

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**Relación de quitridiomycosis con el tamaño corporal y modo reproductivo en anfibios  
(Clase: Amphibia) en bosques nubosos de Guatemala**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a large, circular emblem. It features a central figure of a man on horseback, holding a sword, with a mountain range in the background. The figure is surrounded by various symbols, including a lion, a castle, and a cross. The text "UNIVERSITAS SAN CAROLINIENSIS" is written around the top inner edge, and "ACADEMIA COACTEMALENSIS" is written around the bottom inner edge. The motto "CETERAS ORBIS CONSPICUA" is written along the top outer edge, and "INTER PLUS ULTRA" is written along the bottom outer edge.

**LIZA IVETH GARCÍA RECINOS**

**BIÓLOGA**

**Guatemala, Noviembre de 2012**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**Relación de quitridiomycosis con el tamaño corporal y modo reproductivo en anfibios  
(Clase: Amphibia) en bosques nubosos de Guatemala**

**Informe de Tesis**

**Presentado por**

**Liza Iveth García Recinos**

**Para optar al título de**

**BIÓLOGA**

**Guatemala, Noviembre de 2012**

## **JUNTA DIRECTIVA**

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Fausto René Beber García	Vocal IV
Br. Carlos Francisco Porras López	Vocal V

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala por haberme formado en muchos otros sentidos además de académicamente; así como a la Escuela de Biología.

A mis padres y hermanos por su apoyo, por las alegrías, enojos y regaños, por de una u otra forma mostrar su apoyo y saber que están ahí.

A toda mi familia, abuelitos, tías, tíos, primos, primas, sobrinos y sobrinas, por estar siempre presentes apoyando y compartiendo, especialmente a Ana Silvia, Evelyn, Coky, Toto, Any, Jose...

A los amigos por siempre haber estado ahí, compartiendo las cosas buenas y malas, en especial a Ana Silvia, Dulce, Chepe, Boris, Fernando, Ivonne, Jessy, Gandhi, Pilar, Sonia, Ana Luisa, Cristina, Harim, Carmen. A Mervin por su apoyo y consejos en este último tramo, gracias.

Al Museo de Historia Natural –MUSHNAT- por apoyar y ser la contrapartida del proyecto que hizo posible la colecta de datos para este estudio, financiado por la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología –SENACYT- (Fodecyt 70-2009).

Al Lic. Claudio Méndez por su valioso asesoramiento y revisión, y el tiempo invertido en este trabajo. Al Lic. Gustavo Ruano por su apoyo, asesoramiento y observaciones a este trabajo, así como su amistad. A Jorge Jiménez por su apoyo para el análisis estadístico. A Jacobo Conde, Ale Zamora, Gustavo Ruano, Carlos Vásquez, Jorge del Cid, Elida Leiva, Erick López por su apoyo en el trabajo de campo que contribuyó a este estudio y por compartir la pasión por la herpetología.

Al Centro de Datos para la Conservación por abrirme las puertas y permitirme ser parte de su equipo y compartir con ellos, así como el apoyo para trabajar en la tesis. Por su gran apoyo, a las secretarías de la escuela de Biología también.

Un especial agradecimiento a la comunidad de la Aldea La Trinidad, Tajumulco y a la municipalidad de San Rafael Pie de la Cuesta, San Marcos; a la Asociación de Desarrollo Sostenible de Chilascó - ADESOCHI-, Salamá, a CECON y al personal del Biotopo para la Conservación del Quetzal “Mario Dary Rivera”, y a la Familia Xicol (Gustavo, Julián y Roberto Antonio) de la Finca Sachut en Purulhá, Baja Verapaz; a Vicente Franco de la Reserva Bella Vista en el área de Las Granadillas, Zacapa y a la Municipalidad de la Unión, Zacapa, a todos ellos gracias por permitir el acceso a sus bosques y apoyo en el trabajo de campo, y sobre todo por conservar esos bosques tan maravillosos, a pesar de todas las dificultades que esto conlleva en nuestro medio.

Y a todas las personas que de una u otra forma apoyaron la realización de esta tesis.

## **DEDICATORIA**

A mis papás, Ana María y Mauricio, porque sin ellos no habría llegado hasta aquí. Por su apoyo, paciencia, porque aunque a veces no lo crean hemos aprendido mucho de ustedes, sobre todo valores, y por enseñarnos a pensar por nosotros mismos

A mis hermanos, Mauricio, Ceci y Miguel, porque sigamos compartiendo muchas cosas más.

A mi familia, por los que están y los que ya se han ido, por el cariño y estar siempre ahí.

A los amigos incondicionales por hacer de los desvelos, apuros y preocupaciones más fáciles de llevar, así como todos los buenos momentos compartidos durante la carrera y fuera.

A los biólogos y biólogas, para que sigamos adelante y apoyemos el desarrollo con la investigación biológica.

A la Naturaleza, y todas sus expresiones de vida, por ser lo que me apasiona.

## INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	
3.1 Anfibios y su importancia	5
3.2 Diversidad de anfibios en Guatemala	6
3.3 Declives en poblaciones de anfibios y su relación con la quitridiomycosis	7
3.4 Antecedentes de quitridiomycosis en Guatemala	9
3.5 Bosques nubosos	10
3.6 Áreas de Estudio	12
4. JUSTIFICACIÓN	16
5. OBJETIVOS	17
6. HIPÓTESIS	18
7. MATERIALES Y MÉTODOS	19
8. RESULTADOS	24
9. DISCUSIÓN	29
10. CONCLUSIONES	36
11. RECOMENDACIONES	37
12. REFERENCIAS	38
13. ANEXOS	46
Anexo 1. Modelo Lineal Generalizado (GLM) para presencia de Bd	
Anexo 2. Modelo Lineal Generalizado (GLM) para nivel de infección	
Anexo 3. Análisis de razón de probabilidades (“Odds ratio”)	
Anexo 4. Fotografías de algunas de las localidades de colecta y especies estudiadas	

## 1. RESUMEN

Las poblaciones de anfibios están declinando a nivel mundial y la infección denominada quitridiomycosis, causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, es uno de los factores asociados a este fenómeno. Esta enfermedad ya fue registrada para algunas especies en el país, por lo que puede predecirse que sus poblaciones y muchas otras especies asociadas están en riesgo de decaer rápidamente, incluso llegando a la extinción local. Este fenómeno ha sido causa de alarma mundial, debido a que además de la pérdida de biodiversidad, los anfibios son considerados como un elemento base de la cadena trófica y como indicadores de la salud de un ecosistema. El efecto negativo en su resistencia inmunológica causado por la sensibilidad que presentan al cambio climático y otros factores antropogénicos los hace candidatos a presentar nuevas enfermedades provenientes de otros organismos silvestres o ser reservorios de enfermedades re-emergentes que podrían afectar la salud humana. La alta diversidad y endemismo de anfibios en áreas de altitud media de Guatemala, especialmente en bosques nubosos, pone en evidencia la necesidad del estudio del estado de salud y conservación actual de los anfibios de estas regiones. Aunque en la última década se ha realizado una gran cantidad de estudios sobre quitridiomycosis en varias partes del mundo, debido a que afecta a un gran número de especies y que sobrevive en un amplio rango de condiciones, aún falta mucho por estudiar de su patología, incluyendo la forma en que afecta la estructura poblacional de su hospedero pues existen evidencias de que individuos en diferentes etapas de vida son afectados de diferente manera por el hongo. Con la presente investigación se determinó la relación entre la prevalencia y nivel de infección de quitridiomycosis con el tamaño corporal en 7 especies de anfibios, especies con distinto modo reproductivo, tanto del orden Anura como Caudata. Los muestreos se realizaron en tres regiones de Bosque nuboso de Guatemala en los departamentos de Baja Verapaz, Zacapa y San Marcos. La detección del hongo se hizo a través de la técnica de Reacción de la Cadena de Polimerasa de tiempo real (*RT-PCR*, Real Time-Polimerase Chain Reaction). Las variables modo reproductivo y tamaño corporal (LHC) mostraron ser significativas en la presencia o ausencia del hongo Bd, en el modelo lineal generalizado realizado (*GLM*,  $p < 0.001$  y  $p < 0.05$  respectivamente). Como se esperaba las especies de hábitos más asociados al agua presentaron prevalencias y niveles de infección más altos que las de hábitos menos asociados al agua. De las 7 especies de anfibios estudiadas, solamente las dos especies pertenecientes al orden Caudata presentaron una diferencia significativa (*Bolitoglossa*

*conanti*,  $p=0,0057$  y *B. helmrichi*,  $p=0,0236$ ) en el tamaño corporal entre individuos infectados y no infectados, mientras que una de estas dos especies (*B. conanti*) y una rana (*Plectrohyla matudai*) presentaron una correlación positiva significativa entre el tamaño corporal y el nivel de infección (número de zoosporas equivalentes) (correlación de Pearson,  $r=0.99870$ ,  $p<0.0001$  y  $r=0.99871$ ,  $p<0.0001$ , respectivamente). Los resultados apoyan evidencia previa de que para algunas especies sí existe una relación entre estas dos variables, aunque no de la forma esperada, y que para las especies de estudio probablemente se deba a los hábitos de vida.



## 2. INTRODUCCIÓN

Los anfibios son el grupo de vertebrados que más amenazado se encuentra actualmente (un tercio de las especies se encuentra en algún grado de amenaza), debido a la pérdida de su hábitat, contaminación por químicos, enfermedades, cambio climático, entre otras (Young *et al.*, 2004). La preocupación por esta vulnerabilidad aumentó hace un par de décadas, cuando a principios de los años noventa, investigadores alrededor del mundo comenzaron a reportar declives en poblaciones de anfibios, especialmente en áreas prístinas sin señales de perturbación. Al investigar el suceso, encontraron en muchas de estas áreas que un hongo quitrido denominado *Batrachochytrium dendrobatidis* –*Bd*– (descrito en 1999) les causaba una infección epidérmica que puede ser fatal (Berger *et al.*, 1998; Lips, 1998 y 1999; Lips *et al.*, 2006). La piel de los anfibios es delgada y muy permeable, por medio de la cual realizan cierto porcentaje de la respiración (algunos grupos respiran completamente a través de ella) y deben mantenerla húmeda, por ello esta infección en la piel les puede causar la muerte. Debido a esta y otras características, como su complejo ciclo de vida (muchos poseen un estadio larvario y un estadio terrestre), huevos que no poseen cascarón sino una capa gelatinosa que también necesita mantenerse húmeda, y a que no se dispersan mucho, entre otras, los anfibios como grupo son muy sensibles a cambios en su ambiente, acuático y terrestre, y son considerados buenos indicadores del estado de su hábitat. Guatemala se encuentra entre los diez países de América Latina donde los anfibios se encuentran más amenazados, y el primero de Mesoamérica, con más de la mitad de sus especies con algún grado de amenaza (Young *et al.*, 2004). Además de las amenazas mencionadas anteriormente, el hongo *Bd* ya ha sido reportado en el país, representando una amenaza más para sus poblaciones. En otros países, la quitridiomycosis ha causado la reducción drástica de poblaciones enteras en poco tiempo, llegando a incluso a extinguirse poblaciones localmente.

Se han realizado muchos estudios de laboratorio y en el campo, y la virulencia e impacto de *Bd* varía grandemente de una especie a otra y entre poblaciones de la misma especie, esto debido no solo a factores ambientales locales sino a características propias de cada especie (Kilpatrick *et al.*, 2009). Algunos estudios también han demostrado en ciertas especies que los niveles de infección están relacionados con el estadio (juvenil, adulto) y/o el tamaño del individuo (Kriger *et al.* 2006; Burrowes *et al.*, 2008). La mortalidad en ciertos estadios (e.g. juveniles) puede tener

mayores repercusiones que en otras (e.g. larvas) en el número de individuos adultos que son los que se reproducen (Vonesh & De La Cruz, 2002). Además de determinar qué especies se encuentran afectadas en el país, es importante conocer cómo la enfermedad puede afectar la estructura de una población, así como entre especies con diferentes hábitos y así tener una base para determinar la vulnerabilidad de una especie. Los objetivos de este estudio fueron: 1) determinar la relación del nivel de infección de quitridiomycosis y el tamaño corporal en anfibios, 2) comparar la prevalencia y nivel de infección entre los órdenes Anura y Caudata y, 3) comparar la prevalencia y nivel de infección entre especies con modo reproductivo terrestre y especies de modo reproductivo semi-acuático dentro del orden Anura. Para esto se realizaron muestreos en tres regiones del país con bosque nuboso en los departamentos de San Marcos, Baja Verapaz y Zacapa, ya que los reportes previos del hongo han sido en estas áreas y porque en este tipo de bosque es donde se ha encontrado que el hongo es más virulento (Lips, 2006). Para estos muestreos se utilizó la técnica de Relevos por Encuentros Visuales durante la noche, que es el período en que la mayoría de anfibios se encuentran más activos. Para determinar la presencia del hongo se realizó un frote epidérmico en ciertas partes ventrales del individuo (Vredenburg & Briggs, 2007), y esta muestra fue analizada por la técnica de PCR de tiempo real (Boyle *et al.*, 2004). Para el tamaño corporal se midió la longitud hocico-cloaca (LHC) (Kriger *et al.*, 2006).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Anfibios y su importancia

Pertenecen a la Clase Amphibia, entre los vertebrados, y se consideran como la transición entre el hábito acuático y el terrestre. La mayoría presenta ambas formas de vida, de ahí su nombre, generalmente la etapa larvaria acuática y la adulta terrestre. Una de las principales características de este grupo es que sufren metamorfosis, para pasar de una etapa a otra. Otra característica que los distingue de los demás grupos de vertebrados, es que poseen una piel mucosa muy delgada, por medio de la cual pueden respirar, que no presenta ninguna estructura externa como escamas, plumas o pelos. (Duellman y Trueb, 1994)

Existen tres órdenes extantes de anfibios:

- Caudata (con cola): salamandras
- Anura (sin cola): ranas y sapos
- Apoda o Gymnophiona (sin patas): cecílicos

Anfibios en su ecosistema: Como adultos, los anfibios contribuyen a mantener las poblaciones de insectos en equilibrio, debido a sus hábitos alimenticios. Se ha observado en algunos lugares donde los anuros han sido eliminados que las poblaciones de ciertos insectos aumentan, y lo mismo ocurre con poblaciones de algas en arroyos montañosos cuando los renacuajos desaparecen. (Duellman y Trueb, 1994)

El hecho de poseer una piel altamente permeable y huevos sin cascarón, los hace muy vulnerables a cambios drásticos en la calidad del ambiente; esto los convierte en buenos indicadores de calidad ambiental. Especies de anfibios con una distribución geográfica amplia, pueden servir como elementos para el seguimiento de cambios ambientales a escalas incluso subcontinentales. Otras especies, como las salamandras y ranas que pasan toda su vida en plantas epifitas de las selvas, o como los cecílicos que habitan en troncos caídos en los bosques tropicales, pueden tener una distribución geográfica muy reducida o mostrar gran especialización hacia algún hábitat, por lo cual pueden ser útiles como indicadores de perturbaciones locales. (Duellman, 1966; Duellman y Trueb, 1994)

Anfibios y humanos: han sido utilizados en medicina tradicional desde hace milenios. Hay una gran lista de usos e investigaciones con anfibios, principalmente la investigación de los compuestos que segregan a través de la piel, a los que se les han encontrado variados usos medicinales. También se les da un uso alimenticio, como las ancas de rana, que son consumidas por varios pueblos indígenas, pero también se consideran una delicia gastronómica en grandes ciudades. Constituyen una importante fuente de proteína. Otro uso es el de controladores biológicos, por sus hábitos insectívoros, y han sido introducidos en muchas partes del mundo con este fin, aunque no siempre con buenos resultados. (Tyler *et al.*, 2007)

## 2.2 Diversidad de anfibios en Guatemala

Guatemala posee una alta diversidad de anfibios, constituida por 143 especies (3 órdenes, 10 familias y 36 géneros), de éstas, 46 son endémicas nacionales (25 especies de rana, 20 de salamandras y un sapo). Las áreas que presentan mayor endemismo son las zonas de montaña, principalmente los bosques nubosos (Acevedo, 2006; Vásquez-Almazán *et al.*, 2009). Esta alta diversidad se debe a la fisiografía compleja, vegetación y climas variados que presenta el país. También influye la posición geográfica en los trópicos, con invasiones de fauna tanto subtropical como templada. Los anfibios han desarrollado numerosas adaptaciones e invadido prácticamente todos los tipos de hábitat, siendo la temperatura y principalmente la humedad los factores medioambientales que más afectan su distribución en Centroamérica (Duellman, 1966).

