

REF.IIQB.82.02.2021

Guatemala, 25 de febrero del 2021

Señor Director  
Dr. Félix Alan Douglas Aguilar Carrera  
Director General de Investigación  
Universidad de San Carlos de Guatemala



Señor Director:

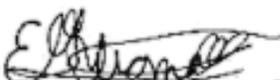
Con un cordial saludo me dirijo a usted para adjuntar el informe final del proyecto: **“Rasgos funcionales asociados a comunidades de anfibios del corredor de bosque nubosos de Baja Verapaz: ¿Microbioma bacteriano como rasgo funcional?”** con código B30-2030 coordinado por el M.Sc. Edgar Gustavo Ruano Fajardo y avalado por el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Este informe final fue elaborado con base en la guía de presentación de la Dirección General de Investigación, el cual fue revisado su contenido en función del protocolo aprobado, por lo que esta unidad de investigación da la aprobación y aval correspondiente.

Asimismo, la coordinadora del proyecto, se compromete a dar seguimiento y cumplir con el proceso de revisión y edición establecido por DIGI del **informe final y del manuscrito científico**. El manuscrito científico debe enviarse, por la coordinadora del proyecto, para publicación, al menos, en una revista de acceso abierto (*Open Access*) indexada y arbitrada por expertos en el tema investigado.

Sin otro particular, suscribo atentamente.

*“Id y enseñad a todos”*



M.Sc. Edgar Gustavo Ruano Fajardo  
Coordinador del Proyecto



Dra. María Eunice Enriquez Coitón  
Directora  
Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

c.c. archivo  
MEEC/tvch.

Universidad de San Carlos de Guatemala  
Dirección General de Investigación  
Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas

Informe final

**Rasgos funcionales asociados a comunidades de  
anfibios del corredor de bosque nuboso de Baja  
Verapaz: ¿Microbioma bacteriano como rasgo  
funcional?**

Equipo de investigación

**M.Sc. Edgar Gustavo Ruano Fajardo**  
Coordinador del proyecto

Br. Maria Fernanda Orrego Muralles  
Auxiliar de investigación I

Guatemala, 25 de febrero de 2021

Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Dr. Félix Alan Douglas Aguilar Carrera  
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar  
Coordinador General de Programas

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar  
Coordinador del Programa de Investigación

*M.Sc.* Edgar Gustavo Ruano Fajardo  
Coordinador del proyecto

Br. Maria Fernanda Orrego Muralles  
Auxiliar de investigación I

Otros colaboradores:  
Lic. Julio Rafael Morales Álvarez  
Universidad San Carlos de Guatemala - USAC

*M.Sc.* Jessica Yara Araujo Galdino  
Universidade Federal da Paraíba – UFPB, Brasil  
Asociación Organización Nacional para la Conservación y el Ambiente - ONCA

Br. Rosa Alejandra Roldán  
Universidad San Carlos de Guatemala - USAC

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, 2021. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la Partida Presupuestaria 4.8.63.4.41. durante el año 2020 en el Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas.

## Índice (numérico)

<b>1</b>	<b>Resumen</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>Introducción</b> .....	<b>7</b>
<b>4</b>	<b>Planteamiento del problema</b> .....	<b>9</b>
<b>5</b>	<b>Preguntas de investigación</b> .....	<b>10</b>
<b>6</b>	<b>Delimitación en tiempo y espacio</b> .....	<b>10</b>
<b>7</b>	<b>Marco teórico</b> .....	<b>11</b>
<b>8</b>	<b>Estado del arte</b> .....	<b>15</b>
<b>9</b>	<b>Objetivo general</b> .....	<b>16</b>
<b>10</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>16</b>
<b>11</b>	<b>Hipótesis</b> .....	<b>17</b>
<b>12</b>	<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>17</b>
12.1	Enfoque y tipo de investigación: .....	17
12.2	Recolección de información: .....	17
12.3	Rasgos funcionales .....	20
12.4	Toma de datos de Hongo Quítrido y microbioma .....	20
12.5	Operacionalización de las variables o unidades de análisis: .....	21
12.6	Procesamiento y análisis de la información: .....	22
<b>13</b>	<b>Vinculación, difusión y divulgación</b> .....	<b>23</b>
<b>14</b>	<b>Productos, hallazgos, conocimientos o resultados:</b> .....	<b>23</b>
<b>15</b>	<b>Análisis y discusión de resultados:</b> .....	<b>32</b>
<b>16</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>34</b>
<b>17</b>	<b>Impacto esperado</b> .....	<b>34</b>
<b>18</b>	<b>Referencias</b> .....	<b>35</b>
<b>19</b>	<b>Apéndice</b> .....	<b>46</b>
	<b>Listado de los integrantes del equipo de investigación</b> .....	<b>51</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1:</b> Área de fragmentos de bosque dentro del Corredor Biológico del Bosque Nuboso de Baja Verapaz y Alta Verapaz .....	18
<b>Tabla 2:</b> Operacionalización de las variables o unidades de análisis por objetivo específico.....	21
<b>Tabla 3:</b> Rasgos funcionales de especies de anfibios encontradas en el corredor nuboso de Alta Verapaz.....	24
<b>Tabla 4:</b> Rasgos funcionales de especies de anfibios medidas en el corredor nuboso de Alta Verapaz.....	26
<b>Tabla 5:</b> Especies con muestras de microbioma y <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> -Bd.....	27

## Índice de figuras (fotografías, gráficas, diagramas)

<b>Figura 1:</b> Mapa de las áreas de estudio.....	18
<b>Figura 2:</b> Tamaño del efecto estandarizado (TEE) de los estadísticos T-rasgo para los cuatro rasgos de anfibios simulados para diferentes fragmentos de bosque nuboso.....	28
<b>Figura 3:</b> Tamaño del efecto estandarizado (TEE) de los estadísticos T-rasgo para los cinco rasgos de anfibios para diferentes fragmentos de bosque nuboso de la región de Baja Verapaz y Alta Verapaz.....	29
<b>Figura 4:</b> Estimación de densidades de Kernel, para todas las especies en conjunto, para cada uno de los rasgos en cuatro localidades de bosque nuboso .....	30
<b>Figura 5:</b> Estimación de densidades de Kernel con el rasgo ancho de cabeza para todas las especies, presentes en los bosques nubosos.....	31

## Apéndice

<b>Apéndice 1:</b> Estimación de densidades de Kernel para cada uno de los rasgos en las localidades donde están presentes del bosque nuboso.....	46
<b>Apéndice 2:</b> Estimación de densidades de Kernel para r cada uno de los rasgos en las localidades donde están presentes del bosque nuboso. ....	47
<b>Apéndice 3:</b> Estimación de densidades de Kernel para ranas de hojarasca, para todas las especies en conjunto, para cada uno de los rasgos en las localidades donde están presentes del bosque nuboso.....	48
<b>Apéndice 4:</b> Estimación de densidades de Kernel para todas las especies, presentes del bosque nuboso.....	49
<b>Apéndice 5:</b> Protocolo de almacenamiento de ADN para hongos y microbioma.....	50

## **Rasgos funcionales asociados a comunidades de anfibios del corredor de bosque nubosos de Baja Verapaz: ¿Microbioma bacteriano como rasgo funcional?**

### **1 Resumen**

Los bosques nubosos, en los últimos años, están amenazados por la transformación antropogénica y el cambio climático, reduciendo el efecto positivo de la diversidad biológica para fomentar servicios ecosistémicos. Tomando en cuenta a los anfibios como modelo, la ecología funcional fue utilizada como herramienta para evaluar la pérdida de diversidad biológica en un gradiente de bosques nubosos de región de las Verapaces, considerando 4 fragmentos de bosque con diferentes condiciones de tamaño. Se utilizó información sobre anfibios previamente colectados (14 especies) y simulaciones de la distribución de los rasgos morfométricos (18 especies), basados en información de literatura. Muestras del microbioma bacteriano de la piel y del hongo patógeno de anfibios *Batrachochytrium dendrobatidis* fueron colectadas de 10 especies en el BUCQ para análisis futuros, con el fin de asociar su efecto como rasgos funcionales en los procesos de ensamblaje de las comunidades de anfibios. En base a los patrones sugeridos por nuestro modelo simulado y observado, los rasgos funcionales reflejan mejor la pérdida de biodiversidad que la riqueza taxonómica en anfibios. Por ejemplo, los fragmentos de bosques medianos (Biotopo del Quetzal y Chelemhá), a pesar de tener riqueza comparable al fragmento mayor, tuvieron como resultado una menor amplitud de todos los rasgos funcionales morfológicos, sugiriendo menor variabilidad en las poblaciones. De esta manera, la conectividad y tamaño de fragmentos podría ser evaluada por medio de rasgos funcionales en anfibios en bosques que aparentemente albergan diversidad representativa y así fomentar la conservación de anfibios del corredor de bosque nuboso.

**Palabras clave:** Anura; Salamandras; Rasgos; Quítrido; Biodiversidad.

### **2 Abstract**

In recent years, cloud forests are threatened by anthropogenic transformation and climate change, reducing the positive effect of biological diversity for ecosystem services. Using amphibians as a model, functional ecology was proposed as a tool to evaluate the loss of functional diversity in a

cloud forests in Verapaz region; considering different forest fragment size conditions. Information of amphibians previously collected (13 species) was used and simulations of the distribution of morphometric traits of amphibians were made (18 species); based on information from the literature. Also, samples of bacterial microbiome and the pathogenic fungus of amphibians *Batrachochytrium dendrobatidis* were collected from skin of 10 species of amphibians in the BUCQ for future analysis, in order to associate their effect as functional traits in the assembly processes of amphibian communities. Based on the patterns suggested by our simulated model and measured data, functional traits reflected biodiversity loss better than taxonomic richness in amphibians. For instance, the median forest fragment (Biotopo del quetzal and Chilasco), despite having richness comparable to the largest fragment, the amplitude of all morphological functional traits was narrower compared to other fragments. This suggests less variability in its functional traits. This leads us to suggest that the connectivity and size of fragments could be evaluated in apparently well-preserved areas by amphibian functional traits and could be important to promote amphibian conservation in the cloud forest.

**keywords**

Anura; Salamanders; Trait; Chytrid; Biodiversity.

**3 Introducción**

En la actualidad se ha evidenciado, desde lo teórico-experimental hasta lo observacional, que existe una relación positiva del efecto de la diversidad biológica sobre la funcionalidad de un ecosistema (Baert, Eisenhauer, Janssen, & De Laender, 2018). Independientemente del enfoque y debate, que atiende a explicar el proceso que conlleva a la formación de esos ensamblajes altamente diversos biológicamente (Chase, 2014; Hubbell, 2001; Scheffer, van Nes, & Vergnon, 2018), varios científicos han advertido sobre la pérdida masiva de diversidad en todos sus niveles considerando como la sexta extinción masiva (McCallum, 2015; Wake & Vredenburg, 2008), en muchos casos mostrando que el mayor factor está asociado a la pérdida de bosques. Sin embargo, otros factores han sido considerados sinérgicos en la pérdida de la biodiversidad como los contaminantes, cambio de clima, enfermedades, etc. Dentro de este contexto también la funcionalidad de los ecosistemas ha estado modificándose (Barlow et al., 2016).

Los anfibios específicamente tienen la habilidad de mantener la energía y materiales en su comunidad; además de la construcción de interacciones entre redes tróficas de un ecosistema (Gravel, Albouy, & Thuiller, 2016); y al parecer son uno de los grupos con mayor amenaza global. De hecho, el 40% de todas las especies se encuentran bajo alguna categoría de amenaza, según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza – IUCN- (Stuart et al., 2008). Las disminuciones se han asociado con varios factores como la deforestación, la contaminación ambiental, el cambio climático, la introducción de especies exóticas, las enfermedades y una sinergia compleja de ellas en un contexto geográfico (Blaustein et al., 2011; Hof, Araújo, Jetz, & Rahbek, 2011). Coincidentemente una de las mayores amenazas para este grupo es la pérdida de hábitat, debido a la naturaleza dinámica espacial y temporal de sus poblaciones. De manera que la deforestación expone a los anfibios a fuertes cambios en los regímenes microclimáticos, homogeneiza la complejidad del hábitat y separa las poblaciones, aumentando la probabilidad de extinción poblacional regional (Hussain & Pandit, 2012).

En los últimos 30 años, se ha iniciado un esfuerzo en estudiar el fenómeno del declive de las poblaciones de anfibios (Stuart et al., 2008; Wake & Vredenburg, 2008). Curiosamente, se ha encontrado que, a pesar del declive poblacional de algunas especies de anfibios, muchas especies aún siguen presentes en los bosques y probablemente han cambiado sus roles en el ecosistema, pasando desapercibido su homogenización funcional. Por ejemplo, se han evidenciado que especies comunes hace 40 años ahora son raras y algunas especies que eran raras ahora son comunes; como el caso de la salamandra *Bolitoglossa morio* (Rovito, Parra-Olea, Vásquez-Almazán, Papenfuss, & Wake, 2009). Esto nos sugiere que, a pesar de mantener la riqueza de anfibios, especialmente en los bosques nubosos, existe un recambio en su funcionalidad; un aspecto que no se ha considerado profundamente. Por ejemplo, la detección de enfermedades, como la quitridiomycosis, en anfibios en bosque nubosos de Guatemala (Ruano-Fajardo et al., 2012) es un indicador de advertencia de perturbación del sistema, que puede afectar la funcionalidad ecosistémica de anfibios. Por otro lado, la riqueza de microbioma ha sido vinculada a proveer beneficios de buena salud, resistencia a enfermedades y adaptación a ambientes (Jiménez & Sommer, 2017). Por estas razones es de suma importancia asociar estudios que incluyan la patogenicidad con el microbioma como rasgos funcionales en los ensambles de anfibios. Por ejemplo, Ellison, y colaboradores (2018) presentan el único estudio con microbioma de anfibios de Guatemala. Este estudio sugiere que la historia

filogenética de anuros influye en la diversidad y la estructura de la comunidad del microbioma bacteriano; en niveles taxonómicos amplios (entre órdenes). Además, sugiere que la influencia del tipo de hábitat, en la comunidad de microbioma de la piel de anfibios, es de importancia a nivel de género y especies. Ellison, y colaboradores (2018) también recomiendan hacer estudios con múltiples clados a nivel de especie, además de incluir muestras de microbioma del hábitat. En otro estudio, en el bosque atlántico brasileño, se evidenció que la composición del microbioma bacteriano, de poblaciones de la rana *Dendropsophus minutus* (Hylidae), está asociado a la conectividad que tenga con distintos parches de bosque (Becker, Longo, Haddad, & Zamudio, 2017). A la vez, hace ver que es de los primeros estudios que utiliza la relación de la heterogeneidad del paisaje para evaluar la relación de los anfibios con su microbioma y como hospederos del hongo patógeno quítrido. Sin embargo, ambos no consideran el ensamble de comunidad de anfibios a un nivel de individuo como parte de evaluar la estructura y composición local. Cabe mencionar que no existe un estudio de rasgos funcionales en animales de Guatemala. Por lo que este estudio planteó evaluar la pérdida de diversidad funcional de anfibios en gradientes ambientales en el contexto del corredor de bosque nuboso en Baja Verapaz. Específicamente, basados en las herramientas de la ecología funcional; utilizando características fenotípicas funcionales de anfibios (e.j. infección del hongo quítrideo, tamaño, longitud del fémur, masa corporal, etc.), a nivel individual y de especies, para asociar procesos ambientales en la estructuración de comunidades de especies y su relación con la función de ecosistemas en gradientes ambientales de bosques nubosos.

