosalía, Río Piedra (sendero)	15.20053;-90.20636;-89.36172	1616	Baz 121	<i>Psychohyla</i>	<i>hypomykter</i>	Suelo	G. Ruano, L. García, C. Vázquez, Zamora, J. Conde	CRVA 2019	22:30	15/V/10
Baja Verapaz	Aldea Santa Rosalía, Cafetal Reserva El Duraznal	15.20053;-90.20496;-89.3818	1616	Baz 122	<i>Psychohyla</i>	<i>hypomykter</i>	Tronco	C. Vázquez, Zamora, J. Conde	CRVA 2027	19:55	16/V/10
Chiquimula	Aldea Santa Rosalía	14.516;-89.3848	1700	Baz 139	<i>Psychohyla</i>	<i>salvadorensis</i>	Suelo	S. Secaira, A. Zamora	OAZ 072	11:15	13/V/11
Esquipulas, Baja Verapaz, Chiquimula	Aldea Santa Rosalía	14.516;-89.3848	1700	Baz 139	<i>Psychohyla</i>	<i>salvadorensis</i>	Suelo	A. Contreras	OAZ 077	17:30	13/V/11
Esquipulas, Chiquimula	Campamento Wadil Cafetal	14.50063;-89.38458	1616	Baz 124	<i>Psychohyla</i>	<i>hypomykter</i>	Hoja	G. Ruano, L. García, C. Vázquez, Zamora, J. Conde	CRVA 2025	20:40	16/V/10
Purulhá, Esquipulas, Chiquimula	Campamento Wadil Cafetal	14.50063;-89.38458	1616	Baz 124	<i>Psychohyla</i>	<i>salvadorensis</i>	Aracea Hoja	G. Ruano, L. García, C. Vázquez, Zamora, J. Conde	CRVA 2024	20:45	16/V/10
Esquipulas, Chiquimula	El Maguejal	14.48305;-89.37694	2060	Baz 142	<i>Bolitoglossa</i>	<i>heiroretas</i>	Hojas ca	Javier Ajú	OAZ 078	15:30	14/V/11
Esquipulas, Chiquimula	Fincas Río Frio	14.4723;-89.35558	1470	Baz 143	<i>Psychohyla</i>	<i>salvadorensis</i>	Hoja	A. Zamora	NC	20:03	16/V/11
Esquipulas, Chiquimula	Rosalía, Río Plan de La A. sendero (Fincas Río Frio)	14.4723;-89.35558	1470	Baz 144	<i>Psychohyla</i>	<i>salvadorensis</i>	Hoja	A. Zamora	NC	20:07	16/V/11
Esquipulas, Chiquimula	Fincas Río Frio	14.4723;-89.35558	1470	Baz 145	<i>Psychohyla</i>	<i>salvadorensis</i>	Hoja	A. Zamora	OAZ 083	21:40	16/V/11
Esquipulas, Chiquimula	Aldea Santa Rosalía, Río Plan de La A. sendero	14.50263;-89.36172	1368	Baz 128	<i>Psychohyla</i>	<i>salvadorensis</i>	Hoja	M. Secaira, A. Zamora	OAZ 068	20:27	12/V/11
Chiquimula	Fincas Río Frio	89.35297	1421	Baz 146	<i>Blectrohyla</i>	<i>salvadorensis</i>	Suelo	Zamora, Z. López	OAZ 082	13:28	16/V/11
Santa Rosa, Chiquimula	Rosalía, Río Plan de La A. sendero	14.50263;-89.36172	1368	Baz 129	<i>Lithobates</i>	<i>maculatus</i>	Rocas	S. Secaira, A. Zamora	OAZ 069	20:39	12/V/11
Esquipulas, Chiquimula	Aldea Los Angeles Rosalía, Río Plan de La A. sendero	14.54922;-91.182	1470	Baz 147		<i>euthysanota</i>		L. García, G. Ruano	GRF 329		30/X/10
Esquipulas, Chiquimula	Aldea Santa Rosalía, Río Plan de La A. sendero	14.50263;-89.36172	1368	Baz 130	<i>Craugastor</i>	sp.	Pared	S. Secaira, A. Zamora	OAZ 066	20:52	12/V/11
Esquipulas, Chiquimula	Aldea Santa Rosalía, Río Plan de La A. sendero	14.50263;-89.36172	1368	Baz 131	<i>Lithobates</i>	<i>maculatus</i>	Suelo	S. Secaira, A. Zamora	NC	20:49	12/V/11
Esquipulas, Chiquimula	Aldea Santa Rosalía, Río Plan de La A. sendero	14.50263;-89.36172	1368	Baz 132	<i>Lithobates</i>	<i>forreri?</i>	Suelo	S. Secaira, A. Zamora	OAZ 084	21:01	12/V/11
Esquipulas, Chiquimula	Aldea Santa Rosalía, Río Plan de La A. sendero	14.50263;-89.36172	1368	Baz 133	<i>Psychohyla</i>	<i>salvadorensis</i>	Hoja	S. Secaira, A. Zamora	OAZ 074	21:12	12/V/11