Según Campbell y Vannini (1989), los anfibios en el país presentan ciertos patrones de distribución, por ejemplo las salamandras son más abundantes en tierras altas húmedas con clima frío. En el caso de las ranas, son abundantes en casi todas las áreas, aumentando en altitudes medias. En general, la diversidad de anfibios en el país es moderada de 0-800 msnm, disminuyendo mínimamente de 800-1000 msnm, con un marcado aumento en el rango altitudinal de 1300-1700 msnm y disminuyendo lentamente arriba de los 1500 msnm (Campbell y Vannini, 1989).

Los géneros endémicos de la región se restringen casi solamente a las tierras altas del sur de México y Centroamérica Nuclear (para anuros y salamandras), sobre todo en el rango

altitudinal de 800-2800 msnm (Campbell, 1999), casi cada complejo montañoso en Guatemala cuenta con una o varias especies de anfibios endémicas. (Acevedo, 2006)

En Guatemala, el 55% de las especies de anfibios poseen algún grado de amenaza, siendo el país con mayor porcentaje de amenaza para este grupo en Mesoamérica y se encuentra entre los 10 más amenazados de toda América. Las tierras altas del país se encuentran entre las más amenazadas de Mesoamérica y las especies endémicas de ranas, sobre todo las que tienen rangos restringidos a una sola área montañosa, son las más vulnerables a la extinción (Young *et al.*, 2004).

### 2.3 Declives en poblaciones de anfibios y su relación con la quitridiomycosis

Los declives en poblaciones de anfibios se remontan a las décadas de 1970 y 1980, y se han encontrado diversas causas para este fenómeno, entre ellas destrucción de hábitat, contaminación del ambiente, cambio climático, rayos ultravioleta y patógenos (Blaustein y Wake, 1995). En el Parque Zoológico Nacional de Washington D.C., Estados Unidos, ranas de las especies *Dendrobates azureus*, *D. auratus* y *Litoria caerulea* que se encontraban en cautiverio murieron debido a una enfermedad de la piel durante los años 1996 a 1998. Se determinó que el causante de la infección era un organismo intracelular que producía zoosporas características de los hongos del Phylum Chytridiomycota. En 1999, Longcore *et al.* aislaron y cultivaron el hongo obtenido de una rana *D. azureus* y describieron su estructura y morfología, denominándolo como *Batrachochytrium dendrobatidis*, especie y género nuevo (Longcore *et al.*, 1999).

Sin embargo, en la década de los años noventa varios autores documentaron un extraño declive poblacional en América y en Australia. Esto ocurrió, especialmente en áreas de bosque prístino, y estos declives no tenían un factor de causa aparente lo cual llevó a los científicos a realizar estudios en estas áreas (Berger *et al.*, 1998; Lips, 1998 y 1999; Lips *et al.*, 2006). En varias de éstas registraron la presencia de *B. dendrobatidis* en la piel de anfibios, encontrando también varias similitudes que indican el surgimiento de una enfermedad de origen acuático: los declives ocurren abruptamente y en pocos meses, los adultos mueren mientras aún se pueden encontrar renacuajos, que después de la metamorfosis mueren (Berger, 1998; Lips, 1999), por lo que el impacto de la enfermedad en los individuos es específico al estadio y en individuos postmetamórficos el impacto es específico a la especie (Briggs *et al.*, 2005). Se han

diagnosticado 2 órdenes de anfibios, 14 familias y 93 especies infectadas con el hongo en 5 continentes (Speare y Berger, 2004).

El efecto del hongo al llegar a una población de anfibios no siempre es el mismo, pudiendo extinguirse la población localmente mientras que en otros casos puede persistir y llegar a un equilibrio con el patógeno (Kilpatrick *et al.* 2009). Además de las variables ambientales, existen otros factores característicos de la especie (ciclo de vida, modo reproductivo, historia de vida, hábitos) o de una población de dicha especie (estructura poblacional) que influyen en el impacto del hongo, factores que aún no se conocen a cabalidad. Algunos estudios demuestran que la edad o tamaño corporal del individuo están relacionados con la prevalencia y nivel de infección (Kriger *et al.* 2006; Burrowes *et al.* 2008), en este caso, a menor tamaño o los individuos juveniles suelen ser los más afectados, y este grupo puede tener un gran impacto en la sobrevivencia de dicha población (Vonesh & De La Cruz, 2002). Así mismo, la densidad poblacional puede influir en la tasa de contagio entre los individuos.

### *Descripción y Patología*

*Batrachochytrium dendrobatidis* es el primer quitridio patógeno a vertebrados. Sus zoosporas son flageladas y se movilizan en el agua, crece en las células epidérmicas queratinizadas de anfibios (Longcore *et al.*, 1999). La infección en los anfibios produce engrosamiento y erosión de la piel y puede provocar ulceraciones. En renacuajos infecta solo las partes bucales, que son las únicas superficies queratinizadas en este estadio. Esto provoca la pérdida de estas partes en el renacuajo pero no es fatal, hasta que después de la metamorfosis, al propagarse la infección a otras áreas, el individuo muere (Berger *et al.*, 1998). Crece en un amplio rango de temperaturas (4°-25° Celsius), siendo la temperatura óptima de 17°-25° Celsius, por encima de la cual no presenta mayor crecimiento pero puede sobrevivir. Se presume que el contagio se da de individuo a individuo en el apareamiento o en otro tipo de agregaciones (Piotrowsky *et al.*, 2004). También es posible que sobreviva saprofiticamente en el ambiente, en estructuras queratinizadas, hasta infectar a un hospedero (Longcore *et al.*, 1999).

Al igual que otros quitridos, *Bd* presenta un ciclo de vida con dos estadios: a) zoosporas móviles uniflageladas, y b) un talo reproductivo sésil (inmóvil) con un solo zoosporangio. Las

zoosporas son de vida libre (independiente de un sustrato) y al encontrar un hospedero se enquistan y luego se desarrollan en un talo reproductivo del cual se producen y liberan nuevas zoosporas (Berger *et al.*, 1998; Longcore *et al.*, 1999).

### *Origen*

La teoría más aceptada del origen de la quitridiomycosis establece que este patógeno se remonta a Sudáfrica, donde se ha encontrado infecciones en las ranas *Xenopus laevis*, *Afrana fuscigula* y *Strongylopus grayii*. La dispersión global desde este continente se dio por el comercio de *X. laevis*, luego de ser desarrollada una prueba de embarazos en humanos en 1934, enormes cantidades de estos individuos fueron capturados y exportados alrededor del mundo. Esta prueba se basaba en el principio de que la ovulación de *X. laevis* podía ser inducida por la orina de mujeres embarazadas, debido a los altos niveles de la hormona gonadotropina. El comercio global de esta especie ha sido 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, debido a que es fácil mantenerla en cautiverio (Kilpatrick *et al.*, 2009; Weldon, 2004).

Aunque es la teoría más aceptada actualmente, recientemente Goka *et al.* (2009) reporta que existen en Japón diversos haplotipos locales, además se ha identificado signos de infección de *Bd* en un espécimen de la salamandra gigante *Andrias japonicus* colectado en 1902. La combinación de alta diversidad genética y la evidente infección asintomática de *Bd* en especies nativas japonesas ha llevado a postular que *Bd* pudo haber surgido en Asia.

### **2.4 Antecedentes de Quitridiomycosis en Guatemala**

En Guatemala, Campbell reportó también en este periodo el declive poblacional de algunas especies, en particular en algunas regiones montañosas de baja altura en la región del caribe (Campbell, 1998). En el 2004 se documenta el primer caso relacionado a la quitridiomycosis en Guatemala, en el área montañosa de Purulhá, Baja Verapaz, donde se colectaron renacuajos de la especie *Ptychohyla hypomykter* y algunas especies del género *Plectrohyla* con deformidades en partes queratinizadas de la cavidad oral, esta deformidad está relacionada con la presencia de

quitridiomycosis (Mendelson *et al.*, 2004). Este hallazgo era predecible debido a que países vecinos, como México y Costa Rica, reportaron su presencia pocos años antes.

Los primeros registros del hongo confirmados con análisis molecular para el país, son recientes. En el año 2009 Vredenburg y Vásquez-Almazán reportaron la presencia de *B. dendrobatidis* en la salamandra *Bolitoglossa conanti* en el área de La Unión, Zacapa y en la rana *Lithobates berlandieri* en el área de Montaña Chiclera, Morales, Izabal. La detección en *B. conanti* fue de los primeros casos registrados en salamandras arborícolas neotropicales, presentando una alta cantidad de zoosporas sin presentar síntomas clínicos. Así mismo en el departamento de San Marcos, encontraron el hongo en las especies *Bolitoglossa occidentalis*, *B. lincolni*, *Dendrotriton bromeliacius* y el híbrido *Bolitoglossa franklini x lincolni*, en un rango altitudinal de 1200 a 2800 msnm (Rovito *et al.*, 2009).

En países vecinos también han reportado la presencia de *Bd*, como en el Parque Nacional Pico Bonito (Región caribe del Oeste de Honduras) en dos especies, *Craugastor aurilegulus* y *Lithobates maculata* (géneros *Eleutherodactylus* y *Rana* previamente) (Pushendorf *et al.*, 2006). Mencionan también el declive poblacional de otras especies, principalmente de la familia Hylidae como *Plectrohyla guatemalensis*, *Plectrohyla matudai*, *Plectrohyla dasypus*, *Plectrohyla psiloderma* y *Ptychohyla hypomykter*, las cuales presentaron deformidades bucales en renacuajos (McCranie y Castañeda, 2007).

## 2.5 Bosques nubosos

Es difícil definir los bosques nubosos a escala global, parte de la definición más aceptada es: “Los bosques nublados (*Tropical Montane Cloud Forests*) constituyen ecosistemas forestales que normalmente ocurren en una franja altitudinal donde el ambiente se caracteriza por una cobertura de nubes persistente o estacional. Esta persistente nubosidad reduce la radiación solar y el déficit de vapor, llegando a suprimir los procesos de evapotranspiración. La precipitación total que llega al interior del bosque se ve significativamente incrementada por el aporte de la neblina interceptada por la vegetación (precipitación horizontal). Se caracterizan por presentar una proporción alta de epífitas (briofitas, líquenes y helechos) y una reducción en las lianas leñosas. Los suelos en general son húmedos y presentan una gruesa capa de materia orgánica humificada.



Los valores de biodiversidad de árboles, hierbas, arbustos y epífitas son altos, considerando su reducida superficie con relación a la selva tropical lluviosa, en la cual la alta riqueza específica se concentra en los árboles principalmente. Los valores de endemismo son también muy altos. Ocurren en un rango muy amplio de precipitaciones (500-10,000 mm anuales) (Brown y Kappelle, 2001).

En Guatemala, los bosques nubosos presentan alta biodiversidad, en un rango altitudinal entre los aproximadamente 1,200 y 2,400-2,600 msnm en las diferentes regiones montañosas. Se encuentran en los departamentos de Huehuetenango (Sierra de los Cuchumatanes), San Marcos (Cadena Volcánica), Quetzaltenango (Cadena Volcánica), Quiché, Alta Verapaz, Baja Verapaz y Zacapa (Sierra de las Minas) e Izabal. Superficie de bosque nublado, 50,000 ha, de las cuales 20,000 están protegidas. Estas zonas presentan una alta frecuencia de nubosidad durante todo el año, así como una alta precipitación pluvial neta y humedad atmosférica. La temperatura media anual varía entre 12-23°C (para México), para el Volcán de Acatenango es de 12.5-18.5°C. El promedio anual de precipitación pluvial es de 2,000 a 5,000 mm, siendo el período de mayor precipitación entre los meses de mayo a octubre. (Véliz e Islebe, 2001)

Estos bosques son muy importantes en la protección de cuencas hidrográficas y su degradación generalmente afecta negativamente la calidad del agua, así mismo son cruciales por su capacidad de capturar la humedad atmosférica (Brown y Kappelle, 2001).

La cobertura forestal es muy importante para controlar la cantidad de humedad y luz solar en la mayoría de hábitats. En los bosques nubosos el suelo permanece generalmente húmedo a lo largo del año y presenta una capa profunda de materia orgánica, lo cual favorece la presencia de anfibios. Éstos están muy restringidos por condiciones de microhábitat, por lo que su distribución local refleja la presencia o ausencia de estas condiciones (Duellman, 1966). La representación de estos bosques en el sistema de áreas protegidas en la país es casi nula por lo que existe una alta prioridad en su conservación y estudio (Schuster *et al.*, 2000).