#### **4 Planteamiento del problema**

Los bosques nubosos poseen generalmente un ensamble con alta diversidad biológica y endemismo. Sin embargo, estos bosques son amenazados por la transformación antropogénica y el cambio climático (Figuroa-Rangel, Willis, & Olvera-Vargas, 2010). Esta transformación de bosques está asociada a una pérdida del vínculo que tiene el ensamble de la diversidad biológica y la complejidad funcional emergente, tomando en cuenta el paradigma del efecto de la diversidad biológica sobre la función ecosistémica (Tilman, Isbell, & Cowles, 2014). En otras palabras, nos permite asociar que a una mayor coexistencia de especies e individuos se promueve una mayor complejidad de interacciones entre organismos. Especialmente, si estas comunidades están caracterizadas por tener alta variación, intraespecífica e interespecífica, de rasgos funcionales (McGill, Enquist, Weiher, &

Westoby, 2006; Violle et al., 2012). A la vez, una alta diversidad biológica en un ecosistema puede potencializar diferentes tipos de servicios ecosistémicos (Cardinale et al., 2012).

Los anfibios son un buen modelo para evaluar la pérdida de diversidad funcional. Por ejemplo, hay evidencias que a pesar de tener una alta diversidad de anfibios en paisajes fragmentados y antropogenizados, estos están sujetos a la pérdida de diversidad funcional por medio de la homogenización de sus rasgos de adecuabilidad (Riemann, Ndriantsoa, Rödel, & Glos, 2017). Esto sugiere que los rasgos de anfibios son altamente sensibles a su entorno, posiblemente por poseer un desarrollo bifásico (Wells, 2010); una fase interactuando con redes tróficas terrestres (adultos) y otra fase con redes acuáticas (larva). Además, su piel presenta un microbioma bacteriano que está asociado a su inmunidad; y por ende a su sobrevivencia y adecuabilidad (Jiménez & Sommer, 2017). Basados en la importancia de este grupo en un ecosistema surgió la pregunta ¿Cuál es el efecto de la pérdida de bosques nubosos en los rasgos funcionales de anfibios? Este proyecto utilizó la ecología funcional, como herramienta, para evaluar la pérdida de diversidad funcional de anfibios en gradientes ambientales de bosques nubosos.

## **5 Preguntas de investigación**

¿Cuál es el impacto de la pérdida de bosques nubosos en los rasgos funcionales de anfibios?

¿Cuál es la contribución de la variabilidad intraespecífica de los rasgos funcionales de anuros en los procesos de ensamblaje de la comunidad?

## **6 Delimitación en tiempo y espacio**

Delimitación en tiempo: El proyecto tuvo duración de 12 meses, con inicio en febrero 2020 y finalización en febrero 2021. Sin embargo, se incluyeron datos de la Colección Zoológica de Referencia de la Escuela de Biología, Universidad San Carlos de Guatemala. Parte de estos datos fueron colectados en 2010 y 2011 en el proyecto FODECYT 70-2009; otra parte fue colectada por Gustavo Ruano en 2011 en la Reserva Natural Privada Chelemhá, Alta Verapaz.

Delimitación espacial: El área de estudio es parte del Corredor de Bosque Nuboso. Para el análisis de rasgos funcionales de anfibios se consideró 4 parches de bosque: Sachut, Sierra de las Minas y el Biotopo Universitario para la Conservación del Quetzal -BUCQ, en Baja Verapaz y la Reserva Natural Privada Chelemhá, Alta Verapaz. Muestras de microbioma de la piel de especies de anfibios

fueron tomadas únicamente en el BUCQ, el cual se ubica en las coordenadas geográficas latitud 90°13'15'' y longitud 15°13'00''.

## 7 Marco teórico

### Estudios basados en Rasgos Funcionales

Los estudios basados en rasgos se han empleado en ecología, para el estudio de los procesos de ensamblaje de las comunidades. Existen dos principios opuestos en cuanto a estos procesos: el filtrado de hábitat o filtro externo y la diferenciación de nicho o filtro interno (Violle et al., 2012). El filtrado de hábitat tiene como resultado una mayor similitud de los rasgos debido a las restricciones abióticas. Por otro lado, la diferenciación de nicho evita que las especies coexistentes sean demasiado similares, por lo que se espera que las diferencias fenotípicas entre los individuos o las especies en una comunidad, sean mayores en comparación con un ensamble aleatorio (Kraft et al., 2015).

Ernst y sus colaboradores (2011) determinaron que el filtrado ambiental contribuye al proceso de ensamblaje de los rasgos de anfibios en tres conjuntos regionales (Sur América, África Occidental y Sudeste Asiático). Asimismo, Xavier Jordani y colaboradores (2019) evidenciaron que los filtros internos, como las interacciones bióticas y el uso de microhábitat, son los que contribuyen mayormente en el ensamblaje de larvas de anfibios del bosque atlántico brasileño. Por lo que, existe poca superposición de las distribuciones de los rasgos entre las poblaciones dentro de las comunidades. La mayoría de estudios de diversidad funcional se ha centrado en la variación interespecífica de los rasgos, sin embargo, existe evidencia que la variabilidad intraespecífica tiene cierto efecto en la coexistencia y en las dinámicas de las comunidades (Jung et al., 2010; Bolnick et al., 2011). Esto se basa en que ciertos individuos pueden poseer un comportamiento más especializado para la búsqueda de alimento o en la selección de hábitats alternativos (Araújo, Bolnick & Layman, 2011; Bolnick et al., 2011). Por ello, Violle y colaboradores (2012) proponen un enfoque para la evaluación del ensamblaje de las comunidades, en el que se considera la distribución de los rasgos de los individuos en cuatro niveles jerárquicos: individual, poblacional, comunitario y regional.

La comprensión de los mecanismos que influyen en el ensamblado de las comunidades, así como en los patrones de la distribución de los rasgos; es base para el estudio de las respuestas de las

comunidades ante cambios ambientales, incluida la perturbación humana (Chapin et al., 2000). Se ha documentado una menor diversidad funcional de anfibios en bosques degradados, en comparación con bosques conservados (Ernst, Linsenmair & Rödel, 2006). Esta pérdida de diversidad funcional tiene un efecto sobre la capacidad de los ecosistemas para continuar brindando servicios ecosistémicos (Chapin et al., 2000). Esto se debe a que existe un vínculo entre el funcionamiento del ecosistema y los rasgos funcionales. Para el caso de anfibios, el tamaño del cuerpo y el ancho de la boca están asociados con el tamaño de las presas ingeridas (Parmelee, 1999); lo que, a su vez, está relacionado con el flujo de energía en las redes alimenticias. Esto es importante ya que los anfibios tienen el papel ecosistémico de controlar las poblaciones de insectos (Mollov, Boyadzhiev & Donev, 2010). En cambio, como presa son una fuente abundante de proteínas, sobre todo para los animales en niveles tróficos más altos (Boyd & Goodyear, 1971). Además, los anfibios, debido a su característico ciclo de vida, han sido utilizados para evaluar el estado de salud de los bosques y ecosistemas. Así mismo pueden ser sujetos a brindar servicios ecosistémicos que van desde mantener las poblaciones de insectos en equilibrio (ej. *Culex sp.*), hasta buscar propiedades repelentes del microbioma de su piel (Valencia-Aguilar, Cortés-Gómez, & Ruiz-Agudelo, 2013).

### **Anfibios**

Guatemala como parte de Centroamérica nuclear, presenta una alta diversidad de anfibios (164 especies) y endemismo (35.7%) (obs.per.). Históricamente, varios estudios han intentado explicar el proceso evolutivo que dio forma al patrón de alta diversidad en las elevaciones intermedias de Centroamérica nuclear; especialmente en el bosque nublado montano húmedo del bloque maya y chorti de Guatemala (ej. Campbell, 1999; Smith et al., 2007; Wake, 1987). De donde resulta que la diversidad de anfibios en esta región (es decir, Centroamérica nuclear) generalmente está asociada con patrones de gradientes climáticos, estructura de vegetación diversa y una geología compleja (ej. Wiens, Parra-olea, García, & Wake, 2007; Gutiérrez-García & Vázquez-Domínguez, 2013). Cabe mencionar, que esta región también presenta un grado alto de amenaza de declive poblacional con aproximadamente la mitad de sus especies en peligro (Stuart et al., 2008).

En el corredor de bosque nuboso se reportan aproximadamente 22 especies de anfibios, de las cuales muchas especies son endémicas. Dentro de los grupos más abundantes en el área se encuentran

especies de ranas de la familia Hylidae y salamandras de la familia Plethodontidae. Algunas especies de anfibios que podemos mencionar para el área son las salamandras *Cryptotriton veraepacis*, *Bolitoglossa daryorum*, *B. meliana*, *Bolitoglossa meliana*, *Nyctanolis pernix*; las ranas *Dryophytes bocourti*, *Craugastor daryi*, *C. bocourti*, *C. brocchi*, *C. xucanebi*, *Plectrohyla hartwegi*, *P.pokomchi*, *Ecnomiohyla minera*, entre otras.

### ***Batrachochytrium dendrobatidis* -Bd-**

El hongo quítrido (Clase Chytridiomycetes: Orden Chytridiales), *Batrachochytrium dendrobatidis* -Bd-, es un patógeno de la piel de anfibios que puede causar quitridiomycosis; la cual puede llegar a ser letal. Esta enfermedad se describió en 1999 en anfibios de Australia, América del Norte y Central (Longcore, Pessier, & Nichols, 1999) y se detectó en todos los continentes excepto en la Antártida (Fisher, Garner, & Walker, 2009). Además, el hongo quítrido se ha detectado en al menos 516 especies de anfibios en todo el mundo (Olson et al., 2013). Actualmente la hipótesis más aceptada es que se dispersó desde una cepa que proviene de la península de Corea (BdASIA-1) por medio del comercio de anfibios desde el siglo XX (O'Hanlon et al., 2018). El hongo quítrido sigue una progresión dinámica de enfermedad con etapas epizoóticas y enzoóticas. Por ejemplo, durante una etapa epizoótica, el quítrido afecta a poblaciones de anfibios que no han sido afectadas y puede comportarse como una ola asesina que puede reducir el 50% de la riqueza de especies y producir disminuciones masivas de la población (ej. Brem & Lips, 2008). Por otro lado, la etapa enzoótica del quítrido puede tener una prevalencia constante y reducir la mortalidad de anfibios (Bataille et al., 2013; Rodriguez, Becker, Pupin, Haddad, & Zamudio, 2014).

En el caso de Guatemala se tiene reportado que las primeras infecciones de este hongo se dieron en la Sierra de las Minas en el año 1981. Esta fecha coincide con los declives poblacionales observados en los años 90 (Mendelson et al., 2014). Además, para el año 2010 se confirmó que en los bosques nubosos de Guatemala se tiene altas prevalencias de esta enfermedad. Cabe mencionar que una de estas áreas es el corredor de bosques nubosos de Baja Verapaz (Ruano-Fajardo et al. 2012). En el transcurso de aproximadamente 15 años no se han identificado muertes masivas de anfibios en Guatemala, por lo que probablemente se puede considerar hasta el momento como una etapa enzoótica con alta prevalencia.

El hongo quítrido infecta células epidérmicas queratinizadas de anfibios adultos y partes bucales queratinizadas (disco oral de la mandíbula y dientes) de renacuajos (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 (Piotrowski, Annis, & Longcore, 2004). Específicamente, los anfibios adultos con infección por zoosporas altas pueden morir por paro cardíaco debido a la absorción de Na<sup>+</sup> atenuada a través de la piel (Campbell, Voyles, Cook, & Dinudom, 2012; Voyles et al., 2009). En contraste, la mortalidad de renacuajos es escasa (Kilpatrick, Briggs, & Daszak, 2010), pero Bd puede afectar la capacidad de ingesta de alimentos, la eficiencia de forrajeo, comportamiento, crecimiento y desarrollo (Han, Bradley, & Blaustein, 2008; Venesky, Wassersug, & Parris, 2010). Además, el reconocimiento de los factores que influyen en Bd y los anfibios en microhábitats a escala fina son necesarios para comprender la dinámica de del quítrido dentro de un hábitat. Por ejemplo, factores externos abióticos (clima, contaminantes, temporalidad, etc.) y factores bióticos como la historia natural de algunos anfibios, microbioma, o rasgos de comportamiento en microhábitats específicos pueden afectar la relación patógeno-hospedero (Blaustein et al., 2018). Por tanto, el hongo es un factor que puede afectar algunos rasgos que brindan adecuabilidad a individuos, larvas y adultos, dentro de un ecosistema.

### **Microbioma**

Todas las plantas y animales son hospederos de diversas comunidades de microorganismos denominadas en conjunto microbioma, el cual juega un rol importante en procesos desde nutrición, desarrollo de tejidos hasta modulación del sistema inmune (Koropatnick et al., 2004; Mazmanian et al., 2005; Turnbaugh et al., 2006). En anfibios el microbioma de piel ha sido de interés recientemente debido a que algunas bacterias producen metabolitos antifúngicos que sirven de protección contra el patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (Becker et al., 2015; Catenazzi et al., 2017; Harris et al., 2009; Woodhams et al., 2007). Estudios muestran que la susceptibilidad a este hongo está asociado a la variación en el microbioma de la piel en algunas especies y poblaciones de anfibios (Becker et al., 2015; Lam, Walke, Vredenburg, & Harris, 2010; Longo & Zamudio, 2017a). Estas comunidades bacterianas en la piel de anfibios pueden variar en asociación a varios factores como especie hospedera, poblaciones, presencia de patógenos, estadio de desarrollo y estacionalidad, entre otros (Jiménez & Sommer, 2017).

Varios estudios muestran que la localidad tiene gran influencia en la composición del microbioma (Hernández-Gómez et al., 2017; Hughey et al., 2017; Kueneman et al., 2013; Longo & Zamudio, 2017b; Muletz Wolz et al., 2018; Prado-Irwin et al., 2017), reforzando la idea que el ambiente es una fuente importante para el microbioma en anfibios. En este sentido, cambios extremos en las condiciones locales como deforestación y fragmentación del hábitat pueden tener un efecto mayor en la composición del microbioma de piel. Becker y colaboradores (2017) encontraron que una mayor conectividad en parches de bosques tropicales estaba asociada a una mayor similitud de las comunidades bacterianas entre poblaciones de una rana. Cambios como estos o relacionados al cambio climático pueden influenciar la interacción hospedero-patógenos microbioma.

## **8 Estado del arte**

El estudio de la funcionalidad de los anfibios cobra importancia, los cambios de patrones espaciales y temporales de precipitación debido al cambio climático, hace vulnerables a las poblaciones de anfibios y amenaza con disminuir su diversidad funcional en el futuro (Ochoa-Ochoa, Mejía-Domínguez, Velasco, Marske & Rahbek, 2019). A la vez, hacen que se pierda interacciones importantes en los ecosistemas donde ellos habitan (Valiente-Banuet et al., 2015). Los rasgos funcionales afectan indirectamente la adecuabilidad de los organismos, teniendo efectos sobre el crecimiento, la reproducción y la supervivencia de los mismos (Violle et al., 2007). En cuanto a los estudios basados en rasgos funcionales en anfibios, la mayoría se ha centrado en la variación interespecífica. Sin embargo, existe evidencia que la variabilidad intraespecífica tiene cierto efecto en la coexistencia y en las dinámicas comunitarias (Jung et al., 2010, Bolnick et al., 2011). Por ello, recientemente ha incrementado la investigación de la contribución en conjunto de la variabilidad intraespecífica e interespecífica de los rasgos funcionales en los procesos de ensamblaje de las comunidades de anuros (ej. Dalmolin, Tozetti, & Pereira, 2020; Xavier Jordani et al., 2019), basado en el enfoque de rasgos funcionales propuesto por Violle y sus colaboradores (2012). En general, el estudio de la ecología funcional es novedoso, lo que ha llevado actualmente a hacer revisiones sobre su uso e interpretación adecuada en diferentes grupos taxonómicos (de Bello et al., 2021).

Debido al declive poblacional mundial de los anfibios, en las últimas décadas, también es importante considerar las interacciones que puedan tener entre las especies huésped, el microbioma del

huésped, patógenos y el medio ambiente (Bernardo-Cravo, Schmeller, Chatzinotas, Vredenburg, & Loyau, 2020), ya que la variación en la comunidad microbiana, puede tener un efecto en su funcionalidad como inhibidor de patógenos (Assis et al., 2017; Woodhams et al., 2015) y en sinergia aportar a la pérdida diversidad funcional en anfibios. Estas interacciones piramidales, pueden verse reflejado en la salud de los anuros y, por lo tanto, en la salud ecosistémica. Además, puede tener un efecto sobre la capacidad de los ecosistemas, en este caso bosques nubosos, para continuar brindando servicios ecosistémicos (Chapin et al., 2000). Ejemplo de ello, son las recientes investigaciones, en las que se compara la diversidad taxonómica del microbioma de la piel de anuros, en bosques conservados y bosques fragmentados (ej. Assis, Barreto & Navas, 2017). En cuanto al método empleado para perfilar la comunidad microbiana, actualmente se utiliza la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa *-PCR-* dirigida y la secuenciación de amplicones de los fragmentos del gen 16S ARNr (Callahan et al., 2019). La detección del hongo por medio de *PCR* cuantitativos es fundamental para tomar en cuenta el efecto de la adecuabilidad de los organismos infectados.

## **9 Objetivo general.**

Evaluar el efecto de la pérdida de bosques nubosos en los rasgos funcionales de anfibios en el corredor nuboso de Baja Verapaz.

## **10 Objetivos específicos**

- Comparar la distribución de rasgos funcionales fenotípicos de anfibios dentro de elementos del paisaje en el corredor nuboso de baja Verapaz;
- Establecer la contribución de la variabilidad intraespecífica de los rasgos funcionales de anuros en el proceso de ensamblaje de la comunidad de anfibios;
- Identificar la riqueza de unidades taxonómicas de organismos de microbioma bacteriano en la piel de anfibios;
- Proponer funciones ecosistémicas de anfibios que pueden ser vinculados potencialmente como servicios ecosistémicos para fomentar la conservación de bosques del corredor del Quetzal.

## 11 Hipótesis

La disminución de la variabilidad de rasgos funcionales de anfibios está relacionada con la pérdida de bosque, una vez que la pérdida de hábitat provoca la reducción de la diversidad de los rasgos funcionales en anfibios.

## 12 Materiales y métodos

### 12.1 Enfoque y tipo de investigación:

La investigación desarrollada utilizó el enfoque cuantitativo y fue del tipo correlacional asociativo, porque integra de forma sistemática los métodos cuantitativos para medir y comparar los rasgos funcionales de anuros con un gradiente ambiental en el corredor nuboso de baja Verapaz.

### 12.2 Recolección de información:

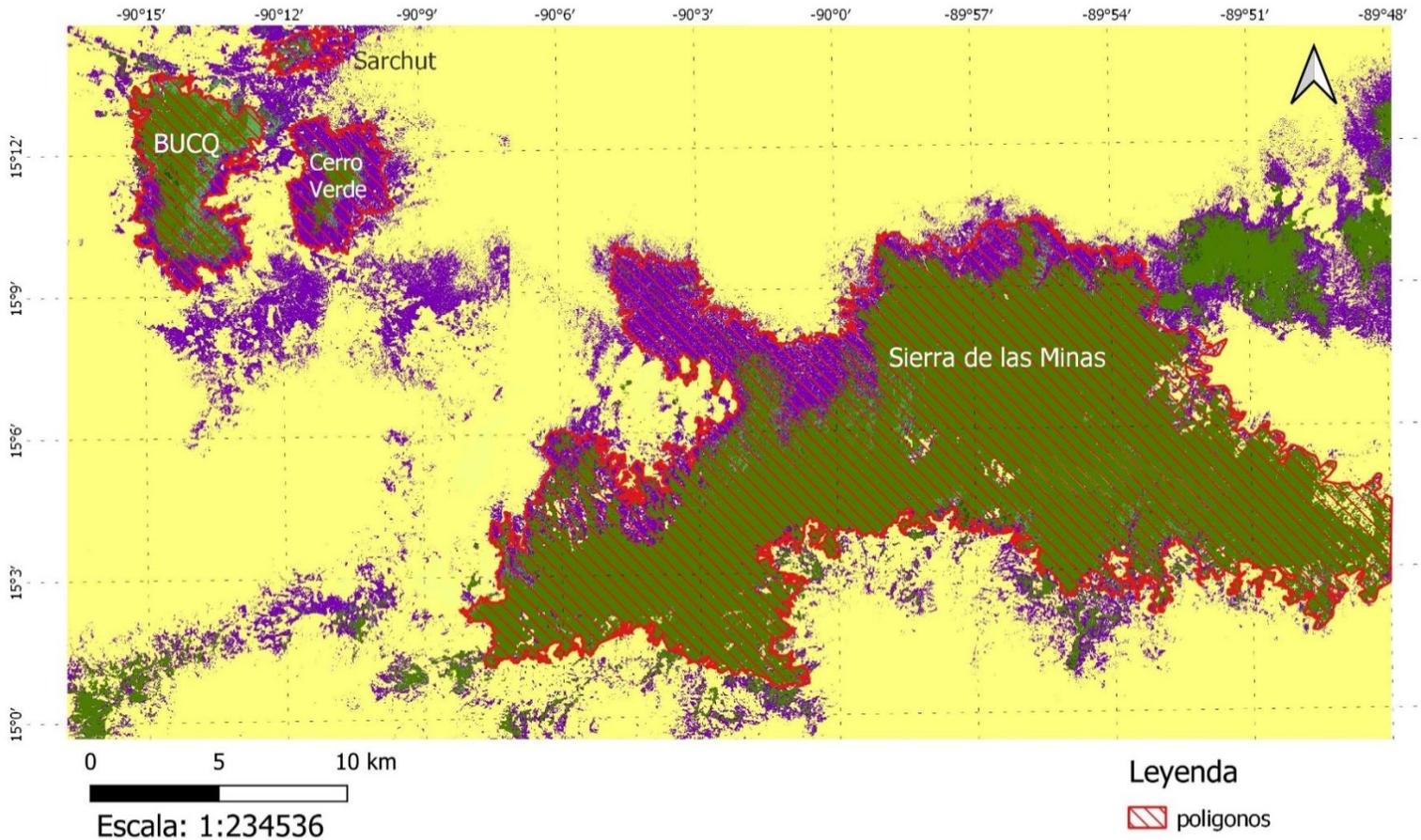
**Selección de sitios:** Las localidades de interés fueron definidas como parches de bosques tomando en cuenta la heterogeneidad de condiciones alrededor de esos bosques. Los bosques tomados en cuenta en el corredor de bosques nubosos, Baja Verapaz, se definieron por medio de un análisis de cobertura boscosa realizado con Sistema de Información Geográfico para el área del corredor nuboso de Baja Verapaz y representan 3 condiciones de tamaño y de cobertura boscosa (Figura 1). Para la evaluación de estos parámetros se utilizó imágenes satelitales de libre acceso (Sentinel-2) de la página: *Copernicus Open Access Hub* (<https://scihub.copernicus.eu/>). Una cuarta condición de tamaño fue agregada para considerar mediciones de especímenes colectados previamente (proyecto FODECYT 70-2009). Esta cuarta condición incorpora la Reserva Natural Privada Chelemhá, Alta Verapaz (tamaño del área protegida). Los análisis fueron realizados por medio del programa QGIS (<http://qgis.org>). Se hizo una medición del área (Km<sup>2</sup>) de bosque en las áreas de parches de bosque seleccionadas para comprar el porcentaje de borde y bosque en cada parche (Tabla 1).

**Tabla 1**

*Área de fragmentos de bosque dentro del Corredor Biológico del Bosque Nuboso de Baja Verapaz y Alta Verapaz*

Fragmentos de Bosque	Bosque (Km <sup>2</sup> )	Borde (Km <sup>2</sup> )	Bosque total (Km <sup>2</sup> )
Finca Municipal Sachut	0.723	2.567	3.290
Sierra de las minas (Oeste)	25.3457	58.968	312.425
Biotopo Universitario para la conservación del Quetzal	19.339	7.931	27.270
Reserva Natural Privada Chelelhá	-	-	17.140*

Nota: \* Tamaño del área protegida, no una medición del fragmento de bosque.



*Figura 1.* Mapa de formato ráster para calcular las áreas de bosque nuboso que se usaron para el Análisis de rasgos de anfibios en el área del Corredor Biológico del Bosque Nuboso en Baja Verapaz. Análisis Obtenidos a través de Imágenes satelitales Copernicus Sentinel 2 (2019-2020)

### **Diseño de Estudio:**

En base a un análisis de sistema de información geográfica que consideró tamaño entre parches de bosques se seleccionaron 3 parches de bosques en el área del corredor de bosque nuboso (BUCQ, Sachut y Sierra de las Minas). Los datos utilizados para el análisis de rasgos funcionales fueron colectados previamente y nos basamos en la información colectada por el proyecto FODECYT 70-2009 (Ruano-Fajardo et al., 2011); donde detallamos a continuación la forma en que se colectó parte de nuestro trabajo:

*Búsqueda y colecta de especímenes:* Para obtener comparativos de rasgos funcionales, e infección de *B. dendrobatidis*; se utilizaron datos que fueron obtenidos por medio del método de Relevamientos por Encuentros Visuales - REV o con sus siglas en inglés -VES - con transectos de muestreo. Este método tiene las ventajas de ser barato, rápido y requiere poco personal (Heyer et al., 1994; Dodd, 2010), lo que lo hace ideal para los objetivos de este estudio. El alcance de este tipo de muestreo se centra en especies encontradas en el sotobosque (< 3m.). Además, se tomó en cuenta datos del microhábitat como hojarasca, en afloramientos rocosos, arbóreos, etc. en diferentes puntos para tratar de captar la heterogeneidad del lugar. También se apuntó la cercanía a cuerpos de agua. Dentro de una localidad se realizaron transectos en dos puntos por 2 noches con un esfuerzo de 4 personas para cada área (Subdividiéndose en 2 grupos de 2 personas). Para sistematizar el muestreo, las búsquedas fueron realizadas desde las 19:00 a las 23:00 horas (horas idóneas para el muestreo de anfibios) y se recorrieron senderos nocturnos con un esfuerzo mínimo de 3 horas. Los especímenes encontrados fueron identificados utilizando claves de anfibios especializadas de Guatemala y Centroamérica (ej. Köhler, 2010). Se hicieron anotaciones descriptivas del microhábitat e individuo observado.

Los especímenes con dudosa taxonomía fueron colectados y dormidos hasta la eutanasia con MS-222 (anestesia), en algunos casos se tomaron muestras de tejido en viales de 1.5 ml con etanol al 95% para análisis moleculares. Los individuos eutanasiados fueron colocados en una bandeja de plástico con formol al 10% por 24 horas y luego se introdujeron en un recipiente con formol al 10% para su posterior identificación en el laboratorio (Heyer et al., 1994). Por último, se prepararon etiquetas identificadas con número de registro y colector.

### 12.3 Rasgos funcionales

#### **Medición de rasgos funcionales de anfibios:**

Se escogieron rasgos de anfibios (Cortés, A., Ramírez, M. & Urbina, N. 2015) y se hizo análisis de rasgos funcionales con base en la información disponible en la literatura. Se consideraron rangos mínimos y máximos de las especies y se hizo una aleatorización de la distribución de los rasgos basado en el número de individuos e identidad de los especímenes colectados, produciendo una matriz de datos simulados. Se consideraron rasgos ecológicos, morfológicos y cantidad de zoosporas del hongo patógeno Bd como rasgos funcionales analizados en este estudio. Específicamente, se consideró el tipo de hábitat (terrestre, acuático o arbóreo) el hábito diurno o nocturno de las especies analizadas, el tipo de reproducción (reproducción directa o larval) y mediciones morfológicas (largura del cuerpo del hocico a cloaca; ancho de cabeza; y largura de la tibia). Además, se gestionó las mediciones en los especímenes colectados previamente en las localidades de estudio, los cuales están depositados en las colecciones de referencia de zoología de la escuela de biología. Estas mediciones fueron realizadas siempre en el lado derecho de cada individuo, y fueron efectuadas siempre por la misma persona para evitar bias en los datos. Los rasgos morfométricos fueron reportados en milímetros. Cabe mencionar que los datos de funcionalidad de microbioma y nivel de infección se incluirán al análisis cuando se tengan los resultados del mismo.

### 12.4 Toma de datos de Hongo Quítrido y microbioma

#### **Toma de muestras de Frotis con hisopo:**

Cabe recalcar que el Biotopo Universitario para la Conservación del Quetzal -BUCQ fue el único parche de bosque en el cual fue posible realizar el muestreo de microbioma de la piel de anfibios para este proyecto debido a la situación actual de la pandemia del nuevo coronavirus. Esta colecta de campo fue realizada en el mes de febrero del 2021 y las muestras fueron almacenadas en el laboratorio molecular para la biodiversidad de la Escuela de Biología.

Al momento de capturar los anfibios se usaron guantes estériles, los cuales fueron cambiados entre tomas de muestra (individuos) para evitar contaminación de otros individuos. En los casos que

fueron necesarios, cada espécimen fue guardado individualmente en bolsa estéril Whirl-Pak hasta el momento del muestreo. Antes de tomar la muestra, los anfibios fueron lavados con 50 ml de agua estéril para limpiar la piel de tierra y bacterias transitorias (Lauer et al., 2007).

Luego, para la toma de hongo y microbioma en anfibios adultos se hizo un frotis con un hisopo estéril (“swab”) que fue deslizado en total 30 veces en las siguientes partes del anfibio: la superficie inferior o vientre, ingle, piernas y membranas interdigitales. Los hisopos fueron guardados en nitrógeno líquido durante la fase de campo, para luego ser almacenado en un congelador a -80°C en el laboratorio molecular de la Escuela de Biología. La investigación y las colectas fueron respaldadas por las licencias DCDV 01-2020 y No. Serie B 01001, respectivamente. Ambas licencias fueron emitidas por el Consejo Nacional de Áreas Protegidas de Guatemala – CONAP.