## 2.6 Áreas de Estudio

### *Biotopo Universitario “Mario Dary Rivera” para la Conservación del Quetzal y zonas aledañas*

Más conocido como “Biotopo del Quetzal”, se localiza al norte del país, entre los municipios de Salamá y Purulhá en el departamento de Baja Verapaz en el kilómetro 160.5. Sus coordenadas geográficas son Latitud N 15°13'0” y Longitud W 90°13'15". Tiene un perímetro de 29.02 km y un área de 1,044 hectáreas. Fue declarado área protegida en 1986 según Decreto Legislativo 4-89 y sus reformas 18-89 y 110-96. El área es administrada por el Centro de Estudios Conservacionistas de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. (CECON-USAC, 2010)

El rango de elevación del Biotopo es de 1500 a 2300 msnm (Ponciano y Glick, 1979). La mayor parte del área está representada por vegetación de bosque latifoliado que se desarrolla arriba de los 1,500 msnm. La vegetación es bastante abundante, siendo más notable la presencia de plantas características de alta humedad como: helechos, musgos, líquenes, orquídeas y tillandsias que cubren ramas y tallos de árboles con alturas hasta de 30 metros de las especies *Engelhardtia guatemalensis*, Nogal; *Alfaroa costarricensis*; *Magnolia guatemalensis*, Palo puro; *Quercus spp.*, Encino; *Cyathea spp.*, Helecho arborescente; *Dendropanax arbore*, entre otras (Ponciano y Glick, 1980).

La vegetación en el extremo Este del área está representada por 4 especies de coníferas, principalmente por *Pinus tenuifolia*, pino candelillo (Ponciano y Glick, 1980). La lluvia registrada muestra precipitaciones promedio anuales de 2,069.80 mm, siendo los meses menos lluviosos de noviembre a mayo, y los más lluviosos de junio a septiembre. Los registros climáticos de la estación ubicada en Albores, coordenadas UTM Latitud 150303 y Longitud 895800, indican una temperatura promedio anual de 20.04 °C. La humedad relativa promedio oscila entre 85.5% a 95.9%, siendo su promedio anual de 90.7% (INSIVUMEH, 2006).

Los ríos, riachuelos y quebradas existentes en el Biotopo, en general se caracterizan por correr en pendientes sobre terrenos accidentados, lo que define corrientes rápidas, que por la naturaleza de los suelos permite la existencia de aguas cristalinas. Dado a que la mayor parte de BUCQ se localiza en una zona lluviosa, la mayoría de las quebradas son de carácter perenne y las pendientes de los lechos son muy escarpadas. Los saltos han formado pequeños estanques

que durante el verano permanecen abastecidos de agua (Ponciano y Glick, 1979). Además, drenajes subterráneos y puntos de agua se observan en todo el bosque. Los ríos arriba de los 1,000 msnm se definen como ríos de altura, caracterizándose por su baja productividad, lo que se refleja en una baja biodiversidad. Sin embargo, se han detectado especies adaptadas a esas características, como es el caso de especies de anfibios de la familia Leptodactylidae, que aprovechan tanto las corrientes continuas como las intermitentes en los períodos de lluvia para el desarrollo de sus larvas (Brule, 1982).

El Biotopo se encuentra dentro del área herpetofaunística Quechí, según la clasificación de Campbell y Vannini (1989, regiones modificadas de Stuart 1943 o 1964) que se caracteriza por varias especies de salamandras, leptodactílidos e hílidos, lagartijas del género *Abronia*, *Anolis* y *Xenosaurus*, así como muchas culebras. Una de las áreas aledañas que se incluyen en esta investigación es la región Oeste de la Sierra de las Minas (entrando por la Comunidad de Chilascó). En la Sierra de las Minas se encuentran las siguientes especies endémicas, la lagartija *Abronia gaiophantasma*, la culebra *Chapinophis xanthocheilus*, la salamandra *Cryptotriton veraepacis* (también presente en el BUCQ), la rana *Craugastor daryi* (Campbell 2001), *Cryptotriton sierraminensis* (Vásquez-Almazán *et al.*, 2009), *Bolitoglossa daryorum* (también presente en el BUCQ), *B. tzultacaj* (Campbell *et al.*, 2010) y *Plectrohyla pokomchi* (Duellman & Campbell, 1984). Herpetofaunísticamente, esta área comparte muchas especies con el área de las verapaces, incluyendo del Biotopo del Quetzal. (Campbell, 2001)

#### *Bosque municipal de la Unión, Zacapa y zonas aledañas*

Se localiza en el Este de Guatemala, en el Departamento de Zacapa y pertenece al municipio de la Unión. Forma parte de la Sierra del Merendón, al suroeste, extendiéndose a lo largo de la frontera con Honduras. Tiene un rango altitudinal de 900 a 1,720 msnm y la temperatura oscila de 16.6 hasta los 29.6°C (Vásquez, 2010). El bosque se mantiene en buenas condiciones debido a que la Municipalidad de La Unión es dueña del terreno e inscribió el área en la categoría de Bosque Regional Municipal ante el Consejo Nacional de Áreas Protegidas, con un área de 3,627 hectáreas. (Vásquez, 2010)

Dentro del área del bosque se encuentra el Cerro del Mono, catalogado como uno de los 8 sitios AZE (Alianza para la Cero Extinción) en el país, debido a que son considerados sitios

clave o de alta diversidad, que representan el último refugio para algunas especies de flora y/o fauna clasificadas como En Peligro (EN) o En Peligro Crítico (CR), según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). La especie de importancia que se encuentra en este Cerro es la salamandra *Cryptotriton monzoni* categorizada en Peligro Crítico (CR) (AZE, 2010), la cual es endémica de estos bosques.

Otras especies que se encuentran en el área son *Bromeliohyla bromeliacia* (CR), *Ptychohyla hypomykter* (CR), *Bolitoglossa conanti* y *Bolitoglossa rufescens*. Es importante resaltar que las quebradas y cascadas frías que se forman en las bases y vertientes de la montaña son ecosistemas únicos, importantes para la reproducción de los anfibios que habitan el bosque y otros animales nativos. (Vásquez, 2010)

La parte alta de la montaña denominada “Las Granadillas” forma parte del bosque nuboso de esta región, ubicada en los municipios de Jocotán y Camotán, Chiquimula y los municipios de la Unión, Zacapa, Estanzuela, Río Hondo y Gualán, en el departamento de Zacapa. El rango altitudinal varía desde los 184 a los 1748 msnm. (CDC-CECON-USAC, 2011). En las áreas de mayor altitud de la montaña, la temperatura es templada, con máximas anuales promedio de 36.4°C y mínimas de 11°C. La precipitación varía de 1,869 a 1,397 mm/año y la humedad relativa va de 59% a 87%. Toda esta región montañosa es una zona importante de captación hídrica que abastece de agua a las poblaciones aledañas (CDC-CECON-EB-USAC & Nature Serve, 2009).

Para la Montaña Las Granadillas se tiene registro de siete familias y 11 especies de anfibios, cuatro de las cuales están clasificadas en algún grado de amenaza por la UICN: *Plectrohyla matudai*, *Ptychohyla hypomykter*, *Bolitoglossa conanti* y *Craugastor charadra* (MUSHNAT-EB-USAC, 2009). Para el área de La Unión se tienen registros de seis familias y 10 especies, cuatro con algún grado de amenaza. La Montaña Las Granadillas es parte del bosque nuboso de esta región, por lo que al igual que el bosque de La Unión, es muy importante su conservación, ya que es muy probable que *C. monzoni* se encuentre en dicha zona (Vásquez, 2010). Esta región corresponde a las áreas herpetofaunísticas de Jalapa y de la Sierra del Merendón (Campbell & Vannini, 1989).

### *Bosque nuboso del volcán Tajumulco*

El Volcán Tajumulco se localiza en el departamento de San Marcos, en las coordenadas Latitud 15.02.34 y Longitud 91.54.14 con un rango altitudinal de 1,800 a 4,220 msnm, siendo el volcán de mayor altitud en Centroamérica (Godoy, 1999). Al igual que todos los volcanes del país, pertenece a la categoría de Zona de Veda Definitiva y es administrado por CONAP, declarado por acuerdo gubernativo 21-06-56 y Decreto Legislativo 4-89 (CONAP, 2006)

La mayoría de estudios herpetofaunísticos en el área corresponden al grupo de salamandras en los años setenta, y recientemente algunos viajes de campo (Rovito *et al.*, 2009), las especies reportadas para alturas medias y altas han sido *Bolitoglossa engelhardti*, *B. flavimembris*, *B. franklini*, *B. morio*, *B. lincolni*, *B. rostrata*, *Dendrotriton bromeliacia*, *Pseudoeurycea rex*, *P. goebeli*, y *P. brunnata* (Wake *et al.*, 1992). También se encuentran las especies *Bufo canaliferus*, *Bufo marinus*, *Agalychnis moreleti*, *Plectrohyla hartwegi*, *Plectrohyla matudai*, *Eleutherodactylus rhodopis*, *Rana maculata*, *Bolitoglossa occidentalis*. (Valdez *et al.*, 1999).

### 3. JUSTIFICACIÓN

En Guatemala más de la mitad de las especies de anfibios se encuentran amenazadas, ocupando uno de los primeros 10 lugares de los países más amenazados en América y el primer lugar en Mesoamérica (Young *et al.*, 2004), por otro lado es una de las regiones con mayor diversidad y endemismo de anfibios (Duellman, 1966). Las causas de estas amenazas son variadas, entre éstas contaminación, reducción de sus hábitats, cambio climático y enfermedades (Kilpatrick *et al.*, 2009), debido a su complejo ciclo de vida y sus características fisiológicas, este grupo presenta mayor sensibilidad a los cambios en su entorno que otros grupos. Desde hace aproximadamente dos décadas se empezaron a registrar disminuciones en muchas poblaciones de anfibios en distintas partes del mundo, aún en áreas aparentemente bien conservadas, determinándose que estos declives están asociados a la presencia de un hongo quitrido denominado *Batrachochytrium dendrobatidis* que causa una infección en la piel de los anfibios. Indicios de esta enfermedad en algunos individuos fueron observados en Guatemala por primera vez en el año 2004, confirmándose su presencia con análisis moleculares en el año 2009 (Rovito *et al.*). El origen del hongo y forma de contagio entre individuos aún no se conoce claramente, por lo que las medidas de prevención y manejo recomendadas son muy generales hasta el momento. El efecto de la enfermedad no es el mismo para diferentes especies de anfibios, incluso para diferentes poblaciones de una especie, suponiéndose que influyen variables ambientales locales en la virulencia del hongo, se sabe que la temperatura afecta el crecimiento del hongo en condiciones de laboratorio y que la virulencia de éste es mayor a mayores altitudes, pero existen otros factores que aún no se ha establecido de qué forma interactúan entre sí. Las características intrínsecas de una especie también influyen en la respuesta hacia el hongo ya que una misma especie en diferentes localidades presenta distintas respuestas, diferentes especies en una misma localidad tampoco responden de la misma manera. Algunos estudios (Kriger *et al.*, 2006; Burrowes *et al.*, 2008) han demostrado que la edad y/o tamaño de los individuos en una especie tiene relación con el nivel de infección de quitridiomycosis, siendo la tendencia que los individuos de menor tamaño o juveniles presentan niveles de infección más altos. En poblaciones de anfibios puede ser que la sobrevivencia en los estadios postmetamórfico y juvenil son los que tengan mayor influencia en la densidad de individuos adultos (Vonesh & De La Cruz, 2002), y si este grupo de la población es el más afectado por la enfermedad, repercutiría en la dinámica y la subsistencia de la población.

## 4. OBJETIVOS

### *4.1 General*

Determinar la relación entre el nivel de infección de quitridiomycosis y el tamaño corporal y modo reproductivo en anfibios en bosques nubosos de Guatemala.

### *4.2 Específicos*

4.2.1 Determinar la relación entre el nivel de infección de quitridiomycosis y el tamaño corporal en anfibios

4.2.2 Comparar la prevalencia y nivel de infección de quitridiomycosis entre los órdenes Anura y Caudata

4.2.3 Comparar la prevalencia y nivel de infección de quitridiomycosis entre especies con modo reproductivo terrestre y semi-acuático dentro del orden Anura

## 5. HIPÓTESIS

Los individuos de menor tamaño corporal y de hábitos semi-acuáticos serán más propensos a estar infectados con *Batrachochytrium dendrobatidis* en bosques nubosos.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### Especies y Sitios de Muestreo

Los muestreos fueron realizados en 7 localidades en bosques nubosos de tres departamentos: San Marcos, Baja Verapaz y Zacapa, debido a que ya se ha reportado la presencia del hongo en anfibios en estas áreas (Mendelson *et al.*, 2004; Rovito *et al.*, 2009; Ruano *et al.*, 2012). Las especies incluidas en este estudio se escogieron en base a los siguientes criterios: a) incluir especies del orden Anura y Caudata y con distintos modos reproductivos, b) tienen reporte de infección con *Bd* (Ruano *et al.*, 2012), y c) son más abundantes o más fáciles de encontrar que otras especies en las localidades de estudio (Ruano *et al.*, 2012). Las localidades se seleccionaron porque ahí se encuentran las especies de estudio.

**Tabla No. 1.** Localidades de muestreo y especies por localidad

Departamento	Baja Verapaz		Zacapa			San Marcos	
Municipio	Purulhá	Salamá	La Unión	Zacapa	San Rafael Pie de la Cuesta	Tajumulco	
Localidad	BUCQ	Sachut	Chilascó	La Unión	Granadillas	Refugio del Quetzal	Tajumulco
<i>Bolitoglossa conanti</i>				x			
<i>Bolitoglossa helmrichi</i>		x					
<i>Plectrohyla matudai</i>					x		x
<i>Plectrohyla sagorum</i>						x	x
<i>Ptychohyla hypomykter</i>				x	x		
<i>Craugastor bocourti</i>	x		x				
<i>Craugastor laticeps</i>				x	x		

Las especies de estudio presentan distintos hábitos y modos reproductivos, para este estudio nos referimos exclusivamente en relación al agua. Para el análisis del modo reproductivo se clasificaron las especies estudiadas en dos categorías: A y B. La categoría A incluye las especies con modo reproductivo asociado al agua, en este caso depositan los huevos en cuerpos de agua, y el desarrollo es indirecto ya que poseen etapa larvaria acuática. La categoría B incluye las especies con modo reproductivo no asociado al agua, es decir que depositan los huevos en el suelo (o en el caso de las 2 especies de

salamandras estudiadas, también en bromelias) y el desarrollo es directo, esto significa que no pasan por etapa larvaria acuática.

Orden	Género	Especie	Modo reproductivo
Caudata	<i>Bolitoglossa</i>	<i>conanti</i>	B
	<i>Bolitoglossa</i>	<i>helmrichi</i>	B
Anura	<i>Plectrohyla</i>	<i>matudai</i>	A
	<i>Plectrohyla</i>	<i>sagorum</i>	A
	<i>Ptychohyla</i>	<i>hypomykter</i>	A
	<i>Craugastor</i>	<i>bocourti</i>	B
	<i>Craugastor</i>	<i>laticeps</i>	B

### Tamaño muestral

Se definió el tamaño mínimo muestral en base a un muestreo (20 individuos por especie) para determinar el número de individuos necesarios para tener representatividad de la variación en el tamaño corporal de cada especie, utilizando la fórmula (Daniel, 1990):

$$n = \frac{z^2 \sigma^2}{d^2} \quad \text{donde}$$

n= número de individuos  
z= al 95% = 1.96  
σ= desviación estándar (obtenida del muestreo)  
d= límite de error (0.05%)

encontrando los siguientes valores para n

Especie	z	σ	d	n
<i>Bolitoglossaconanti</i>	1.96	9.640270183	2.112517346	18
<i>Bolitoglossahelmrichi</i>		9.631105036	2.110508945	18
<i>Craugastor bocourti</i>		4.24326427	1.039599746	14
<i>Craugastor laticeps</i>		4.56473839	1.059484763	16
<i>Plectrohylamatudai</i>		6.247114597	1.368959344	18
<i>Plectrohylasagorum</i>		1.280251584	0.304296486	15
<i>Ptychohylahypomykter</i>		3.447791055	0.755530527	18

### Búsqueda y colecta de especímenes

Para el muestreo de anfibios se utilizó el método de Relevamientos por Encuentros Visuales –REV- (o VES por sus siglas en inglés) que consiste en hacer caminatas en senderos y/o transectos en busca de anfibios (Heyer *et al.*, 1994). Los

senderos se ubicaron tanto dentro del bosque como a lo largo de ríos (si estaban presentes en las localidades) y los muestreos fueron nocturnos, período en que la mayoría de anfibios están activos. Los individuos encontrados se colectaron manualmente para la toma del frote epidérmico e identificados utilizando claves de anfibios de Guatemala, Honduras y el Salvador, al momento de capturar los anfibios se usaron guantes de látex desechables o bolsas de plástico, los cuales fueron cambiados entre cada toma de muestra (individuos) para evitar contagio de otros individuos (Vredenburg y Briggs, 2007). Los especímenes de difícil identificación fueron colectados y dormidos hasta la eutanasia con MS-222 (anestesia) y posteriormente fijados en formol al 10% y preservados en alcohol al 70% (Heyer *et al.*, 1994). Para cada individuo encontrado se tomaron los siguientes datos en la libreta de campo: localidad, microhábitat, fecha, hora de colecta, especie (si se conoce), estadio de vida (sub-adulto, adulto).

### **Toma de frotos epidérmicos**

Para la toma de muestras en anfibios adultos y metamórficos se realizó un frote en la piel con un hisopo estéril el cual se deslizó en total 35 veces en las siguientes partes del anfibio: la superficie inferior del vientre, y parte interior de los muslos, patas y membranas interdigitales (membranas entre cada uno de los dedos de los miembros inferiores) y parte gular en salamandras (Vredenburg y Briggs, 2007; Amphibiaweb, 2008). Luego se agregó una gota de etanol al 95% y se dejó secar la muestra del hisopo al aire, por aproximadamente 5 minutos, evitando el contacto directo de la luz del sol sobre el frote. Posteriormente se colocó el hisopo en un tubo de 1.5 ml para microcentrifugar (viales Fisher Scientific) (Vredenburg y Briggs, 2007).

### **Análisis de las muestras**

Las muestras fueron analizadas con la técnica específica de identificación molecular de *Batrachochytrium dendrobatidis* por medio de PCR de tiempo real (“Taqman assay”) estandarizada por Boyle *et al.* (2004). Esta técnica es la más efectiva, específica y sensible para la detección de *Bd*, especialmente en etapas tempranas de infección, no solo detectando la presencia del hongo sino que cuantifica el nivel de infección en los anfibios muestreados. Los niveles de infección son expresados en

zoosporas equivalentes por individuo, el cual no es un número entero debido a que esta medida no es un conteo directo del número de zoosporas sino un “equivalente” determinado a partir del número de ciclos en el cual la técnica de PCR de tiempo real detecta la presencia del hongo, y que ya ha sido estandarizada (Vredenburg y Briggs, 2007)

### **Medición de tamaño corporal**

Se tomó como medida de tamaño corporal la longitud hocico-cloaca (Kriger *et al.*, 2007), en milímetros, para lo cual se utilizó un vernier con exactitud de 0.05 mm.

### **Análisis estadístico**

Se comparó la LHC (longitud hocico-cloaca) media entre individuos infectados (positivos) y no infectados (negativos) usando la prueba independiente de t, y la prueba de Mann Whitney (ambas pruebas a dos colas) cuando la LHC no presentó normalidad. Para determinar si existe asociación entre la prevalencia de *Bd* y el modo reproductivo se realizó un análisis de chi cuadrado. Se realizó la correlación de Pearson para analizar la relación entre tamaño corporal y nivel de infección (No. de zoosporas equivalentes). Antes de realizar el análisis se transformaron los valores del número de zoosporas a su logaritmo natural (Ln) por las siguientes razones: a) la variable es continua pero no presenta normalidad y aumenta exponencialmente, b) se realizó por aparte una correlación de Spearman con los datos sin transformar y la dirección de la relación es igual con las dos pruebas (no cambia el signo de la relación), por lo que la transformación se hace para que la prueba sea más sensible a la asociación entre las dos variables (que puede enmascarse debido al aumento exponencial de la variable, (Crawley, 2007) y, 3) en base a que otros estudios que analizan esta variable la transforman debido a su comportamiento (e.g. Kriger *et al.*, 2006; 2007; Raffel *et al.*, 2010).

Para analizar las variables explicativas (LHC, Modo reproductivo y localidad) en conjunto, se realizó un GLM (familia binomial y enlace logit) siendo la variable de respuesta la presencia o ausencia de *Bd* (1/0 respectivamente, respuesta binaria). Se incluyeron como variables explicativas en este análisis también microhábitat en que fue encontrado el individuo (Hoja, Tronco, hojarasca) y altura a la que fue encontrado

(centímetros sobre el suelo). Estas últimas variables se obtuvieron de Ruano *et al.* (2012), para determinar si éstas, además de las variables de estudio, influyen la presencia de Bd en los anfibios estudiados. Para poder realizar el análisis se relativizó la variable LHC obteniendo un índice de tamaño corporal para cada individuo y poder analizar a las 7 especies estudiadas en conjunto dividiendo la LHC de cada individuo entre la LHC máxima encontrada para esa especie en el presente estudio. Así mismo se obtuvo la probabilidad para la presencia de Bd para el tipo de modo reproductivo y el tamaño corporal en anfibios. También se realizó un GLM para el número de zoosporas equivalentes (familia binomial negativa y enlace log) (Raffel *et al.*, 2010) incluyendo solo modo reproductivo y el índice de tamaño corporal como variables explicativas. Todos los análisis fueron realizados en el programa estadístico R (R Development Core Team, 2011).

## **Materiales:**

### ***De campo***

- Linterna de mano
- Linterna de Cabeza
- Baterías AAA
- Libreta de campo impermeable
- Bolsas plásticas de 10 lbs.
- Rapidógrafos indelebles
- Marcador indeleble
- GPS Garmin Etrex
- Rastrillos
- Botas de hule
- Cámara digital
- Vehículo
- Reloj

### ***De Laboratorio***

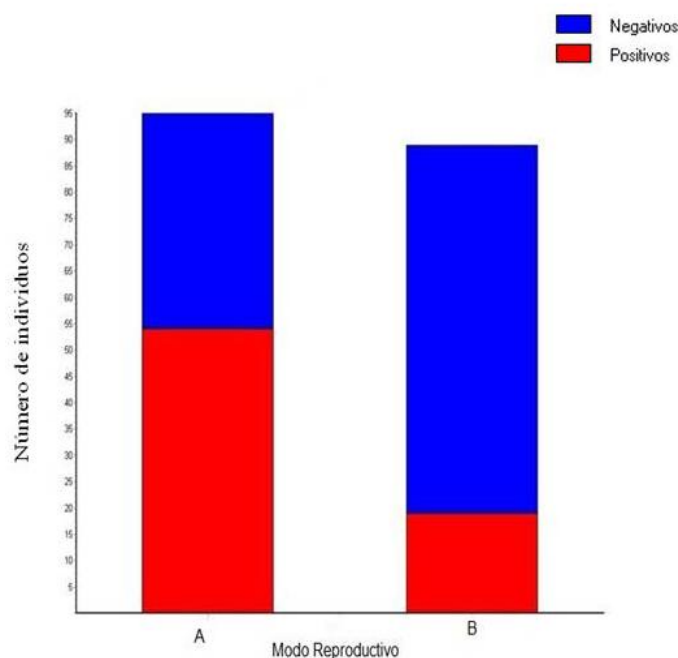
- Guías de identificación
- Etanol al 95% y al 70%
- Bandejas de plástico herméticas
- Anestésico (MS-222) o cloretone
- Formol al 10% (Formalina)
- Frascos de vidrio de diferentes tamaños
- Un paquete de papel absorbente
- Guantes de látex desechables
- Hisopos estériles.
- Viales *Fisher Scientific* 1.5 ml.
- Gradillas
- Pinzas
- Kit de disección
- Pinzas y agujas de disección
- Pissetas
- Estereoscopio
- Vidrios de reloj

## 7. RESULTADOS

En total se muestrearon 184 individuos de las 7 especies, de los cuales 73 individuos resultaron infectados con *Bd* (39.67% casos positivos), y la prevalencia por especie va de 6.67 a 64.41%, siendo las especies de la familia Hylidae las que presentaron prevalencias más altas (33.73-70.83%), mientras que el género *Craugastor* presentó las prevalencias más bajas (6.67-21.43%, ver Cuadro No.1). Se encontró una diferencia significativa entre el número de individuos positivos y negativos en relación al modo reproductivo, presentando el modo reproductivo A (Ver cuadro de modo reproductivo en Métodos) mayor número de casos positivos que el modo reproductivo B ( $X^2=22.727$ ,  $GL=1$ ,  $p<0.0001$ , Ver figura No. 1). Así mismo, los hílidos presentaron en promedio cantidades de zoosporas equivalentes más altas (valores promedio por especie de  $16.75 \pm 37.63$  a  $731.22 \pm 2229.0$ , ver Cuadro No. 2) que las especies de las otras dos familias (valores promedio por especie de  $0.1128$  a  $123.92 \pm 155.99$ ), presentando el género *Craugastor* los valores promedio más bajos también. Aún así, dentro de los hílidos, aunque *P. matudai* presentó las prevalencias más altas, presentó un número de zoosporas más bajo en comparación con *P.sagorum* y *P.hypomykter* e incluso que la salamandra *B. conanti* (Ver Cuadro No.2).

Para *P. matudai* la LHC es significativamente diferente entre las 2 localidades muestreadas (Granadillas y Tajumulco,  $U=186.50$ ,  $p=0.0004$ ) por lo que los análisis se realizaron separadamente para cada localidad. La prevalencia también resultó diferente para *P. matudai* al separar las localidades, presentando la población de Tajumulco una mayor prevalencia. Los resultados muestran que en las salamandras estudiadas, los individuos infectados (positivos) son significativamente más grandes que los individuos no infectados (negativos). Esta diferencia entre individuos positivos y negativos no se encontró para las especies de anuros (ver Cuadro No.1 y Gráfica No. 1).

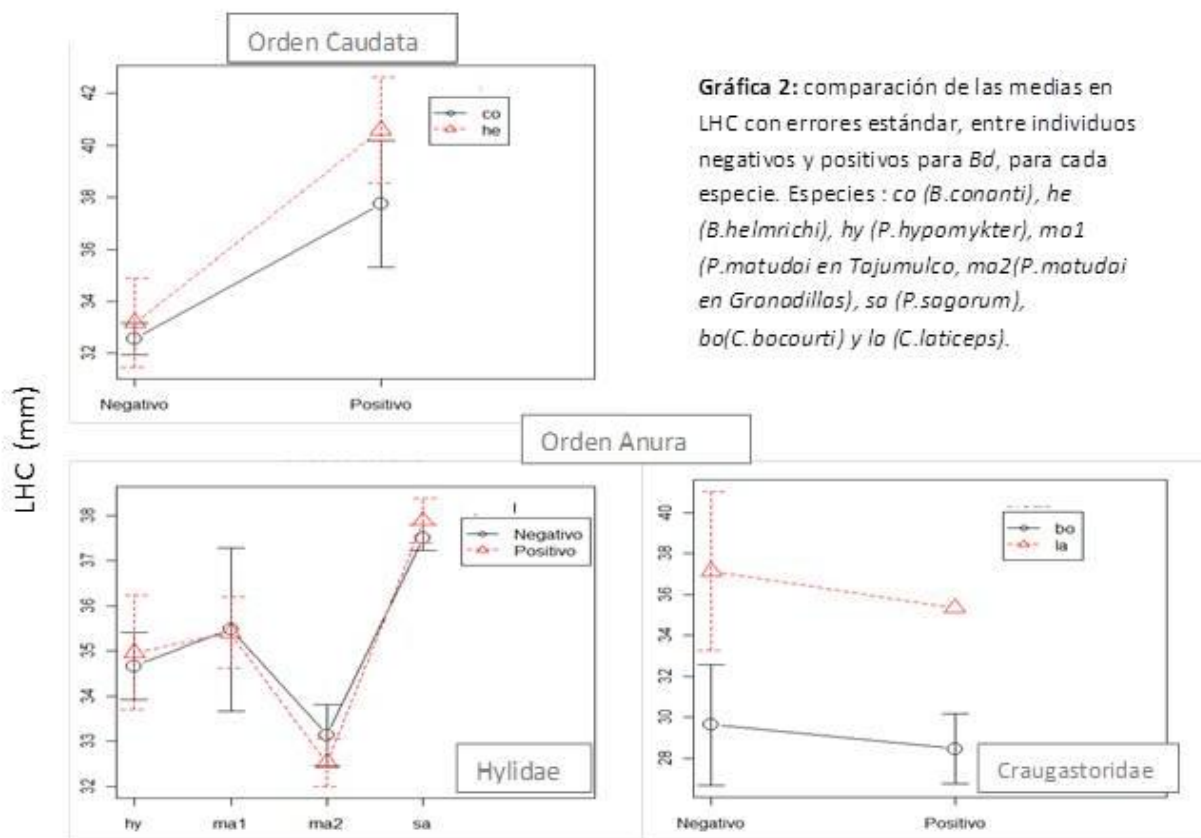
**Gráfica No. 1:** Porcentajes de casos positivos y negativos por modo reproductivo.