#### 12.5 Operacionalización de las variables o unidades de análisis:

**Tabla 2**

*Operacionalización de las variables o unidades de análisis por cada objetivo específico.*

<b>Objetivos específicos</b>	<b>Variables o unidades de análisis</b>	<b>Forma en que se midieron, clasificaron o cualificaron</b>
<b>Comparar la distribución de rasgos funcionales fenotípicos de anfibios dentro de elementos del paisaje en el corredor nuboso de baja Verapaz</b>	<b>Variable dependiente:</b> Rasgos funcionales / <b>Variables independientes:</b> Tamaño, heterogeneidad, cobertura y distancia entre parches de bosques	<b>Por cada sitio se midió:</b> 1. Medida de rasgo funcional por individuo. 2. Promedio de rasgo funcional por especie. 3. Tamaño de parche y distancia entre parches (Km <sup>2</sup> ). 4. Porcentaje de cobertura de dosel
<b>Identificar la riqueza de unidades taxonómicas de organismos de microbioma bacteriano en la piel de anfibios</b>	<b>Unidad:</b> Microbioma bacteriano	<b>Muestras de microbioma de la piel de 22 individuos de 10 especies en el BUCQ</b>
<b>Establecer la contribución de la variabilidad intraespecífica de los rasgos funcionales de anuros en el proceso de ensamblaje de la comunidad de anfibios</b>	<b>Variable dependiente:</b> Rasgo funcionales / <b>Variables independientes:</b> Filtros externos e internos a niveles locales, y regionales	<b>Proporción de varianza. Evaluados con modelos nulos por medio de la estadística T</b>

**Proponer funciones ecosistémicas de anfibios que pueden ser vinculados potencialmente como servicios ecosistémicos para fomentar la conservación de bosques del corredor del Quetzal**

**Unidades:  
Funciones ecosistémicas de anfibios**

**Vinculación de la información de diversidad de especies y funciones ecosistémicas de anfibios encontradas en la literatura**

#### 12.6 Procesamiento y análisis de la información:

Los rasgos funcionales medidos fueron utilizados para evaluar la importancia de los filtros internos (interacciones bióticas y el uso de microhábitat) y externos (climáticos, cobertura, distancia, etc.), así como la importancia de la variabilidad intraespecífica por rasgos individuales y en conjunto en el patrón de ensamble. Para eso, utilizamos los estadísticos T propuestos por Violle y sus colaboradores (2012), considerando que:  $TIP/IC$  = es la varianza dentro de una sola especie que pertenece a la comunidad en relación con la varianza total de la comunidad. Este índice mide la fuerza de los filtros internos. Un valor cercano a 0 indica nichos no superpuestos, mientras que un valor cercano a 1 sugiere que los procesos que empaquetan las especies son indiferentes a la superposición, tales como la teoría neutral de la biodiversidad o la teoría de variación individual.;  $TIC/IR$  = es la varianza de la comunidad en relación con la varianza total en el grupo regional, evaluada a nivel individual (Violle et al. 2012). Este índice mide la fuerza de filtros externos, por lo que un valor cercano a 1 indica que la comunidad ha sido fuertemente filtrada por el estrés abiótico o por interacciones externas.; y  $TPC/PR$  = es la varianza de la comunidad en relación con la varianza total en el grupo regional, evaluada a nivel de población. Este índice mide la fuerza de filtros externos a nivel de especie. Un valor cercano a 0 indica un filtrado externo bajo (Violle et al. 2012). Para evaluar la significancia de los estadísticos T, se calculó el tamaño estandarizado del efecto (TEE, por sus siglas en español), comparando los valores observados con los valores obtenidos a partir de aleatorizaciones:  $TEE = (I_{obs} - I_{sim}) / S_{sim}$ . Donde  $I_{sim}$  es el valor medio de los valores aleatorios y  $S_{sim}$  es la desviación estándar de los valores aleatorios ( $n = 1,000$  aleatorizaciones). Cada uno de estos evaluados con un modelo nulo. Además, se utilizaron estimaciones de densidades de Kernel para visualizar los traslapes entre 4 rasgos (Tabla 3) y sitios de toma de datos (Tabla 1). Además, se consideró un ancho de banda considerando no sobrestimar las gráficas para las densidades de kernel. Los análisis estadísticos fueron realizados en el software R 3.6.0 64 bits (R

Core Team, 2019). El paquete *cati* se utilizó para calcular los estadísticos T (Taudiere & Violle, 2016).

### **13 Vinculación, difusión y divulgación**

Este proyecto permitió fortalecimiento de apoyo entre unidades académicas y seguimiento institucional con el Centro de Estudios del Mar y Acuicultura -CEMA-. Además, con el Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP), el cual apoya para emitir dictámenes técnicos sobre fauna guatemalteca que potencialmente sirven para actualizar los listados de especies amenazadas -LEA- de Guatemala. Vínculo con el Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Alabama, Estados Unidos; asesoramiento en general del proyecto y capacitación. Se produjo un material audiovisual de divulgación con fotos tomadas durante la investigación; además cuenta con información sobre aspectos de diversidad, amenaza y conservación de anfibios en Guatemala.

Se están preparando publicaciones en revistas indexadas sobre los rasgos funcionales de las especies de anfibios del Biotopo Universitario para la Conservación del Quetzal, incluyendo rasgos morfológicos y microbioma, así como un análisis del grado de infección por el hongo quitrideo *Batrachochytrium dendrobatidis* -Bd.

### **14 Productos, hallazgos, conocimientos o resultados:**

La riqueza de especies de anfibios que se obtuvo por medio de literatura en los 3 fragmentos del corredor nuboso de Baja Verapaz del Quetzal fue de 18 especies (Tabla 3). En base a este listado se obtuvieron los límites mínimos y máximos de 4 rasgos funcionales (morfológicos) y 2 rasgos ecológicos (hábitat). Este total sirvió de base para escoger especies de los cuales se tiene información de estudio previos en la región del estudio. En otras palabras, se escogieron 10 especies registradas con especímenes depositados en colecciones de referencia de la escuela de biología; los individuos fueron obtenidos por medio de un esfuerzo de campo estandarizados en el año 2010 y 2011 (Ruano-Fajardo et al., 2012). En total, 134 individuos de anfibios distribuidos en las localidades de Sierra de las minas, Finca Sachut y el Biotopo universitario para la conservación del Quetzal (Figura 1) fueron utilizados para estimar simuladamente sus rasgos funcionales: Largo de

hocicó cloaca, ancho de cabeza y tamaño de tibia. Además, se utilizó información de la presencia y nivel de infección del hongo patógeno de los 134 individuos analizado por PCR de tiempo real.

**Tabla 3**

**Rasgos funcionales de especies de anfibios encontradas en el corredor nuboso de Alta Verapaz**

Especie	Habitat		Habito		Mediciones (mm)			Rep	Citas bibliográficas	
	T	R	A	Di	No	LHC	AC			Tibia
<b>CRAUGASTORIDAE</b>										
<i>Craugastor bocourti</i> (Brocchi, 1877)	x	x			x	27.9-59.0	11.7-24.6	19.9-42.0	D	(Köhler, 2010)
<i>Craugastor brocchi</i> (Boulenger, 1882)	x	x	x		x	37.1-83.3	12.9-38.3	20.0-53.3	D	(Campbell y Savage, 2000)
<i>Craugastor daryi</i> (Ford and Savage, 1984)	x	x	x	x		18.7-34.8	7.6-17.5	11.4-24.7	D	(Ford y Savage, 1984)
<i>Craugastor lineatus</i> (Brocchi, 1879)	x	x			x	25.0-47.0	7.5-23.0	15.5-29.1	D	(Savage, 1986)
<i>Craugastor xucanebi</i> (Stuart, 1941)	x	x			x	32.8-46.0	10.9-15.3	20.0-28.0	D	(Stuart, 1941; Köhler, 2010).
<b>CENTROLENIDAE</b>										
<i>Hyalinobatrachium viridissimum</i> (Taylor, 1942)	x	x	x		x	23.0-25.3	8.6-9.8	12.9-14.2	L	Mendoza-Henao et al., 2020)
<b>HYLIDAE</b>										
<i>Bromelohyla bromeliacia</i> (Schmidt, 1933)		x	x		x	28.0-36.0	11.0-14.0	17.6-22.6	L	(Schmidt, 1933)
<i>Ecnomiohyla minera</i> (Wilson, McCranie, and Williams, 1985)			x		x	69.7-83.1	24.0-28.8	35.6-41.6	L	(Wilson, McCranie y Williams, 1985)
<i>Plectrohyla guatemalensis</i> Brocchi, 1877	x		x	x	x	40.0-54.1	13.1-17.3	20.5-27.5	L	(Duellman y Campbell, 1992)
<i>Plectrohyla hartwegi</i> Duellman, 1968	x		x		x	53.6-76.6	21.0-27.0	40.7-32.4	L	(Duellman y Campbell, 1992)
<i>Plectrohyla pokomchi</i> Duellman and Campbell, 1984	x		x		x	48.0-55.2	16.8-17.5	25.3-28.3	L	(Duellman y Campbell, 1992)
<i>Plectrohyla quecchi</i> Stuart, 1942	x	x	x		x	32.6-44.0	11.7-15.8	17.6-23.8	L	(Duellman y Campbell, 1992)

<i>Ptychohyla hypomykter</i> McCranie and Wilson, 1993	x	x	x	x	29.5-39.6	8.5-13.8	15.5-20.7	L	(McCranie y Wilson, 1993)
<b>PLETHODONTIDAE</b>									
<i>Bolitoglossa daryorum</i> Campbell, Smith, Streicher, Acevedo, and Brodie, 2010	x		x	x	43.0-60.9	6.5-9.7	12.1-16.3	D	(Campbell y Smith, 2010)
<i>Bolitoglossa helmrichi</i> (Schmidt, 1936)		x	x	x	39.5-56.0	6.4-8.4	11.0-15.7	D	(Rovito, Vásquez-Almazán y Papenfuss, 2010)
<i>Bolitoglossa tenebrosa</i> Vazquez-Almazán and Rovito, 2014	x		x	x	50.5-79.9	8.5-12.7	12.6-20.2	D	(Vásquez-Almazán y Rovito, 2014)
<i>Cryptotriton veraepacis</i> (Lynch and Wake, 1978)			x	x	25.2-32.2	3.4-4.7	8.3-4.9	D	(Rovito et al., 2015; Lynch y Wake, 1978)
<i>Nyctanolis pernix</i> Elias and Wake, 1983	x	x	x	x	43.3-73.6	6.3-12.3	25.2-14.1	D	(Elias y Wake, 1983)

**Nota:** T = terrestre; R = acuatico, presentes en rios y riachuelos; A = Arboricola (Habitat); Di = diurno; No = nocturno (Habito); Mediciones mínimas y máximas en milímetros (mm): LHC = largura hocico-cloaca; AC = ancho de cabeza; Rep = reproducción: D = directa; L = larval.

Las medidas de rasgos funcionales de especies de anfibios que se obtuvo de 4 fragmentos de bosques nubosos en la región de las Verapaces fue de 14 especies (Tabla 4). En total, se midieron 138 individuos de anfibios distribuidos en las localidades de Chelemhá, Sierra de las minas, Finca Sachut y el Biotopo universitario para la conservación del Quetzal (Figura 1) para estimar sus rasgos funcionales: Largo del hocico a la cloaca, ancho de cabeza, largo del fémur, tamaño de tibia y largo de antebrazo. Además, se utilizó información de la presencia y nivel de infección del hongo patógeno de los 138 individuos, analizado por PCR de tiempo real.

**Tabla 4**

***Rasgos funcionales de especies de anfibios medidas en el corredor nuboso de Alta Verapaz***

Especie	Rasgos funcionales promedio (mm)										n no.	
	LHC (D.E.)	AC (D.E.)	LF (D.E.)	LT (D.E.)	LA (D.E.)							
<b>CRAUGASTORIDAE</b>												
<i>Craugastor bocourti</i>	27.3	7.7	11.2	3.3	15.8	4.5	18.2	5.0	7.0	1.9	19	
<i>Craugastor brocchi</i>	22.9	5.9	8.8	3.6	13.4	3.1	14.9	3.2	5.4	1.1	10	
<i>Craugastor daryi</i>	28.3	8.1	11.3	3.3	16.0	4.8	18.3	4.7	6.6	1.8	10	
<i>Craugastor lineatus</i>	34.5	7.8	15.6	4.3	18.8	3.6	20.8	4.2	7.8	1.9	11	
<i>Craugastor sp. 1</i>	21.6	4.2	9.2	1.4	9.9	6.5	15.0	3.0	5.8	1.0	3	
<i>Craugastor xucanebi</i>	23.3	2.1	9.5	1.2	13.2	0.6	14.6	1.7	6.3	0.8	5	
<b>CENTROLENIDAE</b>												
<i>Hyalinobatrachium viridissimum</i>	26.8	0.5	11.1	0.5	14.1	1.2	14.7	0.7	6.0	0.4	3	
<b>HYLIDAE</b>												
<i>Plectrohyla hartwegi</i>	64.8	1.1	23.2	1.4	28.0	3.8	35.5	1.1	16.3	0.5	2	
<i>Plectrohyla quecchi</i>	38.6	5.9	14.1	2.0	19.1	3.0	20.1	3.0	9.1	1.5	14	
<i>Ptychohyla hypomykter</i>	35.8	3.2	11.9	1.1	17.2	1.5	19.0	1.2	6.2	0.8	4	
<b>PLETHODONTIDAE</b>												
<i>Bolitoglossa daryorum</i>	36.3	8.6	6.2	1.3	3.0	0.9	3.2	0.7	3.7	1.0	10	
<i>Bolitoglossa helmrichi</i>	39.6	9.1	6.8	1.3	3.3	0.8	4.0	1.2	4.3	1.0	38	
<i>Cryptotriton veraepacis</i>	23.1	3.0	3.7	0.4	1.6	0.3	1.8	0.4	1.8	0.3	5	
<i>Cryptotriton xucaneborum</i>	28.4	3.0	4.4	1.4	3.3	0.4	3.6	0.4	3.8	0.5	4	

**Nota:** LHC = largo hocico-cloaca; AC = ancho de cabeza; LF = largo de fémur; LT = Largo de tibia; LA = Largo de antebrazo; D.E. = Desviación estándar; n = número de individuos medidos.

La riqueza de especies registrada en febrero de 2021 en los transectos del BUCQ durante el presente estudio y comparada con información de hace diez años (Ruano-Fajardo, 2011) es similar, 10 versus 9 especies; a pesar de un esfuerzo mucho menor en el 2021 (Tabla 4 y Tabla 5). Cabe mencionar que se obtuvo un total 42 muestras de microbioma para las 9 especies de anfibios distribuidos en el BUCQ (Tabla 5).

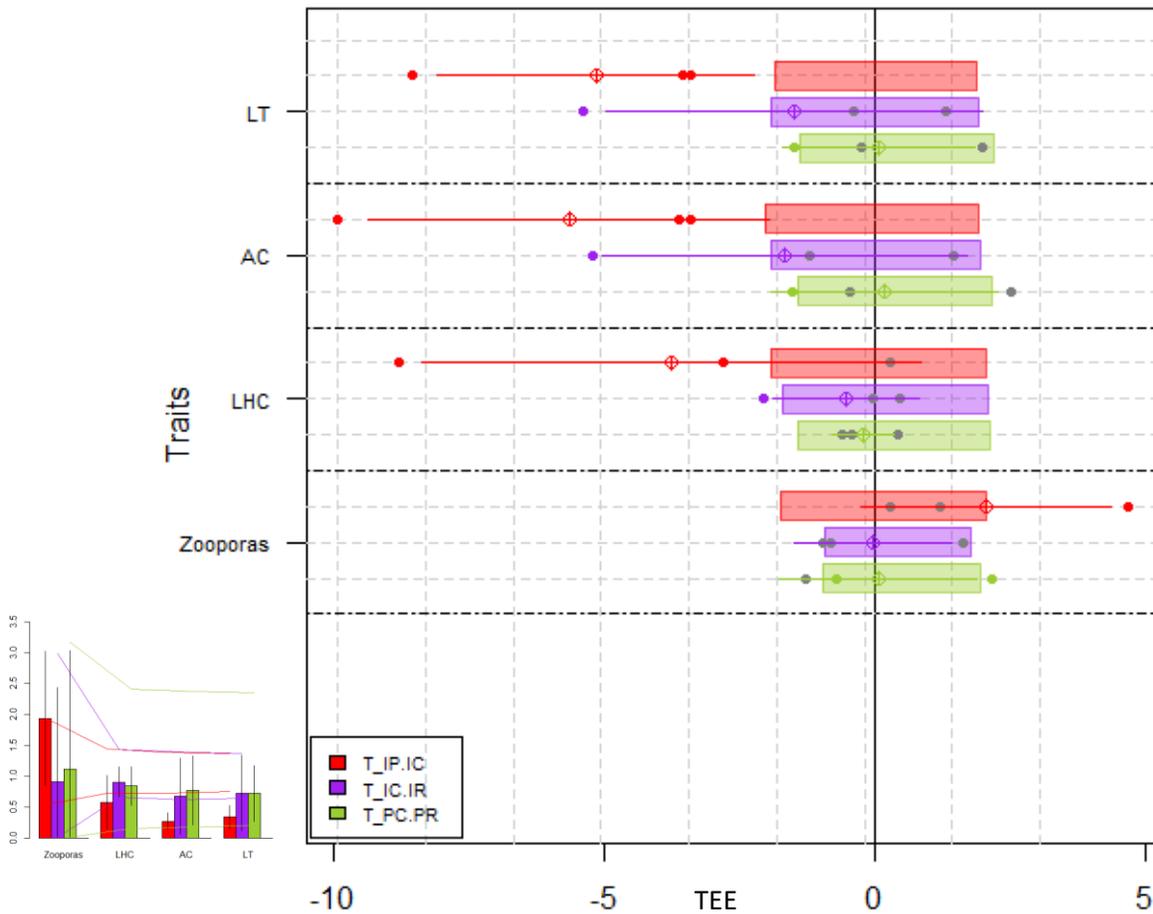
**Tabla 5**  
***Especies con muestras de microbioma y Batrachochytrium dendrobatidis -Bd***