**Cuadro No. 1:** tamaños muestrales, valores de prevalencia y comparación entre individuos positivos y negativos para cada especie.

Familia	Especie	Prevalencia (%)	Positivos/total de individuos	LHC ( $\bar{x} \pm sd$ )		Diferencia en LHC entre individuos positivos y negativos
				positivos	negativos	
Plethodontidae	<i>Bolitoglossa conanti</i>	24.0	6/25	37.75 $\pm$ 5.97	32.56 $\pm$ 2.65	<b>(t) p=0.0057</b>
	<i>Bolitoglossa helmrichi</i>	25.71	9/35	40.58 $\pm$ 6.10	33.18 $\pm$ 8.70	<b>(U) p=0.0236</b>
Hylidae	<i>Plectrohyla matudai</i> 1	73.91	17/23	35.41 $\pm$ 3.25	35.48 $\pm$ 4.43	(U) p=0.5753
	<i>P. matudai</i> 2	58.33	21/36	32.53 $\pm$ 2.41	33.07 $\pm$ 2.57	(U) p=0.3904
	<i>Plectrohyla sagorum</i>	55.56	10/18	37.89 $\pm$ 1.55	37.50 $\pm$ 0.81	(t) p=0.5368
	<i>Ptychohyla hypomykter</i>	33.33	6/18	34.97 $\pm$ 3.10	34.67 $\pm$ 2.58	(U) p=0.6086
Craugastoridae	<i>Craugastor bocourti</i>	21.43	3/14	28.47 $\pm$ 2.94	29.64 $\pm$ 9.77	Muy pocos positivos
	<i>Craugastor laticeps</i>	6.67	1/15	35.35	37.15 $\pm$ 14.50	Muy pocos positivos

*P. matudai* 1 corresponde a localidad de Tajumulco, 2 a Granadillas; (t) prueba independiente de t, (U) prueba de Mann-Whitney



El número de zoosporas equivalentes encontrado difiere por varios órdenes de magnitud, de 0.001984 a 7,074.4 (media=145.49  $\pm$  832.43, mediana=6.89) por lo que se transformaron a su logaritmo natural (Ver métodos). Se encontró una correlación significativa entre la LHC y el número de zoosporas en individuos infectados en dos especies, *Bolitoglossa conanti* y *P. matudai* (localidad Tajumulco, ver Cuadro No. 2 y Gráfica No. 3), las demás especies no presentaron correlación entre estas dos variables, para *C. bocourti* y *C. laticeps* no se realizó este análisis porque el número de casos positivos fue muy bajo (3 y 1 respectivamente).



**Cuadro No. 2: cantidad de zoosporas equivalentes y su correlación con la LHC para cada especie.**

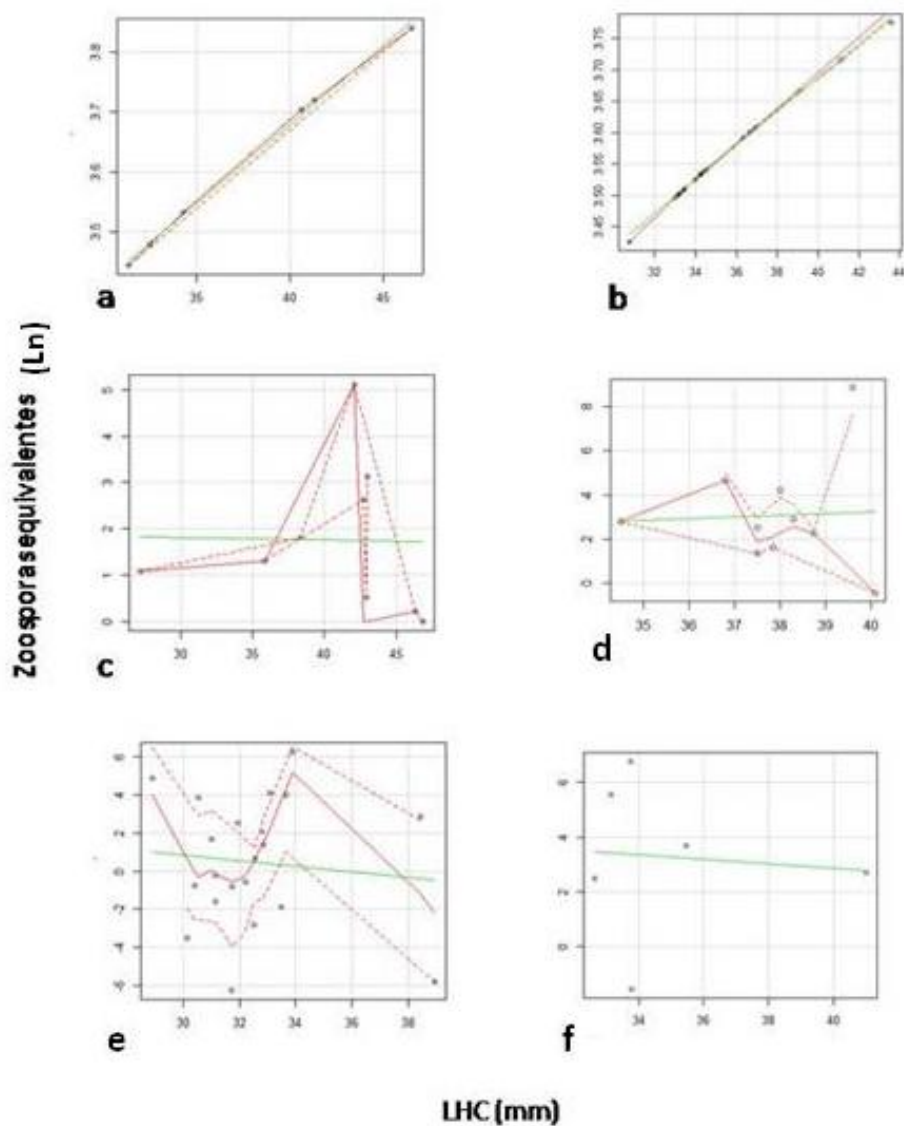
Familia	Especie	No. De zoosporas equivalentes ( $\bar{x} \pm sd$ )	Correlación entre (Ln) No. De zoosporas y LHC en individuos infectados
Plethodontidae	<i>Bolitoglossa conanti</i>	123.92 $\pm$ 155.99	<b>r=0.9987</b> <b>p=2.532e-06</b>
	<i>Bolitoglossa helmrichi</i>	24.40 $\pm$ 53.74	r=-0.01781 p=0.9637
Hylidae	<i>Plectrohylamatudai</i> 1	16.75 $\pm$ 37.63	<b>r=0.99871</b> <b>p&lt; 2.2e-16</b>
	<i>P.matudai</i> 2	40.56 $\pm$ 112.09	r=-0.10245 p=0.6585
	<i>Plectrohyla sagorum</i>	731.22 $\pm$ 2229.0	r=0.04928 p=0.8925
	<i>Ptychohyla hypomykter</i>	198.58 $\pm$ 341.0	r=-0.0909 p=0.864
Craugastoridae	<i>Craugastor bocourti</i>	5.81 $\pm$ 3.90	Muy pocos datos
	<i>Craugastor laticeps</i>	0.1128	Muy pocos datos

*P. matudai* 1 corresponde a localidad de Tajumulco, 2 a Granadillas

El modelo lineal generalizado (GLM) se inició con las 5 variables (modo reproductivo, microhábitat, localidad, índice de tamaño corporal y altura) sin interacción entre sí, resultando altamente significativa la relación de las variables modo reproductivo (*GLM*,  $p < 0.001$ ) y tamaño corporal-LHC (*GLM*,  $p < 0.05$ ), mientras que las variables microhábitat en que fue encontrado el individuo, altura y localidad no tuvieron efecto en la presencia de Bd (Ver Anexo 1a). Luego se realizó el modelo probando si existía interacción entre estas dos variables, dando un valor de AIC mayor indicando un menor ajuste del modelo. Al comparar los dos modelos con un Anova, nos da una diferencia significativa entre éstos (Anova,  $p < 0.001$ ) pero con una desviación negativa con lo que nos indica el menor ajuste del modelo, por lo que se utiliza el primer modelo sin la interacción entre las dos variables significativas (Crawley, 2007) (Ver pasos para la realización del modelo en Anexo 1a). Según los coeficientes el modo reproductivo no asociado al agua (B) presenta una menor asociación a la presencia de Bd, y el tamaño corporal presenta una relación positiva significativa a la presencia de Bd. En el GLM para determinar el efecto en el nivel de infección (número de zoosporas equivalentes) se incluyeron solo las variables de estudio, Modo reproductivo y LHC (para el análisis, índice de tamaño corporal), resultando significativo el efecto del índice de tamaño corporal (*GLM*,  $p < 0.001$ , ver Anexo 2).

El análisis de razón de probabilidades (“*odds ratio*”) mostró para el modo reproductivo A (desarrollo indirecto y hábitos asociados al agua) un incremento en la probabilidad de presentar Bd en un factor de 0.22 comparado con el modo reproductivo B; y con el aumento de una unidad de LHC (0.1 en el índice de tamaño corporal) la probabilidad de presencia de Bd aumenta en un factor de 23.14. Los valores de la razón de probabilidad y de los intervalos de confianza (95%) se muestran en el Anexo 2a.

**Gráfica No. 3:** Asociación entre el número de zoosporas equivalentes (Ln) y el tamaño corporal (LHC). a) *B. conanti*, b) *P. matudai* (localidad Tajumulco), c) *B. helmrichi*, d) *P. sagorum*, e) *P. matudai* (localidad Granadillas), f) *P. hypomykter* (Valores de la correlación en el cuadro No. 2)



## 8. DISCUSIÓN

Los resultados corroboran evidencia previa de que las especies asociadas al agua son más propensas a estar infectadas con el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* –*Bd*– (Bielby *et al.*, 2008; Lips *et al.*, 2003; Lips *et al.*, 2006; Kilburn *et al.* 2011; Smith *et al.*, 2009), esto debido a que las zoosporas de *Bd* son acuáticas (Berger *et al.* 1998; Longcore *et al.*, 1999). Las ranas de la familia Hylidae incluidos en el estudio (géneros *Plectrohyla* y *Ptychohyla*, que se clasificaron como modo reproductivo A), poseen hábitos asociados al agua ya que se reproducen cerca de ríos, depositan los huevos en el agua y poseen desarrollo indirecto (de los huevos nacen larvas acuáticas) (Duellman & Campbell, 1992; McCranie y Castañeda, 2007), y efectivamente presentaron las prevalencias y niveles de infección más altos; mientras que las especies de la familia Craugastoridae (género *Craugastor*) y las salamandras (familia Plethodontidae: *Bolitoglossa*, clasificadas ambos géneros como modo reproductivo B) están menos asociadas al agua, además de que depositan los huevos fuera del agua y poseen desarrollo directo (no pasan por etapa larvaria acuática) (Köhler, 2011; McCranie y Castañeda, 2007), y presentaron valores más bajos (como lo reportado recientemente para Guatemala por Ruano *et al.* 2012). Se ha encontrado evidencia de que muchos otros factores influyen la probabilidad y nivel de infección de quitridiomycosis en los anfibios, pero la asociación al agua es el más recurrente en distintos estudios (Berger *et al.* 1998; Lips, 1998; 1999; Lips *et al.*, 2003; Kilburn *et al.*, 2011; Ruano *et al.*, 2012) y estas especies son las que han sufrido los mayores declives en sus poblaciones. Las variables *microhábitat* en que fue encontrado el individuo, *altura* en que fue encontrado y *localidad* (obtenidas de Ruano *et al.*, 2012) resultaron no significativas para este estudio en el modelo lineal generalizado realizado (ver Anexo 1). El hecho de que *P. matudai* presentara prevalencias muy altas pero un número de zoosporas más bajo que las otras especies de hílidos, puede deberse a que tal vez sea una especie portadora (resistente a la infección) (Cheng *et al.*, 2011) y que su piel secreta compuestos o posea bacterias que producen metabolitos que la protegen del hongo, como se ha visto en otras especies (Becker *et al.*, 2009; Brucker *et al.*, 2008a). El género *Craugastor* como lo esperado fue el que presentó las prevalencias más bajas, ya que son especies completamente terrestres. Especies de este género, en otros países, y que viven más asociados a ríos han sufrido declives (Crawford *et al.*, 2009).

Estos valores de prevalencia y nivel de infección son similares a las reportadas por Ruano *et al.* (2012) para estas especies. Difieren un poco debido a que en el trabajo de Ruano *et al.* incluyeron varias localidades para cada especie por lo que los valores son promedio de todas las localidades para la especie, en este trabajo se analizaron datos de una sola localidad por especie, y para las especies para las que se tenía un bajo número de individuos en una sola localidad se incluyen individuos de dos localidades pero que pertenecen a la misma región de muestreo (dentro de un radio de 30-50 km) y para las que no se encontró diferencia significativa en la LHC entre las dos localidades (*C.bocourti*, *C.laticeps*, *P.hypomykter*, *P.sagorum*).

Los resultados muestran que para las dos especies de salamandras los individuos positivos para *Bd* son en promedio de mayor tamaño que los individuos negativos, lo cual difiere de los resultados en los pocos estudios con *Bd* que incluyen tamaño corporal en individuos postmetamórficos (Beard & O'Neill, 2005; Burrowes *et al.*, 2008; Kriger *et al.*, 2006; 2007; Lamirande & Nichols, 2002; Parris & Cornelius, 2004 utilizó masa corporal al metamorfizar), en los cuales trabajaron con anuros y encontraron que los individuos infectados presentan una LHC menor que los no infectados. Kriger *et al.* (2006, p.46) proponen varias hipótesis para explicar este hecho: (1) existe un cambio en la capacidad inmunológica que disminuye el nivel de infección al aumentar la edad (y por lo tanto la LHC); (2) el hongo influencia negativamente la tasa de desarrollo en los individuos infectados por lo que permanecen con tamaño pequeño (hipótesis de “restricción en el desarrollo”); y (3) los individuos infectados presentan mortalidad alta por lo que no llegan a alcanzar tamaños corporales grandes; algunos estudios presentan evidencia que apoyan la hipótesis 1 (Lamirande & Nichols, 2002) y otros apoyan la hipótesis 2 (Parris & Cornelius, 2004; Burrowes *et al.*, 2008). El único estudio encontrado para salamandras es el realizado por Raffel *et al.* (2010), con una especie norteamericana de salamandra cuyo estadio adulto es acuático. Raffel *et al.* no reportan si existe diferencia en la LHC entre individuos infectados o no infectados, pero sí encontraron que el número de zoosporas equivalentes disminuye en individuos de mayor tamaño. El presente es el primer estudio que investiga esta relación en salamandras terrestres (neotropicales) y con los resultados obtenidos para las dos especies estudiadas, no se apoya ninguna de las hipótesis mencionadas anteriormente.

En el estudio de Beard y O'Neill (2005) propusieron una cuarta hipótesis: que individuos más pequeños ocupan microhábitats diferentes donde el riesgo de infectarse con *Bd* es mayor (en este caso compararon subadultos y adultos). Esta hipótesis sí podría explicar en parte los resultados obtenidos, debido a los hábitos de vida de *Bolitoglossa conanti* y *B.helmrichi*, aunque en este caso serían los individuos de mayor tamaño los que ocuparían microhábitats con mayor riesgo de presencia de *Bd*. Aunque no se tiene información muy detallada acerca de sus hábitos (Amphibiaweb, 2012), sí se sabe que son de desarrollo directo (sin pasar por etapa larvaria, como todas las especies del género), son de hábitos arborícolas, y generalmente ponen sus huevos en bromelias (Amphibiaweb, 2012; McCranie y Castañeda, 2007, p.90). En base a esto podría esperarse que los juveniles pasan buena parte del tiempo aislados y al crecer y llegar a la etapa adulta se mueven más en busca de reproducirse y en ese momento pueden tener contacto con otros individuos o áreas donde se encuentre el hongo, de esta forma se contagiarían con el hongo hasta alcanzar tamaños corporales más grandes (que indican mayor edad). Otro factor es que las densidades de estas salamandras parecen bajas por lo que también pueden tener una tasa de transmisión intraespecífica baja (Cheng *et al.* 2011), aunque por sus características de actividad y hábitos puede deberse a que la probabilidad de detectabilidad para estas especies varía en comparación con otras especies. Para las especies de hílidos no se encontró diferencia significativa en el tamaño entre individuos positivos y negativos para *Bd* (ver cuadro No.1), y esto puede deberse a que los individuos en casi todas sus etapas (postmetamórficos, juveniles, adultos) posiblemente se mueven en microhábitats muy parecidos. Las especies de *Craugastor* también comparten microhábitats en las diferentes etapas, pero en este caso se encontraron muy pocos individuos positivos por lo que no pudo comprobarse estadísticamente si existe alguna relación entre las 2 variables. Sin tomar en cuenta la especie, el análisis de razón de probabilidades indica que en general el modo reproductivo con desarrollo indirecto y hábitos asociados al agua aumenta en 0.22 la probabilidad de *Bd* en comparación con el modo reproductivo directo; y que el aumento de una unidad en tamaño corporal (en este caso en 0.1 de aumento en el índice de tamaño corporal utilizado) incrementa la probabilidad en 23.14. Al proyectar las probabilidades para distintos tamaños corporales (Anexo 3b), individuos con modo reproductivo indirecto siempre presentan probabilidades mayores de presencia de *Bd* que el modo reproductivo directo.

Por último, para *B. conanti* también se encontró una correlación positiva entre el número de zoosporas equivalentes y el tamaño corporal, pero no así para *B. helmrichi*; mientras que en los anuros solo la población de *P. matudai* en Tajumulco presentó esta correlación. Es decir que en *P. matudai* aunque no se encontró relación entre LHC y presencia del hongo, en individuos infectados el nivel de infección sí aumenta con el tamaño del individuo, en esta población. Este resultado también difiere del encontrado por Kriger *et al.* (2006 y 2007) en dos especies de ranas, donde aparte de que los individuos infectados eran más pequeños que los no infectados, el número de zoosporas equivalentes disminuyó al aumentar el tamaño corporal, lo mismo que encontró Raffel *et al.* (2010) para una especie de salamandra, lo cual es congruente con las hipótesis planteadas en Kriger *et al.* (2006, mencionadas anteriormente), pero no para este estudio. Raffel *et al.* mencionan que en la especie que estudiaron, los individuos probablemente adquieren resistencia luego de la exposición al hongo. Los otros estudios mencionados no presentan el número de zoosporas. Para estas dos especies en las cuales el nivel de infección aumentó positivamente con la LHC, puede ser simplemente que el número de zoosporas aumente al incrementarse el área corporal del individuo, ya que el hongo dispondría de mayor superficie epidérmica queratinizada. Si este es el caso, pueden darse dos opciones: a) debido a que la especie es solo portadora (resistente a la infección) siga sin afectarle el incremento en el número de zoosporas o, b) que el aumento en el número de zoosporas sea indicio de que la infección está empeorando y que eventualmente el individuo morirá; pudiendo ser diferente el caso entre las dos especies. La segunda opción es poco probable para *B. conanti* y la población de *P. matudai* ya que no se encontraron individuos que presentaran síntomas de estar enfermos (Berger *et al.*, 1998). Para estar seguros debería monitorearse el desenvolvimiento de individuos infectados en el campo o en el laboratorio. Las diferencias en la prevalencia así como en la relación tamaño corporal-nivel de infección en las dos poblaciones de *P. matudai*, que corresponden a distintas localidades, pueden tener varias razones, primeramente podría pensarse que las variables ambientales difieren según la localidad, lo que en otros estudios han encontrado que influencia la respuesta hacia *Bd* (Burrowes *et al.*, 2008). Todas las localidades en el presente estudio corresponden a Bosque Nuboso por lo que comparten parámetros ambientales similares, Ruano *et al.* (2012) no encontraron relación de variables microclimáticas con la presencia del hongo (incluyendo las dos localidades de este estudio para *P. matudai*), pero otros estudios han mostrado relación con variables climáticas a escalas espaciales y temporales mayores (Kriger *et*

*al.*, 2007), sería interesante realizar un estudio más exhaustivo con más datos a una escala mayor. Otro factor puede ser la secreción de péptidos antimicrobianos por medio de la piel (Woodham *et al.* 2007) o la presencia en la piel de bacterias que segregan también metabolitos, que se ha visto tienen actividad anti-Bd (Harris *et al.*, 2009; Becker *et al.*, 2009; Brucker *et al.*, 2008b) y que la cantidad y composición tanto de las secreciones como de la microbiota cambia entre individuos y poblaciones. Aunque el GLM (Anexo 1) mostró el efecto significativo del modo reproductivo en la presencia de Bd (mayor prevalencia de Bd con el modo reproductivo A: desarrollo directo y hábitos asociados al agua), el GLM realizado para el nivel de infección (número de zoosporas) mostró que esta variable no es significativa (Anexo 2), mientras que la LHC sigue siendo significativa. Puede inferirse que el modo reproductivo (y hábitos) influye en que una especie presente o no el hongo y en su prevalencia, pero no para el nivel de infección, donde el tamaño corporal (LHC) mostró ser un mejor predictor. Otros estudios también han mostrado que el tamaño corporal explica mejor la relación con Bd que otras variables (Kriger *et al.*, 2007; Raffel *et al.*, 2010), pero habría que realizar el análisis con más variables para determinar esto para las especies de estudio.

Los resultados obtenidos no implican que las salamandras de menor tamaño en estas especies no sean vulnerables al hongo, sino que por sus hábitos tienen menor probabilidad de infectarse, pero si tienen contacto con el hongo probablemente se infecten y podrían ser más vulnerables a la infección que los individuos de mayor tamaño o puede ser que no haya diferencia, pero esto va más allá de lo estudiado en el presente estudio. Aunque estas especies de salamandras talvez tengan menor contacto con el hongo, se ha visto que *P.matudai* utiliza bromelias en ocasiones como refugios diurnos y si ésta es portadora (Cheng *et al.*, 2011), podría aumentar las probabilidades de infección para estas salamandras con lo que individuos más pequeños (o jóvenes) podrían infectarse. Los efectos de la quitridiomycosis no han sido estudiados tan ampliamente en salamandras, la información que se tiene apunta a que son más resistentes que la mayoría de ranas a la infección (Davidson *et al.*, 2003), y precisamente esta es una de las razones por las cuales no existen tantos estudios para salamandras ya que este grupo no ha presentado declives tan dramáticos en sus poblaciones, aunque sí se tienen algunos reportes para España (Bosch & Martínez-Solano, 2006), México y Centroamérica (Parra-Olea *et al.*, 1999, Rovito *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2011) pero el número y escala es mucho menor en

comparación con los anuros; por lo tanto no existe mucha evidencia que apoye la probabilidad de una alta mortalidad en salamandras. Además, las salamandras para las que se reportan declives en el país son especialistas y de microhábitat terrestres (Rovito *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2011) y no de microhábitat arbóreo como las del presente estudio, y tampoco se encontraron individuos de ninguna de las especies estudiadas con una cantidad de zoosporas equivalentes cercano a las 10,000 que se ha encontrado hasta el momento como el límite a partir del cual la infección es letal en condiciones de laboratorio (Vredenburg *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2011).

También hay que tomar en cuenta que en algunos de los estudios mencionados trabajaron solo con juveniles (Kriger *et al.*, 2006) o adultos (Burrowes *et al.*, 2008) minimizando las posibles diferencias en sus hábitos, en este caso no existe información disponible de la LHC para los distintos grupos de edad en las especies estudiadas y por ello no se hace la diferenciación entre edades sino solo tamaño corporal. La relación entre nivel de infección y tamaño corporal (relacionado con la edad) nos da una idea de la dinámica en la patología de un parásito a nivel poblacional y la inmunidad adquirida (si existe) por el huésped hacia ese parásito (Raffel *et al.*, 2009). Además, si de hecho existe una relación se supondría que un grupo de edad dentro de una población podría ser más susceptible. Dependiendo de la estructura y dinámica poblacional en una población específica la disminución drástica (y en ciertos casos no tan drástica) de un grupo de edad específico puede afectar seriamente el mantenimiento del número de individuos al disminuir la tasa de crecimiento en dicha población (Vonesh & De la Cruz, 2002).

En un momento en que se están llevando a cabo muchos esfuerzos a nivel mundial para entender los procesos de la infección que ha sido propuesta como la causa de la disminución drástica de muchas poblaciones de anfibios en varios países (Kriger, 2009; La Marca *et al.*, 2005; Lips *et al.*, 2006) y que está involucrada incluso en casos de extinciones de especies (Retallick *et al.*, 2004; Schloegel *et al.*, 2005), estos resultados aportan más evidencia al hecho de que aunque la quitridiomycosis es una amenaza actual muy grave para los anfibios, las consecuencias de ésta difieren mucho según la especie, hábitat, altitud, algunas variables climáticas e incluso la etapa en la que se encuentren los individuos (Burrowes *et al.*, 2008; Gründler *et al.*, 2012; Kriger & Hero, 2007; Kilpatrick *et al.*, 2009). En el presente estudio dos poblaciones de una misma especie (*P.matudai*) pero de distintas localidades presentaron diferentes prevalencias y niveles de



infección. Otra especie del mismo género y con hábitos muy parecidos, *P.sagorum*, presentó una prevalencia menor, pero niveles de infección mucho mayores, si se encuentra que *P.matudai* secreta compuestos que la ayudan a combatir al hongo es muy probable que *P.sagorum* también los tenga. El hongo ya se encuentra ampliamente distribuido en bosques nubosos del país, encontrándose hasta el momento en 31 especies de anfibios y aunque en el país pareciera que las poblaciones se encuentran en cierta estabilidad con el hongo (Ruano *et al.*, 2012) (luego de declives iniciales en algunas especies en los años 1980 posiblemente causado por el hongo) (Cheng *et al.*, 2011), varios estudios evidencian que al disminuir la capacidad inmunológica de los individuos debido a factores ambientales y antropogénicos que causan estrés en los anfibios (Pounds *et al.*, 2006) es cuando probablemente las consecuencias de la infección son catastróficas. Estos resultados apoyan información previa de que en algunas especies los distintos grupos de edad responden de distinta manera a la infección, lo cual dependiendo de la estructura y dinámica poblacional, puede tener consecuencias graves en el mantenimiento de una población. Estos resultados ponen en evidencia cada vez más que es necesario tener información a nivel poblacional de los anfibios en el país, ya que no existe información base de abundancias y tamaños poblacionales para realizar monitoreos de dichas poblaciones y mucho menos de estructura y dinámica poblacional.

## 9. CONCLUSIONES

- 9.1 El análisis de todas las especies en conjunto mostrò que las variables modo reproductivo y tamaño corporal tuvieron un efecto significativo en la presencia de *Bd*, mientras que solo el tamaño corporal fue significativo para el nivel de infección (número de zoosporas equivalentes).
- 9.2 Los individuos infectados con *Bd* presentaron un tamaño corporal promedio (longitud hocico-cloaca) significativamente mayor que los individuos no infectados, en las salamandras *Bolitoglossa conanti* ( $p=0.0057$ ) y *B. helmrichi* ( $p=0.0236$ ). No se encontró diferencia significativa en las especies de anuros.
- 9.3 El nivel de infección (número de zoosporas equivalentes) está correlacionado positivamente con el tamaño corporal en las especies *Bolitoglossa conanti* y una de las poblaciones de *Plectrohyla matudai* (localidad de Tajumulco, San Marcos). Para las demás especies no se encontró correlación entre estas dos variables.
- 9.4 El Orden Anura presentó mayor prevalencia y niveles de infección que el Orden Caudata para las especies estudiadas, debido a las diferencias en los hábitos de vida y modo reproductivo.
- 9.5 Dentro del Orden Anura las especies con modo reproductivo y hábitos asociados al agua (género *Plectrohyla* y *Ptychohyla*) presentaron prevalencias y niveles de infección más altos que las especies con modo reproductivo y hábitos no asociados al agua (género *Craugastor*)
- 9.6 Los individuos de las especies de salamandras *B. conanti* y *B. helmrichi* probablemente se infecten hasta alcanzar un tamaño corporal más grande debido a sus hábitos de vida.
- 9.7 Los individuos de menor tamaño no presentaron mayores prevalencias ni niveles de infección mayores en ninguna de las especies estudiadas; y en el caso de las salamandras se encontró lo contrario. Por otra parte los resultados muestran que las especies con hábitos asociados al agua fueron más propensas a la infección.