---

<b>Especie</b>
<b>CRAUGASTORIDAE</b>
<i>Craugastor bocourti</i> (Brocchi, 1877)
<i>Craugastor lineatus</i> (Brocchi, 1879)
<b>HYLIDAE</b>
<i>Plectrohyla hartwegi</i> Duellman, 1968
<i>Plectrohyla pokomchi</i> Duellman and Campbell, 1984
<i>Plectrohyla quecchi</i> Stuart, 1942
<i>Ptychohyla hypomykter</i> McCranie and Wilson, 1993
<b>PLETHODONTIDAE</b>
<i>Bolitoglossa daryorum</i> Campbell, Smith, Streicher, Acevedo, and Brodie, 2010
<i>Bolitoglossa helmrichi</i> (Schmidt, 1936)
<i>Cryptotriton veraepacis</i> (Lynch and Wake, 1978)

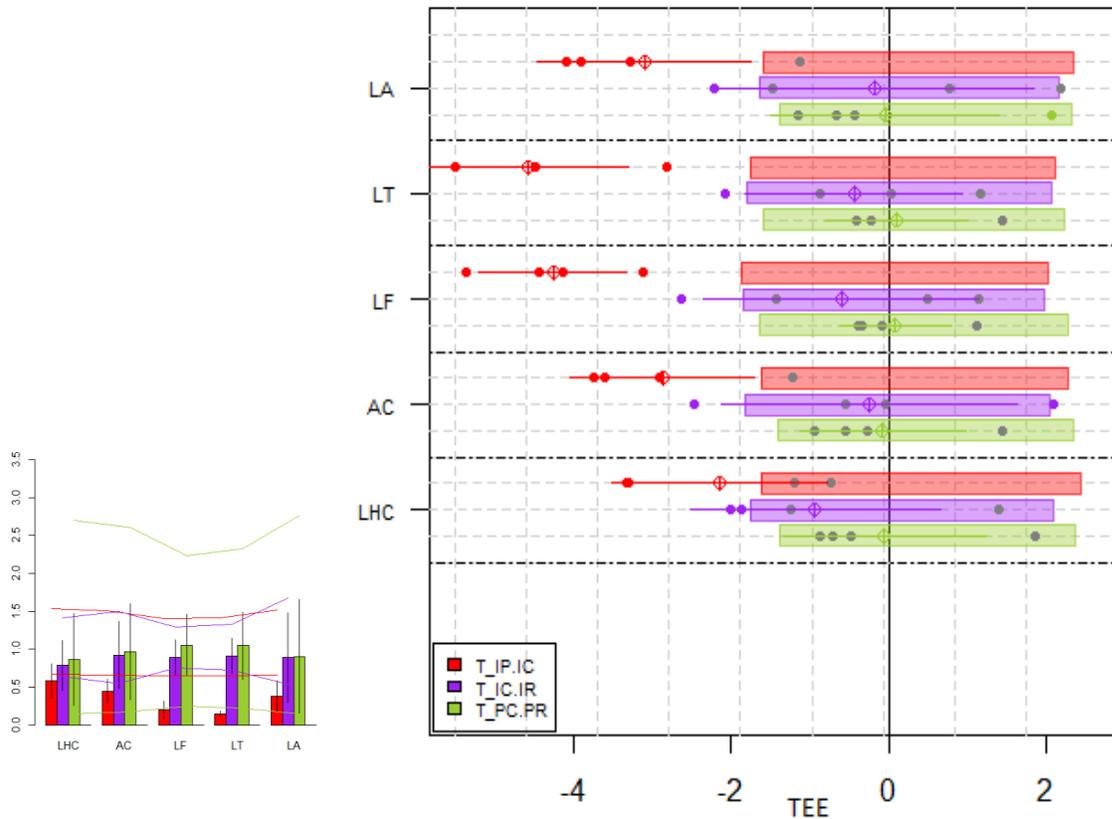
---

La figura 2 nos da hipotéticamente como los valores simulados de rasgos funcionales de anfibios presentan un efecto bajo para relación entre la varianza dentro de la población y la varianza total dentro de la comunidad (T\_IP.IC); lo cual sugiere un fuerte efecto de filtros internos a escala local (ej. microclima, microhábitat, competencia, etc.) para los rasgos de anfibios. Por lo que este patrón sugiera que individuos de anfibios que pertenecen a una población particular, muestran valores de rasgos más similares que dos individuos extraídos al azar del mismo parche de bosque nuboso.



*Figura 2:* Tamaño del efecto estandarizado (TEE) de los estadísticos T-rasgo para los cuatro rasgos de anfibios simulados para diferentes fragmentos de bosque nuboso. Para el rasgo de zoosporas se usaron datos colectados en el año 2010 y 2011 (FODECYT 70-2009). Efecto T\_IP.IC: relación entre la varianza dentro de la población y la varianza total dentro de la comunidad; T\_IC.IR: varianza de toda la comunidad relativa a la varianza total en el grupo regional; T\_PC.PR: varianza intercomunitaria relativa a la varianza total en el grupo regional.

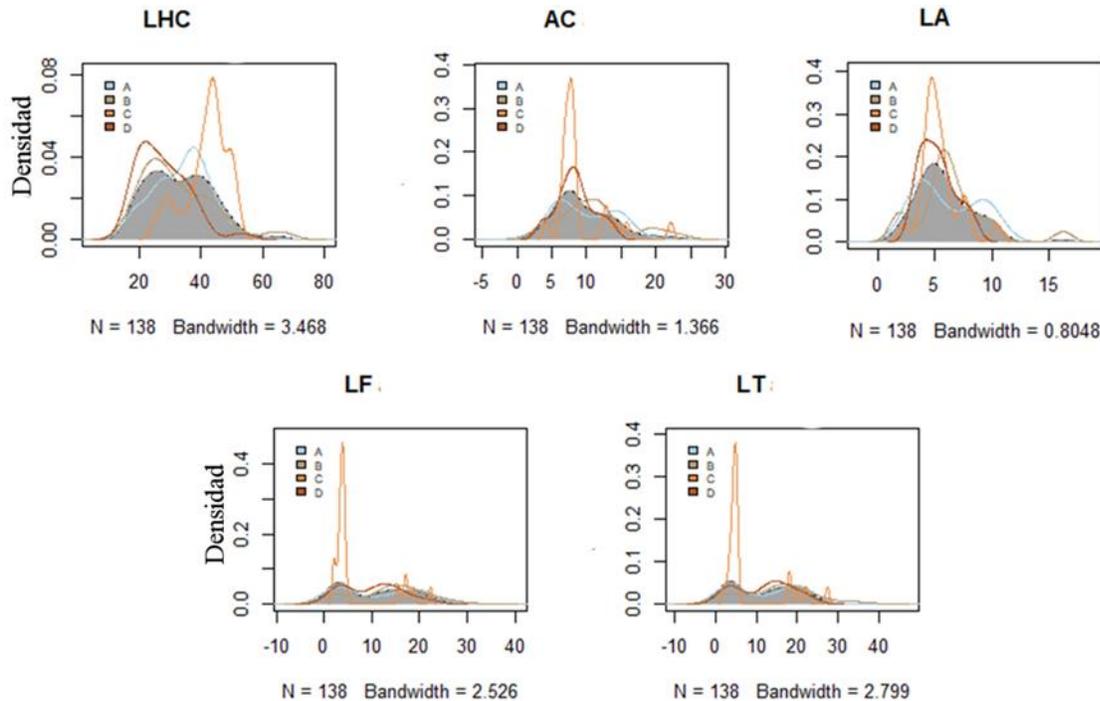
En el caso de la variación de individuos en una comunidad en articular y entre comunidades no muestran valores de rasgos significativamente más similares que dos individuos extraídos al azar del grupo de rasgos de los anfibios a escala regional. Este resultado sugiere que no se detectó un



efecto de filtrado externo para estos rasgos, posiblemente debido a las pocas diferencias ambientales entre los parches de bosque a nivel regional. Específicamente, la localidad con mayor riqueza (BUCQ) tiene 9 especies y la riqueza de las otras localidades están conformadas por combinaciones similares de especies o especies hermanas similares (e.j. *Cryptotriton xucaneborum*) que están presentes en el BUCQ, con la excepción de sierra de las minas que presentó la especie *Craugastor brocchi*.

*Figura 3:* Tamaño del efecto estandarizado (TEE) de los estadísticos T-rasgo para los cinco rasgos de anfibios para diferentes fragmentos de bosque nuboso de la región de Baja Verapaz y Alta Verapaz. : LHC = largo hocico-cloaca; AC = ancho de cabeza; LF = largo de fémur; LT = Largo de tibia; LA = Largo de antebrazo; Efecto T\_IP.IC: relación entre la varianza dentro de la población y la varianza total dentro de la comunidad; T\_IC.IR: varianza de toda la comunidad relativa a la varianza total en el grupo regional; T\_PC.PR: varianza intercomunitaria relativa a la varianza total en el grupo regional.

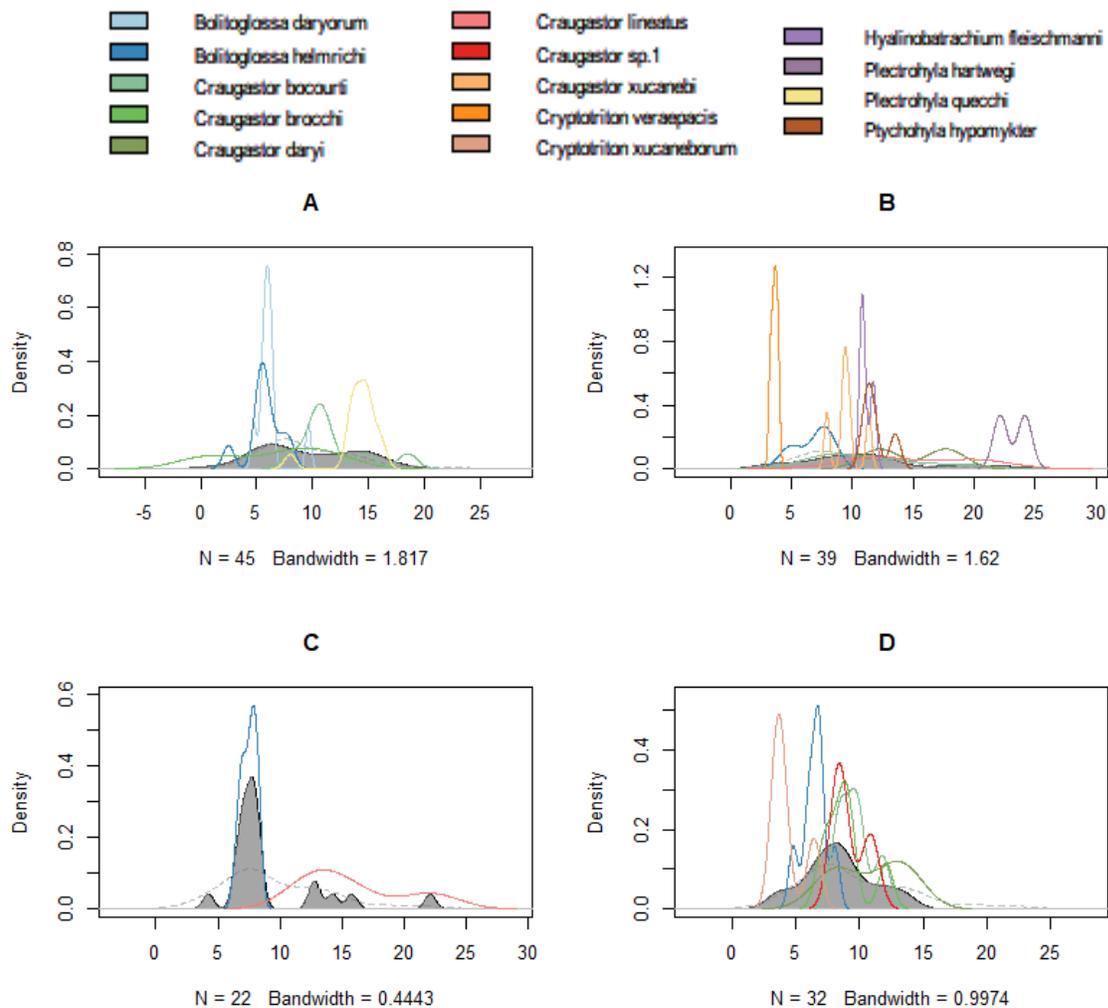
Todos los rasgos funcionales medidos de las comunidades de anfibios (tamaño de cuerpo, ancho de cabeza, largo de fémur, largo de tibia, y largo de antebrazo, mostraron ser similares entre las áreas de bosque con un tamaño mayor (Figura 4). Por el contrario, todos los rasgos mostraron tener una amplitud de rasgo más restrictos en el área del bosque Sachut; el cual es el bosque de menor tamaño con 3.290 km<sup>2</sup> (Tabla 1).



*Figura 4:* Estimación de densidades de Kernel, para todas las especies en conjunto, para cada uno de los rasgos en cuatro localidades de bosque nuboso. A) Sierra de las minas; B) Biotopo universitario del Quetzal -BUCQ; C) Bosque Sachut; y D) Reserva Natural Privada Chelemhá. Color gris=datos observados. Rasgos funcionales: Zoosporas=Cuantificación de nivel de infección; LHC= Largo hocico cloaca; AC=Ancho de Cabeza; LF = largo de fémur; LT = Largo de tibia; y LA = Largo de antebrazo.

Los rasgos funcionales de anfibios tamaño corporal, ancho de cabeza, largo de fémur, largo de antebrazo y largo de tibia mostraron una mayor sobreposición asociada al tamaño medio de los fragmentos. Sin embargo, debido al poco número de individuos en el menor fragmento, el análisis solo utilizó las dos especies más abundantes en los datos. En este sentido, el menor tamaño de fragmentos parece inducir una reducción de la de la abundancia poblacional y taxonómica y reducción de los grupos funcionales. En otras palabras, los rasgos de los anfibios se vuelven

similares en los fragmentos de bosques de tamaño mediano. Además, la variación del rasgo dentro de la especie se reduce con la disminución del tamaño del fragmento (considerando los fragmentos medianos como pequeños). De este modo, aún que la sobreposición del rasgo sea baja o no exista, los rasgos dentro de las especies reducen sus variaciones como manera de permitir la coexistencia en espacios limitantes. En la figura 5 se tomó como ejemplo el rasgo ancho de cabeza para mostrar la distribución del rasgo y variación por especie para los 4 parches de bosque del estudio.



**Figura 5:** Estimación de densidades de Kernel con el rasgo ancho de cabeza para todas las especies, presentes en los bosques nubosos: A) Oeste de Sierra de las minas; B) Biotopo universitario del Quetzal -BUCQ; C) Bosque Sachut; y D) Reserva Natural Privada Chelemhá, Alta Verapaz.