## 10. RECOMENDACIONES

- 10.1 Realizar estudios de estructura y dinámica poblacional de anfibios en el país.
- 10.2 Monitorear las poblaciones de las especies que portan el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* para determinar si ocurren cambios drásticos en dichas poblaciones, y para identificar patrones de cambios en la prevalencia y niveles de infección durante el año.
- 10.3 Estudiar la historia natural de las salamandras *B. conanti* y *B. helmrichi*, así como de otras salamandras con hábitos diferentes, para comprobar la hipótesis de que debido a sus hábitos es que tienen contacto con el hongo hasta alcanzar tamaños corporales grandes. Además de proporcionar información básica acerca de estas especies, se estaría generando información que ayude a entender los procesos de infección con *Bd* en anfibios con distintos hábitos.
- 10.4 Estudiar estos parámetros en especies de salamandras que presentaron declives en la década de 1980, probablemente debido a quitridiomycosis (Rovito et al., 2009) para comparar con los resultados de este estudio, y determinar diferencias en la dinámica de infección por *Bd*.
- 10.5 Seguir las recomendaciones y limpieza de equipo para evitar el traslado del hongo a otras áreas donde todavía no ha llegado, al trabajar en el campo (Ruano et al., 2012).
- 10.6 Realizar estudios de metabolitos segregados en la piel de anfibios con resistencia al quitrido
- 10.7 Estudiar la dinámica de la infección en distintos hábitats y usos de la tierra.

## 11. REFERENCIAS

- Acevedo, M. (2006). *Anfibios y Reptiles de Guatemala: una breve Síntesis con Bibliografía*. Biodiversidad de Guatemala. (Vol. I). Editado E. Cano. Universidad del Valle de Guatemala.
- [AmphibiaWeb](http://amphibiaweb.org/): Information on Amphibian Biology and Conservation. [web application]. 2008. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Available: <http://amphibiaweb.org/>.
- Alliance for Zero Extinction. (2010). 2010 AZE Update. [www.zeroextinction.org](http://www.zeroextinction.org)
- Beard, K.H. & E.M. O'Neill. (2005). Infection of an invasive frog *Eleutherodactylus coqui* by the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Hawaii. *Biological Conservation* 126:591–595.
- Becker, M.H, Brucker, R.M, Schwantes, C.R, Harris, R.N, & Minbiole, K.P. (2009). The bacterially-produced metabolite violacein is associated with survival in amphibians infected with a lethal disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:6635-6638.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A. A., Goggin, C. L., et al. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 9031-9036.
- Bielby, J., Cooper, N., Cunningham, A., Garner, T. & Purvis, A. (2008). Predicting susceptibility to future declines in the world's frogs. *Conservation Letters* 1:82-90
- Blaustein, A.R. & Wake, D.B. (1995). The puzzle of declining amphibian populations. *Scientific American.* 272, 52-57.
- Boyle, D. G., Boyle, D. B., Olsen, V., Morgan, J.A.& Hyatt, A. D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis Aquat Org.* 60, 141-148.
- Bosch, J., and Martínez-Solano, I. (2006). Chytrid fungus infection related to unusual mortalities of *Salamandra salamandra* and *Bufo bufo* in the Peñalara Natural Park (Central Spain). *Oryx* 40: 84-89.
- Briggs, C.J., Vredenburg, V.T., Knapp, R.A. & Rachowicz, L.J.(2005). Investigating the Population-Level Effects of Chytridiomycosis: An Emerging Infectious Disease of Amphibians. *Ecology.* 86(12), 3149-3159.

- Brown, A. y Kappelle, M. (2001). Introducción a los bosques Nublados del Neotrópico: Una Síntesis Regional. En: Kappelle, M. y A.D. Brown (eds.). Bosques Nublados del Neotrópico. 2001. Editorial INBio. Costa Rica. 26-40.
- Brucker, R. M., Baylor, C. M., Walters, R. L., Lauer, A., Harris, R. N. & Minbiole, K. P. C. (2008a). The identification of 2,4-diacetylphloroglucinol as an antifungal metabolite produced by cutaneous bacteria of the salamander *Plethodon cinereus*. *J. Chem. Ecol.* 34:39–43.
- Brucker, R. M., Harris, R. N., Schwantes, C. R., Gallaher, T. N., Flaherty, D. C., Lam, B. A., et al. (2008b). Amphibian chemical defense: antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus*. *J. Chem. Ecol.* 34:1422–1429.
- Brule, B. Van Den. (1982). *Clave ilustrada preliminar para la herpetofauna del Biotopo "Mario Dary Rivera"*. Centro de Estudios Conservacionistas, USAC. Serie Educación Ambiental No. 1. Guatemala.
- Burrowes, P. A., Longo, A. N., & Rodríguez, C. A. (2008). Potential Fitness Cost of *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Eleutherodactylus coqui*, and comments on environment-related risk of infection. *Copeia*, 4(2), 51-57.
- Campbell, J.A. (1998). *Amphibians and Reptiles of Northern Guatemala, the Yucatán, and Belize*. USA: University of Oklahoma Press.
- Campbell, J. A. (1999). Distribution Patterns of Amphibians in Middle America. Pp 111-210 en W. E. Duellman (editor), *Patterns of Distribution of Amphibians. A global perspective*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, USA.
- Campbell, J. A. (2001). *Reptiles & Amphibians of Guatemala. Checklist*. Department of Biology, The University of Texas at Arlington. Arlington, Texas, USA. <http://www.uta.edu/biology/campbell/guatemala/>
- Campbell, J. A., Smith, E. N., Streicher, J., Acevedo, M. E., & Brodie, E. D. (2010). New salamanders (Caudata: Plethodontidae) from Guatemala, with miscellaneous notes on known species. *Misc. Publ. Mus. Zool., Univ. Michigan.* (200).i-v, 1-60.
- CDC-CECON-EB-USAC & NatureServe. (2009). *Políticas de Uso del Suelo y de Conservación de la Región Semiárida a nivel Departamental y Municipal en Guatemala*. Centro de Estudios Conservacionistas, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

- CDC-CECON-USAC. (2011). *Diversidad Biológica de la “Montaña Las Granadillas” y su importancia para la Conservación*. Informe Técnico. Centro de Estudios Conservacionistas, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- CECON-USAC. (2010). *Plan Maestro Biotopo para la Conservación del Quetzal “Mario Dary Rivera” 2010-2014*. Centro de Estudios Conservacionistas, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Cheng, T. L., Rovito, S. M., Wake, D. B., and Vredenburg, V. T. (2011). Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. Published online before print May 4, 2011, doi: 10.1073/pnas.1105538108.
- CONAP. (2006). *Sistema Guatemalteco de Áreas Protegidas –SIGAP–*. Documento Promocional/Informativo. (2ª. ed). Guatemala.
- Crawford, A., Lips, K. & Bermingham, E.(2009). Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama. *PNAS*. Publicado en línea previo a la impresión, July 19, 2010, doi: 10.1073/pnas.0914115107.
- Crawley, M. J. (2007). *The R Book*. England: John Wiley & Sons, Ltd.
- Cruz de la, J.R. (1982). *Clasificación de zonas de vida de Guatemala: nivel de reconocimiento*. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Instituto Nacional Forestal/Dirección General de Servicios Agrícolas. Guatemala.
- Daniel, W. W. (1990). *Bioestadística*. (3a. ed). México: Limusa Noriega.
- Davidson, E. W., Parris, M., Collins, J. P., Longcore, J. E., Pessier, A. P., and Brunner, J. (2003). Pathogenicity and transmission of chytridiomycosis in tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Copeia* 601-607.
- Duellman, W. (1966). The Central American Herpetofauna: an Ecological Perspective. *Copeia* (4): 700-719.
- Duellman, W. & Campbell, J. A. (1984). Two new species of *Plectrohyla* from Guatemala (Anura: Hylidae). *Copeia*, 390-397.
- Duellman, W.E. & Campbell, J.A. (1992). Hylid frogs of the genus *Plectrohyla*. Systematics and phylogenetic relationships. *Micellaneous publication* 181, Museum of Zoology. University of Michigan, USA. 32p.

- Duellman, W. & Trueb, L. (1994). *Biology of Amphibians*. USA: John Hopkins University Press.
- Godoy, J. C. (1999). *Los Volcanes de Guatemala: identificación y priorización para su Manejo dentro de la Estrategia de Desarrollo del Sistema Nacional de Áreas Protegidas*. Consejo Nacional de Áreas Protegidas. Guatemala. <http://www.conap.gob.gt/Members/admin/documentos/documentos-centro-de-documentacion/areas-protegidas/volcanes-20de-20guatemala.pdf>
- Goka, K., Yokoyama, J., Une, Y., Kuroki, T., Suzuki, K., Nakahara, M., Kobayashi, A., Inaba, S., Mizutani, T., Hyatt, A. D. (2009). Amphibian Chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Mol Ecol.* 18(23):4757-74.
- Gründler, M. C., Toledo, L. F., Parra-Olea, G., Haddad, C. F., Giasson, L. O., Sawaya, R. J., et al. (2012). Interaction between breeding habitat and elevation affects prevalence but not infection load of *Batrachochytrium dendrobatidis* in anuran assemblages. *Diseases of Aquatic Organisms* 97: 173-184
- Harris, R. N., Brucker, R. M., Walke, J. B., Becker, M. H., Woodhams, D. C., Schwantes, C. R., et al. (2009). Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. *ISME J.* 3:818-824.
- Heyer, R., Donnelly, M., McDiarmid, R. & Foster, M. (1994). *Measuring and Monitoring Biological Diversity Standard Methods For Amphibians*. USA: The Smithsonian Institution.
- INSIVUMEH: Instituto Nacional De Sismología, Vulcanología, Meteorología e Hidrología. 2006. <http://www.insivumeh.gob.gt/geofisica/programa.htm>
- Kilburn, VL, R Ibanez and DM Green. 2011. Reptiles as potential vectors and hosts of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Panama. *Diseases of Aquatic Organisms* 97: 127 – 134.
- Kilpatrick, A. M., Briggs, C. J. & Daszak, P. (2009). The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Evolution*, (October), 109-118. doi:10.1016/j.tree.2009.07.011
- Köhler, G. (2011). *Amphibians of Central America*. Offenbach, Herpeton.
- Kruger, K. M., Hines, H. B., Hyatt, A. D., & Boyle, D. G. (2006). Techniques for detecting chytridiomycosis in wild frogs: comparing histology with real-time Taqman PCR. *Diseases Of Aquatic Organisms*, 71, 141-148.

- Kruger, K. M., & Hero, J.M. (2007). The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is non-randomly distributed across amphibian breeding habitats. *Diversity and Distributions*, 781-788. doi:10.1111/j.1472-4642.2007.00394.x
- La Marca, E., Lips, K. R., Lötters, S., Puschendorf, R., Ibañez, R., Rueda-Almonacid, J. V., Schulte, R., Marty, C., Castro, F., Manzanilla-Puppo, J., García-Pérez, J. E., Bolaños, F., Chaves, G., Pounds, J. A., Toral, E., and Young, B. E. (2005). Catastrophic population declines and extinctions in neotropical Harlequin Frogs (Bufonidae: *Atelopus*). *Biotropica* 37: 190-201.
- Lamirande, E. W., and Nichols, D. K. 2002. Effects of host age on susceptibility to cutaneous chytridiomycosis in blue-and-yellow poison dart frogs (*Dendrobates tinctorius*). Proceeding of the Sixth International Symposium on the Pathology of Reptiles and Amphibians. R. G. McKinnell and D. L. Carlson, eds. Saint Paul, Minnesota.
- Lips, K.R. (1998). Decline of a Tropical Montane Amphibian Fauna. *Conservation Biology* 12(1), 106-117.
- Lips, K.R. (1999). Mass Mortality and Population Declines of Anurans at an Upland Site in Western Panama. *Conservation Biology* 13(1), 117-125.
- Lips, K.R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J.D., Alford, R.A., Voyles, J. et al (2006). Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *PNAS*. 13(9), 3165-3170.
- Longcore, J., Pessier, A. & Nichols, D. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* Gen. Et sp. Nov, a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*. 91(2), 219-227.
- McCranie, J. y Castañeda, F. (2007). *Guía de Campo de los Anfibios de Honduras*. Bibliomanía.
- Mendelson, J.R., Brodie, J. H., Malone, J., Jr., Acevedo, M. A., Baker, M.A., Smatresk, N.J. & Campbell, J.A. (2004). Factors associated with the catastrophic decline of a cloudforest frog fauna in Guatemala. *Rev. Biol. Trop.* 52(4), 991-1000.
- MUSHNAT-EB-USAC. (2009). *Estudio de Fauna del terreno municipal "Las Granadillas" Zacapa*. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Parra-Olea, G., Garcia-Paris, M., and Wake, D. B. (1999). Status of some populations of Mexican salamanders (Amphibia: Plethodontidae). *Revista de Biología Tropical* 47: 217-223.



- Parris, M. & Cornelius, T. (2004). Fungal Pathogen causes competitive and Developmental Stress in Larval Amphibian Communities. *Ecological Society of America*, 85: 3385-3395.
- Ponciano, I. y Glick, D. (1980). *Plan de manejo y desarrollo del Biotopo Universitario para la Conservación del Quetzal*. Universidad de San Carlos, Escuela de Biología. Guatemala.
- Pounds, J. A., Bustamante, M., Coloma, L., Consuegra, J., Fogden, M....Young, B. (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 439, 161-167.
- Piotrowski, J.S., Annis, S.L. & Longcore, J.E. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*.96(1), 9-15.
- Puschendorf, R., Castañeda, F. & McCranie, J. R. (2006). Chytridiomycosis in wild frogs from Pico Bonito National Park, Honduras. *EcoHealth* 3, 178-181.
- R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.  
<http://www.r-project.org/>
- Raffel, T. R, LeGros, R. P, Love, B. C, Rohr, J. R & Hudson, P. J. (2009). Parasite age-intensity relationships in red-spotted newts: does immune memory influence salamander disease dynamics? *International Journal for Parasitology* 39:231–241
- Raffel, T. R, Michel P. J, Sites, E. W, & Rohr, J. R. (2010). What drives chytrid infections in newt populations?: Associations with substrate, temperature, and shade. *Ecohealth* 7(4):526-36.
- Retallick, R., McCallum, H., and Speare, R. 2004. Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community post-decline. *PLOS Biology* 2: 1-7.
- Rovito, S.M., Parra-Olea, G., Vásquez-Almazán, C.R., Papenfuss, T.J. & Wake, D.B. (2009). Dramatic declines in Middle American salamanders are an important component of the global amphibian crisis. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America* 206, 3231-3236.
- Ruano, E., García, L., Vásquez-Almazán, C., Conde, A. y A. Zamora. (2012). “Evaluación de la Incidencia de Quitridiomicosis en Anfibios en tres regiones de endemismo: Los casos de los Bosques Nubosos de Zacapa, Baja Verapaz y San Marcos, Guatemala”. Informe Final. MUSHNAT/USAC-CONCYT. Guatemala.