## 15 Análisis y discusión de resultados:

En base a los patrones sugeridos por nuestro modelo simulado y datos medidos, los rasgos funcionales reflejan mejor la pérdida de biodiversidad que la riqueza taxonómica en anfibios del bosque nuboso de las Verapaces. En el caso del fragmento de bosque más pequeño (Bosque Sachut) pudimos asociar, qué a pesar de tener riqueza comparable a los otros fragmentos mayores, la amplitud de todos los rasgos (LHC, AC, LF, LT y LA) era más estrecha en comparación de otros fragmentos. En otras palabras, refleja una restricción a una distribución de variabilidad de rasgos, prediciendo que se estructurando mejor con características poblacionales con características de adecuabilidad más restrictas. En parte esta restricción puede ser a la conectividad de este bosque con fragmentos de mayor tamaño. Por ejemplo, Pineda y Halffter (2004) encontraron en un estudio de bosque nubosos en México que elementos del paisaje alrededor de un bosque nuboso aislado o fragmentado son de suma importancia para mantener la diversidad taxonómica que el tamaño del bosque en sí, sin embargo, este estudio no toma en cuenta la diversidad funcional o de rasgos en estos fragmentos. En otro estudio con diversidad funcional de anfibios en el centro de Brasil en un área de transición entre bosques tropical del amazonas y bosque de savana “Cerrado” se ha encontrado evidencia de como la cercanía a fuentes de agua y fragmentos de bosques relacionadas matriz están asociados a una mayor diversidad de rasgos y diversidad funcional (Ribeiro, Colli, Batista, & Soares, 2017). Por lo que, existe poca superposición de las distribuciones de los rasgos entre las poblaciones dentro de las comunidades. Estos estudios nos dan bases para argumentar sobre el efecto de pérdida de diversidad por medio de la distribución de rasgos funcionales fenotípicos de anfibios dentro de elementos del paisaje en el corredor nuboso de Baja Verapaz y Alta Verapaz.

Los rasgos funcionales de anuros en el corredor nuboso nos dieron una idea de cómo evaluar el proceso de ensamblaje de la comunidad de anfibios. El patrón sugiera que individuos de anfibios que pertenecen a una población particular, muestran valores de rasgos más similares que dos individuos extraídos al azar del mismo parche de bosque nuboso. Esto proporciona una la de idea de un efecto de filtros internos de escala pequeña (ej. Microhabitat, microclima, competencias u otras interacciones) los cuales pueden ser explicados por mecanismos relacionadas a diferentes hipótesis clásicas con las interacciones bióticas y la coexistencia de especies (Hubbell, 2001; Chase & leibold, 2004). Asimismo, Xavier Jordani y otros (2019) evidenciaron que los filtros internos,

como las interacciones bióticas y el uso de microhábitat, son los que contribuyen mayormente en el ensamblaje de larvas de anfibios del bosque atlántico brasileño. Por ejemplo, en nuestro estudio - para el rasgo ancho de cabeza - se encontró que: 1) en fragmentos de bosque medianos el rasgo tiende a ser similar entre las especies de la comunidad, lo que limita la dieta de las especies y puede provocar competencias y reducción de la diversidad de especies por exclusión competitiva; 2) individualmente por especie, las poblaciones que están en áreas de bosque de tamaño mediano presentan una menor variación del rasgo, o sea la variación de ancho de cabeza se torna menor en estas poblaciones, lo que reduce la variabilidad de la población. Ambos factores provocan la pérdida de funcionalidad del ecosistema. Es importante mencionar que los dos bosques de tamaño mediano del estudio mantienen una riqueza de especies similar comparada con el bosque de mayor tamaño; lo que provoca una reducción de la variabilidad de los rasgos a nivel interespecífico en los bosques medianos probablemente como una estrategia de permitir la coexistencia en ambientes con recursos limitantes. Sin embargo, en el bosque de menor tamaño las variaciones de los rasgos fueron mayores, probablemente a consecuencia de la poca competitividad debido a la reducción de la riqueza de especies.

Con respecto a la proporción de individuos infectados y nivel de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*, en las diferentes especies de anfibios encontrados en la región, pudimos relacionar que las especies con desarrollo indirecto propias de la familia Hylidae fueron más comunes en presentar la enfermedad. Esto coincide con múltiples ejemplos en el área tropical del mundo (Fisher, Garner, & Walker, 2009; Kolby & Daszak, P. 2016). Esta información fue contextualizada en base a datos colectados en los años 2010-2011. Sin embargo, este patrón sería el esperado en la actualidad. Basada en las muestras obtenidas y en futuras muestras se podría evaluar hipótesis alternas al riesgo de infección de especies que no comúnmente están asociadas a estar infectadas, las cuales son las de desarrollo directo (Familias Craugastoridae y Plethodontidae). Las especies de desarrollo directo (sin etapa larval) al potencialmente ser independientes a fuentes de agua, y por ende no tener un alto contacto con especies hospedadoras de desarrollo larval en fuentes de agua, no desarrollarán adaptaciones para la defensa en contra de la infección presentando cargas más altas del patógeno cuando se vean expuestos a este, estos patrones ya fueron evidenciados experimental y en estudios de campo en brazil (ej. Ribeiro et al., 2020).

En términos ecológicos se recomienda proyectos de restauración ecológica pasiva del área y la reconexión de remanentes boscosos entre estas áreas boscosas y así mantener la diversidad de una forma más eficiente. Tomar en cuenta también que un buen manejo de esta podría ser de beneficios para los comunitarios y dueños de fincas, ya que al unir esfuerzos para reforestar con árboles nativos el área del corredor nuboso podría aumentar el beneficio de proteger fuentes de agua, evitar sequías y desastres de deslaves en esta área; una de los potenciales formas de evidenciar un manejo adecuado del área serían evaluando la diversidad funcional de anfibios.

## **16 Conclusiones**

Los patrones sugeridos por ambos modelos, simulado y con datos observados, reflejan la pérdida de biodiversidad de una manera más fina que la riqueza taxonómica en anfibios.

Filtros internos de escala fina (factores ecológicos internos) potencialmente son los factores que explican la estructura de la comunidad de anfibios a nivel poblacional basándonos en datos simulados y con datos observados.

La riqueza de especies de anfibios se mantiene en los bosques nubosos medianos y grandes; y tratando como preliminares nuestros resultados, podemos destacar que potencialmente los rasgos funcionales vinculados a bosques de tamaño mediano presentan una amplitud simulada y observada de todos los rasgos (LHC, AC, LC, LA y LT) más estrecha en comparación de otros fragmentos.

## **17 Impacto esperado**

Conservación: los resultados de los análisis ejecutados en este proyecto sirven para ejemplificar los efectos negativos de la pérdida de hábitat en la comunidad de anfibios, evidenciados por medio de la reducción de la diversidad funcional de estos. Además, el video de divulgación producido podrá ser una herramienta en actividades de concientización y educación ambiental.

A la vez, la información levantada y generada en esta investigación, será de utilidad para el apoyo de tesis de grado académico de la Escuela de Biología de la USAC. Asimismo, se fortaleció el laboratorio molecular de la Escuela por medio de la compra de equipos y reactivos.

## 18 Referencias

- Araújo, M. S., Bolnick, D. I., & Layman, C. A. (2011). The ecological causes of individual specialisation. *Ecology letters*, *14*(9), 948-958.
- Assis, A. B. D., Barreto, C. C., & Navas, C. A. (2017). Skin microbiota in frogs from the Brazilian Atlantic forest: species, forest type, and potential against pathogens. *PLoS One*, *12*(7), e0179628.
- Baert, J. M., Eisenhauer, N., Janssen, C. R., & De Laender, F. (2018). Biodiversity effects on ecosystem functioning respond unimodally to environmental stress. *Ecology Letters*, *21*(8), 1191-1199. <https://doi.org/10.1111/ele.13088>
- Barlow, J., Lennox, G.D., Ferreira, J., Berenguer, E., Lees, A.C., Mac Nally, R., Thomson, J.R., de Barros Ferraz, S.F., Louzada, J., Oliveira, V.H.F., & Parry, L. (2016). Anthropogenic disturbance in tropical forests can double biodiversity loss from deforestation. *Nature*, *535*(7610), 144-147. <https://doi.org/10.1038/nature18326>
- Bataille, A., Fong, J.J., Cha, M., Wogan, G.O., Baek, H.J., Lee, H., Min, M.S., & Waldman, B., (2013). Genetic evidence for a high diversity and wide distribution of endemic strains of the pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in wild Asian amphibians. *Molecular Ecology*, *22*(16), 4196- 4209. <https://doi.org/10.1111/mec.12385>
- Becker, M.H., Walke, J.B., Cikanek, S., Savage, A.E., Mattheus, N., Santiago, C.N., Minbiole, K.P., Harris, R.N., Belden, L.K., & Gratwicke, B., (2015). Composition of symbiotic bacteria predicts survival in Panamanian golden frogs infected with a lethal fungus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2881>
- Becker, C. G., Longo, A. V., Haddad, C. F. B., & Zamudio, K. R. (2017). Land cover and forest connectivity alter the interactions among host, pathogen and skin microbiome. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *284*(1861). <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0582>
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A.A., Goggin, C. L., & Parkes, H. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of*

*Sciences of the United States of America*, 95(15), 9031-9036.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.9031>

Bernardo-Cravo, A. P., Schmeller, D. S., Chatzinotas, A., Vredenburg, V. T., & Loyau, A. (2020). Environmental Factors and Host Microbiomes Shape Host–Pathogen Dynamics. *Trends in Parasitology*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.010>

Blaustein, A. R., Han, B. a, Relyea, R. a, Johnson, P. T. J., Buck, J. C., Gervasi, S. S., & Kats, L. B. (2011). The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1223, 108-119. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05909.x>

Blaustein, A. R., Urbina, J., Snyder, P. W., Reynolds, E., Dang, T., Hoverman, J. T., & Hambalek, N. M. (2018). Effects of emerging infectious diseases on amphibians: A review of experimental studies. *Diversity*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/d10030081>

Bolnick, D. I., Amarasekare, P., Araújo, M. S., Bürger, R., Levine, J. M., Novak, M., & Vasseur, D. A. (2011). Why intraspecific trait variation matters in community ecology. *Trearaujonds in ecology & evolution*, 26(4), 183-192. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.01.009>.

Boyd, C., & Goodyear, C. (1971) The protein content of some common reptiles and amphibians. *Herpetologica* 27,317-320.

Brem, F. M. R., & Lips, K. R. (2008). *Batrachochytrium dendrobatidis* infection patterns among Panamanian amphibian species, habitats and elevations during epizootic and enzootic stages. *Diseases of Aquatic Organisms*, 81(3), 189-202. <https://doi.org/10.3354/dao01960>

Callahan, B., Wong, J., Heiner, C., Oh, S., Theriot, C., Gulati, A., McGill, S. & Dougherty, M. (2019). High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. *Nucleic Acids Research* 1-12. <https://doi.org/10.1093 / nar / gkz569>.

Campbell, J. A. (1999). Distribution patterns of amphibians in Middle America. *Patterns of distribution of amphibians: a global perspective*, 111-210.

Campbell, C. R., Voyles, J., Cook, D. I., & Dinudom, A. (2012). Frog skin epithelium: Electrolyte transport and chytridiomycosis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(3), 431-434. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.12.002>

- Cardinale, B.J., Duffy, J.E., Gonzalez, A., Hooper, D.U., Perrings, C., Venail, P., Narwani, A., Mace, G.M., Tilman, D., Wardle, D.A., & Kinzig, A.P. (2012). Corrigendum: Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature*, 489(7415), 326-326. <https://doi.org/10.1038/nature11373>
- Catenazzi, A., Swei, A., Finkle, J., Foreyt, E., Wyman, L., & Vredenburg, V. T. (2017). Epizootic to enzootic transition of a fungal disease in tropical Andean frogs: Are surviving species still susceptible? *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186478>
- Chapin, F., Zavaleta, E., Eviner, V., Naylor, R., Vitousek, P., Reynolds, H., Hooper, D., Lavorel, S., Sala, O., Hobbie, S., Mack, M., & Díaz, S. (2000). Consequences of changing biodiversity. *Nature* 405, 234-242. doi:10.1038/35012241
- Chase, J. M. (2014). Spatial scale resolves the niche versus neutral theory debate. *Journal of Vegetation Science*, 25(2), 319-322. <https://doi.org/10.1111/jvs.12159>
- Chase, J. M., & Leibold, M. A. (2003). *Ecological niches: linking classical and contemporary approaches*. University of Chicago Press.
- Cortés, A., Ramírez, M. & Urbina, N. (2015). Protocolo para la medición de rasgos funcionales en anfibios. En Salgado Negret, B. (Ed). (2015). *La Ecología Funcional como aproximación al estudio, manejo y conservación de la biodiversidad: protocolos y aplicaciones*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D. C. Colombia. 236 pp.
- Dalmolin, D. A., Tozetti, A. M., & Pereira, M. J. R. (2020). Turnover or intraspecific trait variation: explaining functional variability in a neotropical anuran metacommunity. *Aquatic Sciences*, 82(3), 62. <https://doi.org/10.1007/s00027-020-00736-w>
- de Bello, F., Carmona, C. P., Dias, A. T., Götzenberger, L., Moretti, M., & Berg, M. P. (2021). *Handbook of trait-based ecology: from theory to R tools*. Cambridge University Press.
- Dodd, C. K. (2010). *Amphibian ecology and conservation: a handbook of techniques*. Oxford University Press.

- Ellison, S., Rovito, S., Parra-Olea, G., Vásquez-Almazán, C., Flechas, S. V., Bi, K., & Vredenburg, V. T. (2019). The influence of habitat and phylogeny on the skin microbiome of amphibians in Guatemala and Mexico. *Microbial ecology*, 78(1), 257-267.
- Ernst, R., Keller, A., Landburg, G., Grafe, T. U., Linsenmair, K. E., Rödel, M., & Dziöck, F. (2011). Common ancestry or environmental trait filters: cross-continental comparisons of trait – habitat relationships in tropical anuran amphibian assemblages, *Global Ecology and Biogeography*, 1-12. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2011.00719.x>
- Ernst, R., Linsenmair, K., & Rödel, M. (2006). Diversity erosion beyond the species level: dramatic loss of functional diversity after selective logging in two tropical amphibian communities. *Biological Conservation* 133,143-155.
- Figueroa-Rangel, B. I., Willis, kathy j., & Olvera-Vargas, M. (2010). Cloud forest dynamics in the Mexican neotropics during the last 1300 years. *Global Change Biology*, 16, 1689-1704. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.02024.x>
- Fisher, M. C., Garner, T. W. J., & Walker, S. F. (2009). Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. *Annual Review of Microbiology*, 63, 291-310. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073435>
- Gravel, D., Albouy, C., & Thuiller, W. (2016). The meaning of functional trait composition of food webs for ecosystem functioning. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1694), 20150268. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0268>
- Gutiérrez-García, T. A., & Vázquez-Domínguez, E. (2013). Consensus between genes and stones in the biogeographic and evolutionary history of Central America. *Quaternary Research*, 79(3), 311-324.
- Han, B. a., Bradley, P. W., & Blaustein, A. R. (2008). Ancient behaviors of larval amphibians in response to an emerging fungal pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63(2), 241-250. <https://doi.org/10.1007/s00265-008-0655-8>
- Harris, R.N., Brucker, R.M., Walke, J.B., Becker, M.H., Schwantes, C.R., Flaherty, D.C., Lam, B.A., Woodhams, D.C., Briggs, C.J., Vredenburg, V.T., & Minbiole, K.P. (2009). Skin

microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. *Microbial Ecology*, 3(7), 818-824. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.27>

Hernández-Gómez, O., Hoverman, J. T., & Williams, R. N. (2017). Cutaneous microbial community variation across populations of eastern hellbenders (*Cryptobranchus alleganiensis alleganiensis*). *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01379>

Heyer, R., Donnelly, M., McDiarmid, R., & Foster, M. 1994. *Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods For Amphibians*. Peter Strupp/Princeton Editorial Associates. The Smithsonian Institution. Pp. 363.

Hof, C., Araújo, M. B., Jetz, W., & Rahbek, C. (2011). Additive threats from pathogens, climate and landuse change for global amphibian diversity. *Nature*, 480(7378), 516-519. <https://doi.org/10.1038/nature10650>

Hubbell, S. P. (2001). *The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography. Monographs in Population Biology* (Vol. 17, Issue 3). [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(02\)00228-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(02)00228-8)

Hughey, M. C., Pena, J. A., Reyes, R., Medina, D., Belden, L. K., & Burrowes, P. A. (2017). Skin bacterial microbiome of a generalist Puerto Rican frog varies along elevation and land use gradients. *PeerJ*, 5, e3688. <https://doi.org/10.7717/peerj.3688>

Hussain, Q. A., & Pandit, A. K. (2012). Global amphibian declines: A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4(10), 348-357. <https://doi.org/10.5897/IJBC12>.

Jiménez, R. R., & Sommer, S. (2017). The amphibian microbiome: natural range of variation, pathogenic dysbiosis, and role in conservation. *Biodiversity and Conservation*, 26(4), 763-786. <https://doi.org/10.1007/s10531-016-1272-x>

Jung, V., Violle, C., Mondy, C., Hoffmann, L. & Muller, S. (2010). Intraspecific variability and trait-based community assembly. *Journal of Ecology*, 98, 1134-1140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2010.01687.x>

Kilpatrick, a M., Briggs, C. J., & Daszak, P. (2010). The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(2), 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.07.011>

- Köhler, G. 2010. Amphibians of Central America. Herpeton, Verlag Elke Köhler, Offenbach, Germany. 400pp.
- Kolby, J. E., & Daszak, P. (2016). The Emerging Amphibian Fungal Disease, Chytridiomycosis: A Key Example of the Global Phenomenon of Wildlife Emerging Infectious Diseases. *4*(3), 1-17. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EI10-0004-2015>.Correspondence
- Koropatnick, T. A., Engle, J. T., Apicella, M. A., Stabb, E. V., Goldman, W. E., & McFall-Ngai, M. J. (2004). Microbial factor-mediated development in a host-bacterial mutualism. *Science*, *306*(5699), 1186-1188.
- Kraft, N., Adler, P., Godoy, O., James, E., Fuller, S., & Levin, J. (2015). Community assembly, coexistence, and the environmental filtering metaphor. *Funct. Ecol.*, *29*, 592-599. doi: 10.1111/1365-2435.12345
- Kueneman, J. G., Parfrey, L. W., Woodhams, D. C., Archer, H. M., Knight, R., & McKenzie, V. J. (2013). The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages. *Molecular Ecology*, *23*(6), 1238–1250. <https://doi.org/10.1111/mec.12510>
- Lauer, A., Simon, M. A., Banning, J. L., André, E., Duncan, K., & Harris, R. N. (2007). Common cutaneous bacteria from the eastern red-backed salamander can inhibit pathogenic fungi. *Copeia*, *2007*(3), 630-640.
- Longcore, J. E., Pessier, A. P., & Nichols, D. K. (1999). *Batrachochytrium Dendrobatidis* gen. et sp. nov., a Chytrid Pathogenic to Amphibians. *Mycologia*, *91*(2), 219-227. <https://doi.org/10.2307/3761366>
- Lam, B. A., Walke, J. B., Vredenburg, V. T., & Harris, R. N. (2010). Proportion of individuals with anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* skin bacteria is associated with population persistence in the frog *Rana muscosa*. *Biological Conservation*. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.11.015>
- Longo, A. V., & Zamudio, K. R. (2017a). Environmental fluctuations and host skin bacteria shift survival advantage between frogs and their fungal pathogen. *ISME Journal*. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.138>

- Longo, A. V., & Zamudio, K. R. (2017b). Temperature variation, bacterial diversity and fungal infection dynamics in the amphibian skin. *Molecular Ecology*.  
<https://doi.org/10.1111/mec.14220>
- McCallum, M. L. (2015). Vertebrate biodiversity losses point to a sixth mass extinction. *Biodiversity and Conservation*, 24(10), 2497-2519.
- Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O., & Kasper, D. L. (2005). An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122(1), 107-118.
- McGill, B. J., Enquist, B. J., Weiher, E., & Westoby, M. (2006). Rebuilding community ecology from functional traits. *Trends in Ecology and Evolution*, 21(4), 178-185.  
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.02.002>
- Mendelson, J. R., Jones, M. E. B., Pessier, a. P., Toledo, G., Kabay, E. H., & Campbell, J. a. (2014). On the Timing of an Epidemic of Amphibian Chytridiomycosis in the Highlands of Guatemala. *South American Journal of Herpetology*, 9(2), 151-153.  
<https://doi.org/10.2994/SAJH-D-14-00021.1>
- Mollov, I., Boyadzhiev, P., & Donev, A. (2010). Trophic role of the Marsh frog *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Apmphibia, Anura) in the aquatic ecosystems. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 16 (3), 298-306.
- Muletz Wolz, C. R., Yarwood, S. A., Campbell Grant, E. H., Fleischer, R. C., & Lips, K. R. (2018). Effects of host species and environment on the skin microbiome of Plethodontid salamanders. *Journal of Animal Ecology*. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12726>
- Ochoa-Ochoa, L. M., Mejía-Domínguez, N. R., Velasco, J. A., Marske, K. A., & Rahbek, C. (2019). Amphibian functional diversity is related to high annual precipitation and low precipitation seasonality in the New World. *Global Ecology and Biogeography*, 28(9), 1219–1229.  
<https://doi.org/10.1111/geb.12926>
- O’hanlon, S.J., Rieux, A., Farrer, R.A., Rosa, G.M., Waldman, B., Bataille, A., Kosch, T.A., Murray, K.A., Brankovics, B., Fumagalli, M., & Martin, M.D. (2018). Recent Asian origin of

chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science*, 360(6389), 621-627.  
<https://doi.org/10.1126/science.aar1965>

Olson, D.H., Aanensen, D.M., Ronnenberg, K.L., Powell, C.I., Walker, S.F., Bielby, J., Garner, T.W., Weaver, G., & Fisher, M.C., (2013). Mapping the global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the amphibian chytrid fungus. *PLoS ONE*, 8(2), e56802.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056802>

Parmelee, J. R. (1999). Trophic ecology of a tropical anuran assemblage. Scientific Papers, Natural History Museum. *The University of Kansas* 11,1-59.

Prado-Irwin, S. R., Bird, A. K., Zink, A. G., & Vredenburg, V. T. (2017). Intraspecific Variation in the Skin-Associated Microbiome of a Terrestrial Salamander. *Microbial Ecology*.  
<https://doi.org/10.1007/s00248-017-0986-y>

Pineda, E., & Halffter, G. (2004). Species diversity and habitat fragmentation: frogs in a tropical montane landscape in Mexico. *Biological conservation*, 117(5), 499-508.

Piotrowski, J. S., Annis, S. L., & Longcore, J. E. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, 96(1), 9.  
<https://doi.org/10.2307/3761981>

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

Ribeiro, J., Colli, G. R., Batista, R., & Soares, A. (2017). Landscape and local correlates with anuran taxonomic, functional and phylogenetic diversity in rice crops. *Landscape Ecology*, 32(8), 1599–1  
<https://doi.org/10.1007/s10980-017-0525-8>

Ribeiro, J. W., Siqueira, T., DiRenzo, G. V., Lambertini, C., Lyra, M. L., Toledo, L. F., Haddad, C. F. B., & Becker, C. G. (2020). Assessing amphibian disease risk across tropical streams while accounting for imperfect pathogen detection. *Oecologia*. <https://doi.org/10.1007/s00442-020-04646-4612>

Riemann, J. C., Ndriantsoa, S. H., Rödel, M.-O., & Glos, J. (2017). Functional diversity in a fragmented landscape --- Habitat alterations affect functional trait composition of frog

assemblages in Madagascar. *Global Ecology and Conservation*, 10(10), 173–183.  
<https://doi.org/10.1016/j.gecco.2017.03.005>

Rodriguez, D., Becker, C. G., Pupin, N. C., Haddad, C. F. B., & Zamudio, K. R. (2014). Long-term endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic Forest of Brazil. *Molecular Ecology*, 23(4), 774–787. <https://doi.org/10.1111/mec.12615>

Rovito, S. M., Parra-Olea, G., Vásquez-Almazán, C. R., Papenfuss, T. J., & Wake, D. B. (2009). Dramatic declines in neotropical salamander populations are an important part of the global amphibian crisis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3231–3236. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813051106>

Ruano-Fajardo, G., García, L., Vásquez-Almazán, C., Conde, A. & A. Zamora. (2012) “Evaluación de la Incidencia de Quitridiomycosis en Anfibios en tres regiones de endemismo: Los casos de los Bosques Nubosos de Zacapa, Baja Verapaz y San Marcos, Guatemala”. Informe Final. MUSHNAT/USACCONCYT. Guatemala.

Scheffer, M., van Nes, E. H., & Vergnon, R. (2018). Toward a unifying theory of biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201721114. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721114115>

Smith, S. A., De Oca, A. N. M., Reeder, T. W., & Wiens, J. J. (2007). A phylogenetic perspective on elevational species richness patterns in Middle American treefrogs: why so few species in lowland tropical rainforests?. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 61(5), 1188–1207.

Stuart, S. N., Hoffmann, M., Chanson, J. S., Cox, N. A., Berridge, R. J., Ramani, P., & Young, B. E. (2008). *Threatened amphibians of the world* (Lynx Edici). Barcelona: IUCN, Conservation International and Lynx Edicions. First edition: July 2008 ©.

Taudiere, A., & Violle, C. (2016). cati: an R package using functional traits to detect and quantify multilevel community assembly processes. *Ecography* 39, 699–708. doi 10.1111/ecog.01433

Tilman, D., Isbell, F., & Cowles, J. M. (2014). Biodiversity and Ecosystem Functioning. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 45(1), 471–493.

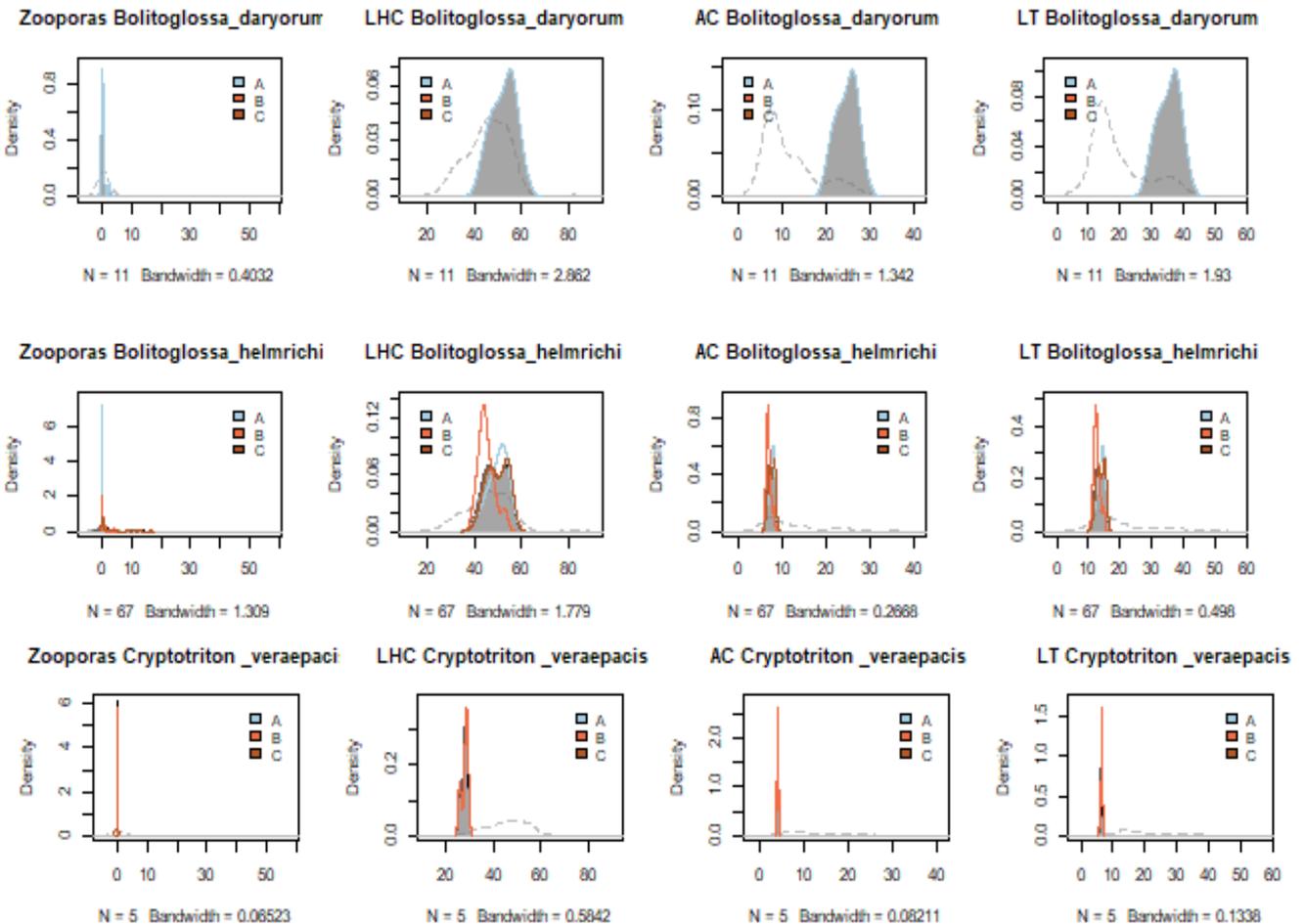
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027.
- Valencia-Aguilar, A., Cortés-Gómez, A. M., & Ruiz-Agudelo, C. A. (2013). Ecosystem services provided by amphibians and reptiles in Neotropical ecosystems. *International Journal of Biodiversity Science, Ecosystem Services and Management*, 9(3), 257-272. <https://doi.org/10.1080/21513732.2013.821168>
- Valiente-Banuet, A., Aizen, M. a., Alcántara, J. M., Arroyo, J., Cocucci, A., Galetti, M., García, M.,... Zamora, R. (2015). Beyond species loss: the extinction of ecological interactions in a changing world. *Functional Ecology*, 29(3), 299–307. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12356>
- Venesky, M. D., Wassersug, R. J., & Parris, M. J. (2010). Fungal pathogen changes the feeding kinematics of larval anurans. *The Journal of Parasitology*, 96(3), 552-557. <https://doi.org/10.1645/GE-2353.1>
- Violle, C., Navas, M., Vile, D., Kazakou, E., & Fortunel, C. (2007). Let the concept of trait be functional !, *Oikos* 116, 882-892. doi: 10.1111/j.2007.0030-1299.15559.x
- Violle, C., Enquist, B.J., McGill, B.J., Jiang, L.I.N., Albert, C.H., Hulshof, C., Jung, V., & Messier, J. (2012). The return of the variance: Intraspecific variability in community ecology. *Trends in Ecology and Evolution*, 27(4), 244-252. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.11.014>
- Voyles, J., Young, S., Berger, L., Campbell, C., Voyles, W.F., Dinudom, A., Cook, D., Webb, R., Alford, R.A., Skerratt, L.F., & Speare, R. (2009). Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5952), 582-585. <https://doi.org/10.1126/science.1176765>
- Wake, D. B., & Vredenburg, V. T. (2008). Are we in the midst of the sixth mass extinction? a view from the world of amphibians. In *In the light of evolution, volume II: biodiversity and extinction* (John C. Av, Vol. II, pp. 27-44). Washington: National Academy of Sciences.
- Wells, K. D. (2010). *The ecology and behavior of amphibians*. University of Chicago Press.

- Woodhams, D.C., Vredenburg, V.T., Simon, M.A., Billheimer, D., Shakhmouradian, B., Shyr, Y., Briggs, C.J., Rollins-Smith, L.A., & Harris, R.N. (2007). Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*. *Biological Conservation*. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2007.05.004>
- Woodhams, D. C., Alford, R. A., Antwis, R. E., Archer, H., Becker, M. H., Belden, L. K., & Flechas, S. V. (2015). Antifungal isolates database of amphibian skin-associated bacteria and function against emerging fungal pathogens: Ecological Archives E096-059. *Ecology*, *96*(2), 595-595.
- Xavier Jordani, M., Mouquet, N., Casatti, L., Menin, M., de Cerqueira Rossa-Feres, D., & Albert, C. H. (2019). Intraspecific and interspecific trait variability in tadpole meta-communities from the Brazilian Atlantic rainforest. *Ecology and Evolution*, *9*(7), 4025-4037. <https://doi.org/10.1002/ece3.5031>
- Wiens, J. J., Parra-Olea, G., García-París, M., & Wake, D. B. (2007). Phylogenetic history underlies elevational biodiversity patterns in tropical salamanders. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *274*(1612), 919-928.

## 19 Apéndice

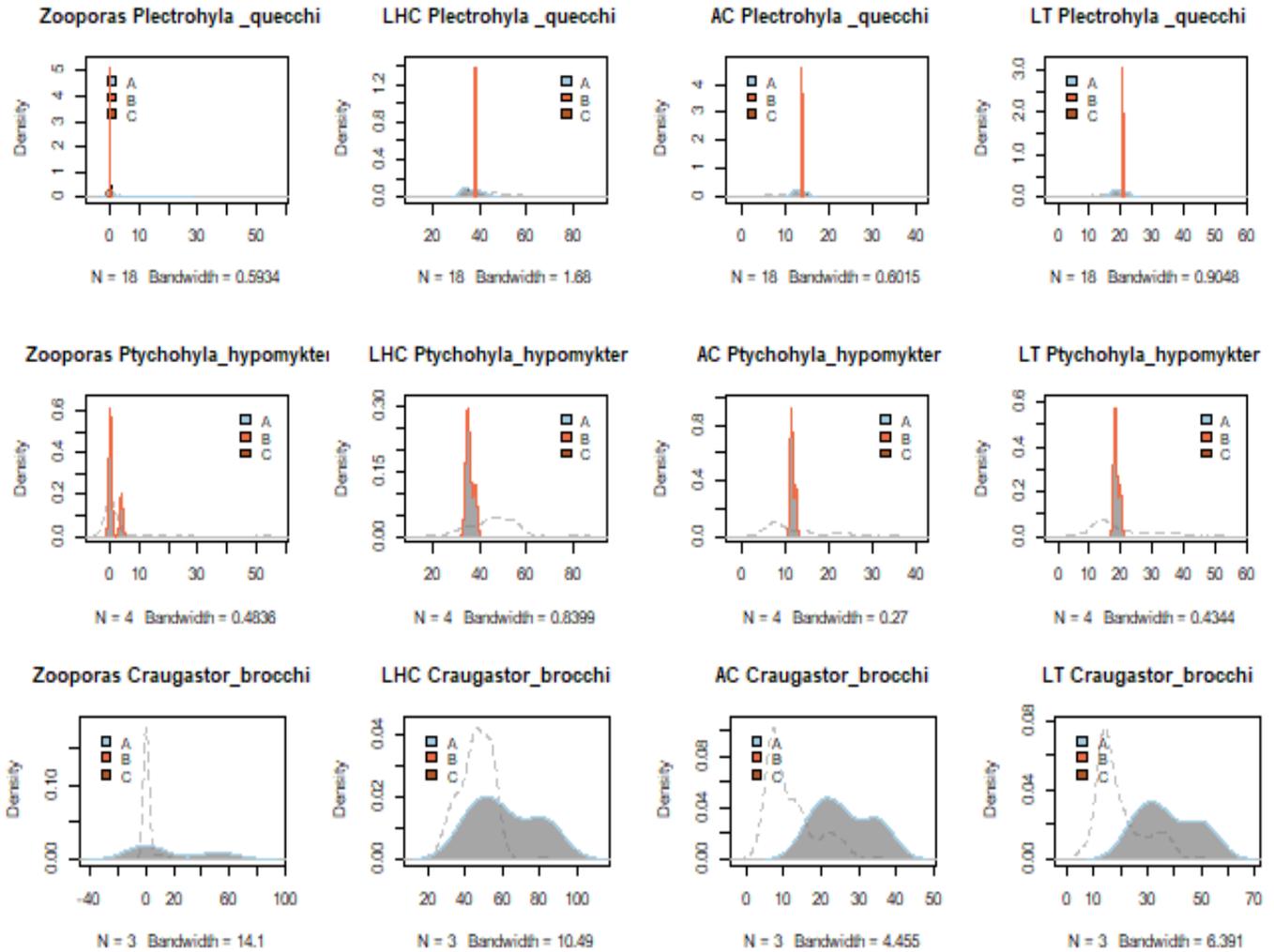
Apéndice 1.1. Estimación de densidades de Kernel para salamandras, para todas las especies en conjunto, para cada uno de los rasgos en las localidades donde están presentes del bosque nuboso.

### Familia Plethodontidae



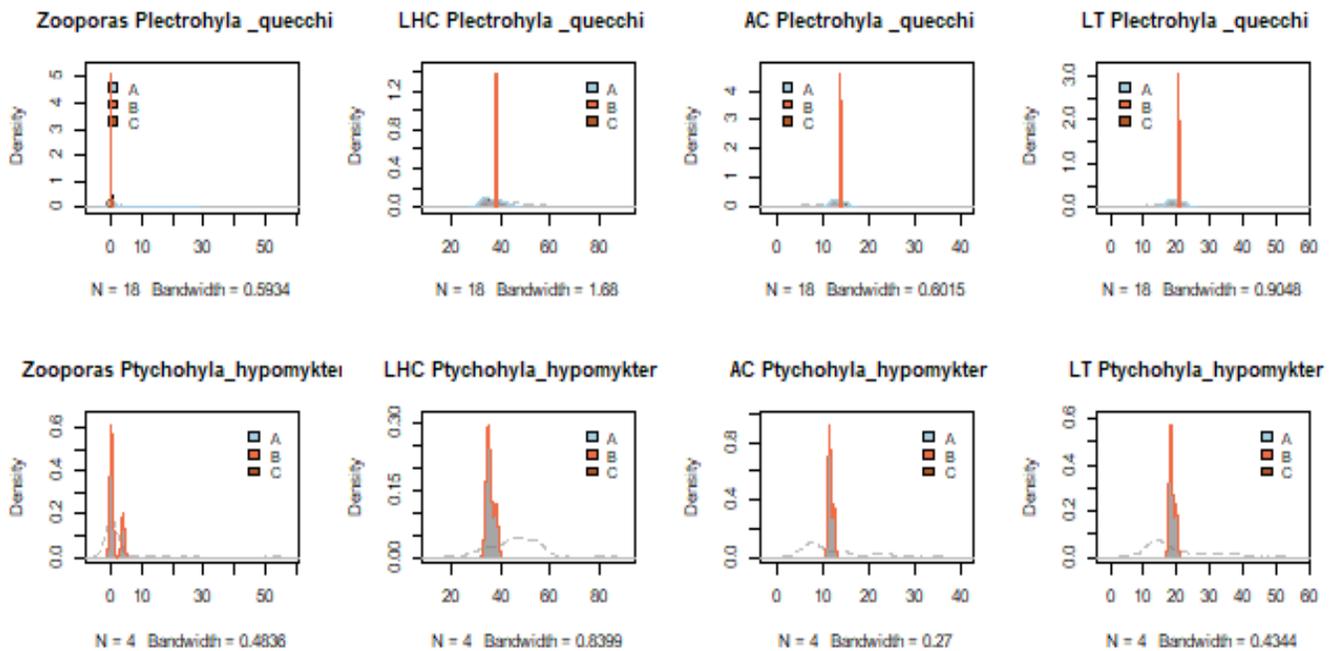
Apéndice 1.2. Estimación de densidades de Kernel para ranas arbóreas, para todas las especies en conjunto, para cada uno de los rasgos en las localidades donde están presentes del bosque nuboso.

Familia Hylidae

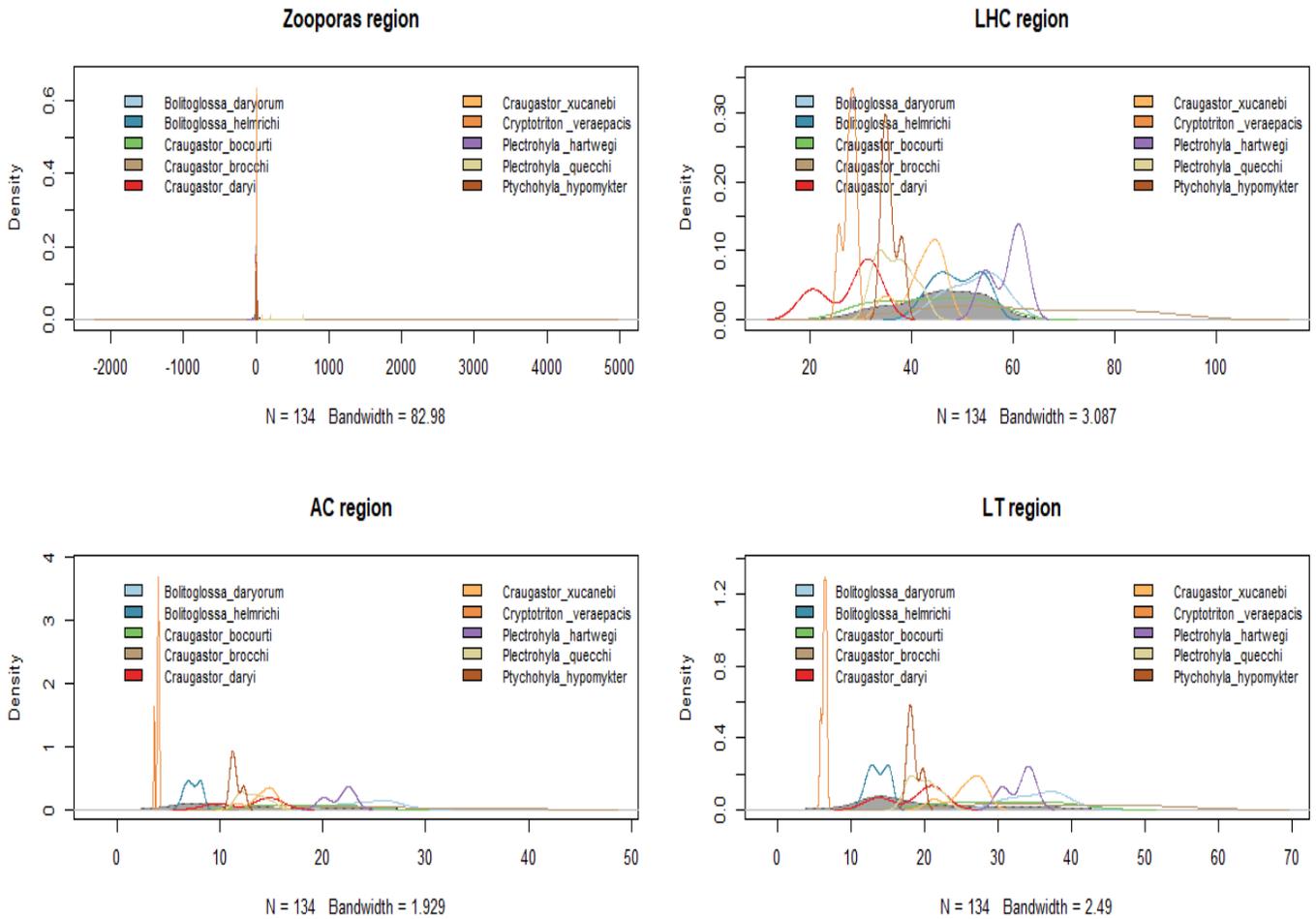


Apéndice 1.3. Estimación de densidades de Kernel para ranas de hojarasca, para todas las especies en conjunto, para cada uno de los rasgos en las localidades donde están presentes del bosque nuboso.

Familia Craugastoridae



Apéndice 1.4. Estimación de densidades de Kernel para todas las especies, presentes del bosque nuboso.



Apéndice 1.5. Protocolo de almacenamiento de ADN para hongos y microbioma

### **PROTOCOLO DE ALMACENAMIENTO DE ADN PARA HONGOS Y MICROBIOMA DE PIEL DE ANFIBIOS - PROYECTO DIGI B-30/2020**

#### **Paso 1 Preparación de solución de amortiguamiento para mantener células vivas y obtener cultivos de Microbioma.**

- a.A Diluir 100 ml de glicerina (99.96%) con 150 ml de agua destilada.
- a.B Autoclavear la dilución de glicerina obtenida en un bote especial o un Erlenmeyer (500 ml) a 120 ° C por 15 minutos.
- a.C Dejar enfriar por 20 minutos.
- a.D Preparar y esterilizar una micropipeta de 1-10 ml y una punta estéril 1 ml (Usar guantes estériles).

#### **Paso 2 Preparación de criotubos (Guantes estériles)**

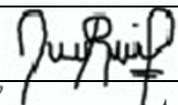
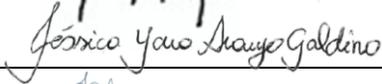
- A En ambiente estéril en una campana o alrededor de un mechero abrir el recipiente con la glicerina.
- B Utilice criotubos estériles de rosca, use la micropipeta y agregue 1 ml de la disolución de glicerina.
- C Puede centrifugar.
- D Guardar en cajas de transporte. La viabilidad de la glicerina para tomar muestras de microbioma es de 5 días a temperatura ambiente.

#### **Paso 3 Fase de campo**

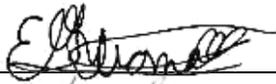
- A \*Toma de muestra. Anfibios vivos.
- B \*Rotular con el mismo código de colecta (2) criotubos estériles y 1 criotubos con un 1 ml de una dilución de Glicerina al 40%.
- C \*Frotis de bacterias y hongo quítrido de piel de anfibios). Utilizar de uno a tres palillos para frotis de algodón (Marca *Dry Swab MW113, Medical Wire*); Ver protocolo Hyatt et al. 2007.
- D \*Transporte: En contenedor de nitrógeno líquido colocar cada uno de los criotubos. Tiempo máximo de almacenaje 20 días (a menos que se haga una recarga de nitrógeno).
- E \*Descartar el nitrógeno líquido del tambo especial y sacar los criotubos.
- F \*Almacenado en cajas para criotubos en un ultracongelador de -86°C.

**Listado de los integrantes del equipo de investigación**

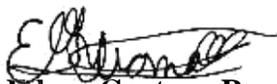
**Contratados por contraparte y colaboradores**

Nombre	Firma
Lic. Julio Rafael Morales Álvarez	
M.Sc. Jessica Yara Araujo Galdino	
Br. Rosa Alejandra Roldán	

**Contratados por la Dirección General de Investigación**

Nombre	Categoría	Registro de Personal	Pago		Firma
			SI	NO	
M.Sc. Edgar Gustavo Ruano Fajardo	Coordinador	20050852	X		
Br. Maria Fernanda Orrego Muralles	Auxiliar de Investigación I	20200625	X		

Guatemala 25 de febrero de 2021



**M.Sc. Edgar Gustavo Ruano Fajardo**  
Coordinador del Proyecto de Investigación



**Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar**  
Programa Universitario de Investigación  
en Ciencias Básicas



**Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar**  
Coordinador General de Programas