- Schloegel, L. M., Hero, J. M., Berger, L., Speare, R., McDonald, K., and Daszak, P. (2005). The decline of the sharp-snouted day frog (*Taudactylus acutirostris*): the first documented case of extinction by infection in a free-ranging wildlife species? *EcoHealth* 3: 35-40.
- Schuster, J.C., Cano, E. B. y Cardona, C. (2000). Un método sencillo para priorizar la conservación de los bosques nubosos de Guatemala, usando Passalidae (Coleoptera) como organismos indicadores. *Acta Zool. Mex.* (n.s.) 80:197-209.
- Smith, K., Lips, K. & Chase, M. (2009). Selecting for extinction: nonrandom disease-associated extinction homogenizes amphibian biotas. *Ecology Letters* 12: 1069-1078. doi: 10.1111/j.1461-0248.2009.01363.x
- Speare, R. & Berger, L. (2004). Global distribution of chytridiomycosis in amphibians. World Wide Web- <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/chyglob.htm>
- Tyler, M. J., Wassersug, R. & Smith, B. (2007). How frogs and humans interact: influences beyond habitat destruction, epidemics and global warming. *Applied Herpetology* 4, 1-18.
- Valdez, O. I., Marroquín, D. E., Orellana, R. E., Pérez, S. G., Sandoval, K. J., Villar, L., ... Reyes, L. E. (1999). *Fauna en peligro de extinción de Guatemala: inventarios rápidos para la conservación*. Informe final (noviembre). Centro de Estudios Conservacionistas, Univ. San Carlos, Guatemala.
- Vásquez-Almazán, C. R. (2010). *Estado Actual de los sitios de la Alianza para la Cero Extinción (AZE) en Guatemala y el área de Protección Especial Sierra de Caral*. Guatemala.
- Vásquez-Almazán, C.R., Rovito, S.M., Good, D.A. & Wake, D.B. (2009). A new species of *Cryptotriton* (Caudata: Plethodontidae) from eastern Guatemala. *Copeia*, 2, 313-319.
- Véliz, M. y Islebe, G. Guatemala. En: Kappelle, M. y A.D. Brown (eds.). *Bosques Nublados del Neotrópico*. (pp 231-241). Costa Rica: Editorial INBio.
- Vonesh, J. R. & De La Cruz, O. (2002). Complex life cycles and density dependence: assessing the contribution of egg mortality to amphibian declines. *Oecologia* 133: 325-333. doi: 10.1007/s00442-002-1039-9.
- Vredenburg, V. y Briggs, C. (2007). Chytrid Swab Protocol (2004-2007). UC Berkeley, USA. Recuperado de [http://amphibiaweb.org/chytrid/swab\\_instruction07.pdf](http://amphibiaweb.org/chytrid/swab_instruction07.pdf)

- Vredenburg, V. T., Knapp, R. A., Tunstall, T. S., and Briggs, C. J. 2010. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 9689-9694.
- Wake, D., Papenfuss, T. & Lynch, J.F. (1992). Distribution of Salamanders along an Elevational Transect in Mexico And Guatemala. *Tulane studies in Zoology and Botany*. 303 - 319.
- Weldon, C., du Preez, L.H., Hyatt, A.D., Muller, R. & Speare, R. (2004). Origin of the Amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases* 10(12): 2100-2105.
- Woodhams, D. C., Ardipradja, K., Alford, R.A., Marantelli, G., Reinert, L. K., and Rollins-Smith, L. A. (2007). Resistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and is correlated with skin peptide defenses. *Anim. Conserv.* 10:409–417.
- Young, B. E., Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A. y Boucher, T. M. (2004). *Joyas que Están Desapareciendo: El Estado de los Anfibios en el Nuevo Mundo*. NatureServe, Arlington, Virginia.

## **ANEXOS**

## Anexo 1: Efecto de las variables en la presencia de Bd

**1.1** Modelo Lineal Generalizado (GLM) para analizar el efecto de las variables Modo reproductivo, microhábitat, localidad, LHC (índice de tamaño corporal) y altura (cm sobre el suelo) en la variable de respuesta Presencia de Bd,

### MODELO 1

```
glm(formula = Bd ~ Modo + Micro1 + Loc1 + LHC1 + altura, family =
binomial(logit),
    data = Datos)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.7642	-0.8263	-0.5305	1.0045	2.1205

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z )	
(Intercept)	-2.24918	1.23908	-1.815	0.069492	.
Modo[B]	-1.52401	0.42039	-3.625	0.000289	***
Micro1	-0.02425	0.16096	-0.151	0.880243	
Loc1	0.07654	0.07756	0.987	0.323732	
LHC1	3.14166	1.55028	2.027	0.042712	*
altura	-0.13322	0.33139	-0.402	0.687682	

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 207.88 on 155 degrees of freedom

Residual deviance: 172.96 on 150 degrees of freedom

(28 observations deleted due to missingness)

AIC: 184.96

Number of Fisher Scoring iterations: 4

### MODELO 2

```
glm(formula = Bd ~ Modo:LHC + Mic1 + Loc1 + altura
    family = binomial(logit), data = Datos)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.5674	-0.8939	-0.6675	1.0814	2.0348

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z )
(Intercept)	-0.20355	0.45999	-0.443	0.658
Microhábitat1	0.09518	0.14914	0.638	0.523
Loc1	0.09090	0.07216	1.260	0.208
altura..m.suelo.	0.04571	0.30902	0.148	0.882
Modo:LHC	-0.04468	0.01054	-4.240	2.24e-05 ***

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 207.88 on 155 degrees of freedom

Residual deviance: 186.95 on 151 degrees of freedom

(28 observations deleted due to missingness)

AIC: 196.95

Number of Fisher Scoring iterations: 4

## COMPARACION DE LOS DOS MODELOS

```
> anova(GLM.2, GLM.3, test="Chisq")
```

Analysis of Deviance Table

Model 1: Bd ~ Modo + Mic1 + Loc1 + LHC1 + altura

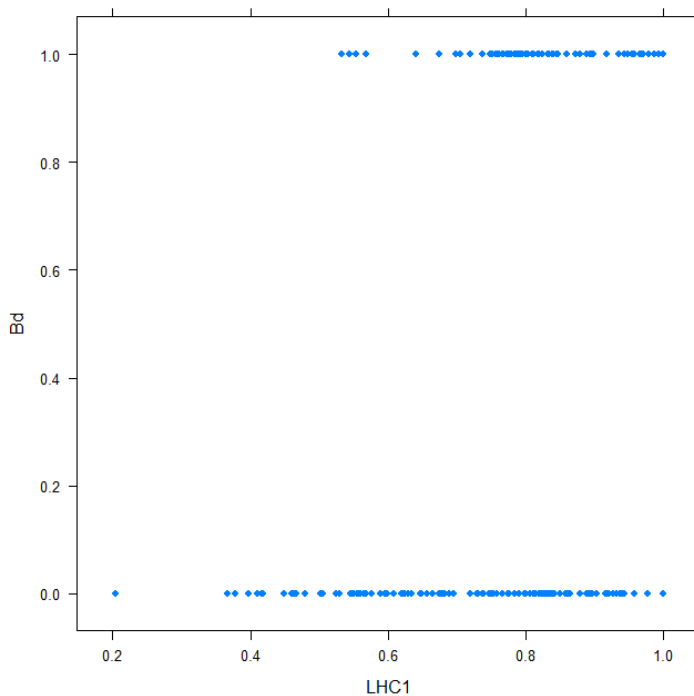
Model 2: Bd ~ Modo:LHC + Mic1 + Loc1 + altura

	Resid. Df	Resid. Dev	Df	Deviance	Pr(>Chi)
1	150	172.97			
2	151	186.95	-1	-13.981	0.0001846 ***

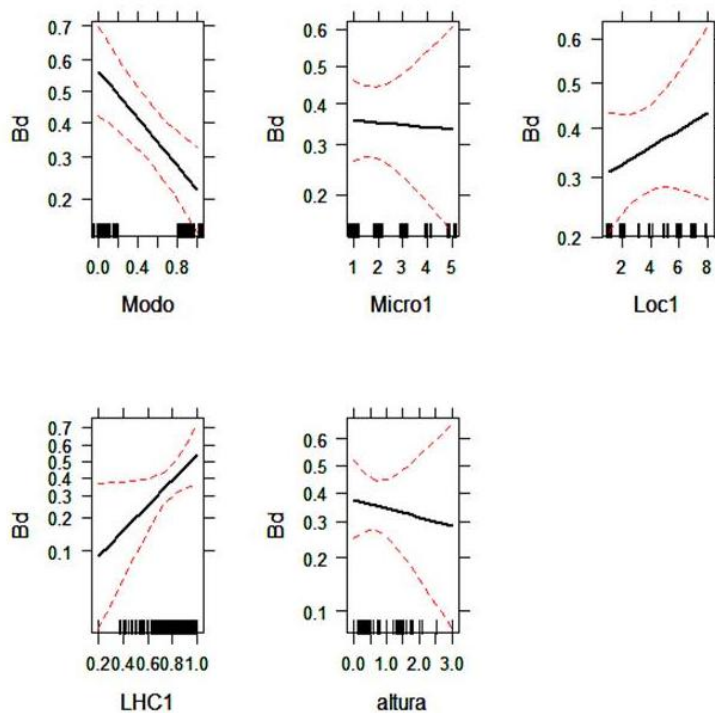
---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

**1.2 b)** Gráfica de distribución individuos positivos para Bd (1) y negativos (0) en relación al tamaño corporal,



**1.3** Diagramas del efecto de las variables explicativas incluidas en el GLM sobre la presencia de Bd. (Modo=modo reproductivo, Micro1=microhábitat, Loc1=localidad, LHC1=índice de tamaño corporal).



**Anexo 2:** Modelo Lineal Generalizado (GLM) para analizar el efecto de las variables Modo reproductivo, LHC (índice de tamaño corporal) y en la variable de respuesta nivel de infección (número de zoosporas equivalentes)

Call:

```
glm.nb(formula = ZEq ~ Modo + Loc1 + LHC - Loc1, data = Datos,
       init.theta = 0.08617115766, link = log)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.210	-1.032	-0.804	-0.468	2.326

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z )
(Intercept)	-6.96196	1.47777	-4.711	2.46e-06 ***
Modo[T.Ind]	0.57337	0.58762	0.976	0.329
LHC	0.12203	0.02029	6.016	1.79e-09 ***

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(0.0862) family taken to be 1)

Null deviance: 181.97 on 183 degrees of freedom  
 Residual deviance: 139.22 on 181 degrees of freedom  
 AIC: 800.04

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 0.0862  
 Std. Err.: 0.0116

2 x log-likelihood: -792.0360



**Anexo 3: a)** Análisis de razón de probabilidades (“Odds ratio”) para las variables Modo reproductivo y LHC (índice de tamaño corporal) en la presencia de Bd. **b)** Probabilidades proyectadas para distintos tamaños corporales (índice de tamaño corporal) y modo reproductivo.

a)

Variable	Razón de probabilidad	Intervalo de confianza
Modo Reproductivo (A)	0.2178375	0.095563854 - 0.4965599
LHC	23.1423639	1.108679588 - 483.0692419

b)

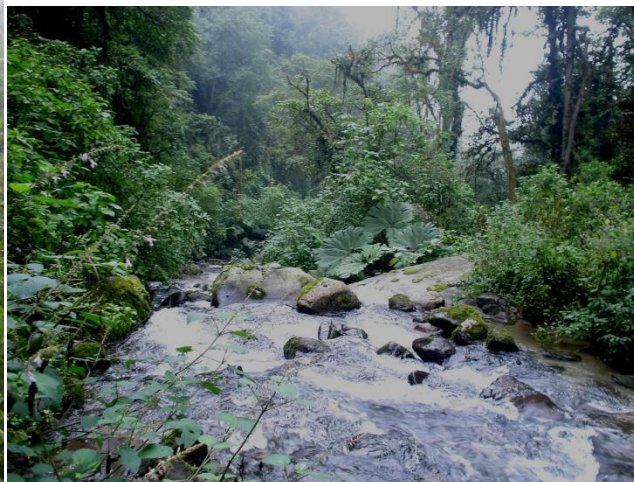
Índice de tamaño corporal (0-1)	Modo Reproductivo A (desarrollo indirecto, hábitos más asociados al agua)	Modo Reproductivo B (desarrollo directo, hábitos menos asociados al agua)
0.2	0.1937296	0.06631283
0.4	0.2897443	0.1076063
0.6	0.4091944	0.1699334
0.8	0.5404198	0.2579273
1.0	0.6662699	0.3711141

**Anexo 4:** Fotografías de algunas de las localidades de colecta y especies estudiadas.



Bosque nuboso en aldea La Trinidad,  
Tajumulco, San Marcos.

Fotos: L. García



Bosque nuboso en el Refugio del  
Quetzal, San Rafael Pie de la Cuesta,  
San Marcos.

Fotos: L. García







Bosque municipal de La Unión, Zacapa. Fotos: J. Conde



Bosque en Chilascó, Salamá, Baja Verapaz (parte de la Reserva de Biósfera Sierra de las Minas).  
Fotos: A. Zamora





*Plectrohyla matudai* (Foto: L. García).



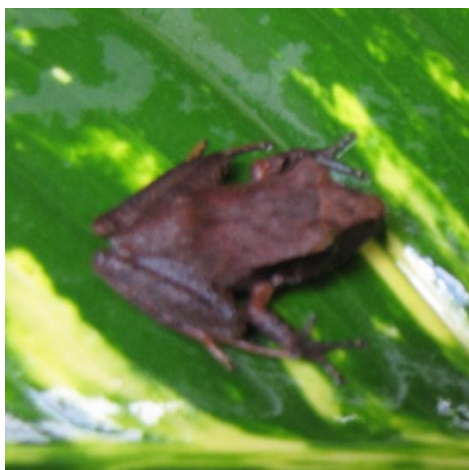
*Bolitoglossa helmrichi*



*Ptychohyla hypomykter* (Foto: J. Conde)



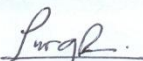
*Bolitoglossa conanti* (Foto: J. Conde)



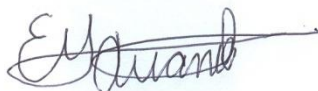
Juvenil de *Craugastor laticeps*



*Craugastor bocourti* (Foto: A. Zamora)



Liza Iveth García Recinos  
Estudiante



Lic. Edgar Gustavo Ruano Fajardo  
Asesor



Lic. Claudio Aquiles Méndez Hernández  
Revisor



Sergio Alejandro Melgar Valladares, Ph.D.  
Director  
Escuela de Biología



Óscar Manuel Cobar Pinto, Ph.D.  
Decano  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia