

Programa Universitario de Investigación en Recursos Naturales y Ambiente  
(nombre del programa universitario de investigación de la Digi)

Ecología y Genética de los Murciélagos (Mammalia: Chiroptera) en el Parque  
Nacional Grutas de Lanquín, Alta Verapaz, Guatemala  
nombre del proyecto de investigación

B31-2022

código del proyecto de investigación

Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas, Fac. C.C.Q.Q. y Farmacia  
unidad académica o centro no adscrito a unidad académica avaladora

Sergio Guillermo Pérez Consuegra (Coordinador)  
Lourdes Virginia Nuñez Portales (Investigadora)  
Elida María Leiva González (Investigadora)  
Ana Lucia Arévalo Figueroa (Investigadora)  
Gerber Daniel Guzmán Flores (Auxiliar de Investigación)

nombre del coordinador del proyecto y equipo de investigación contratado por Digi

Guatemala, 21 de febrero de 2023

## **Autoridades**

Dra. Alice Burgos Paniagua  
Directora General de Investigación

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

MSc. Andrea Eunice Rodas Morán  
Coordinadora, Programa Universitario de Investigación en Recursos Naturales y Ambiente

## **Autores/as**

Sergio Guillermo Pérez Consuegra

Lourdes Virginia Nuñez Portales  
Ana Lucía Arévalo Figueroa  
Elida María Leiva González  
Gerber Daniel Guzmán Flores

Cristian Kraker Castañeda  
El Colegio de la Frontera Sur, México

Elizabeth Solórzano Ortiz  
Allan Estuardo Urbizo Herrera  
Instituto de Investigaciones Químicas, Biológicas, Biomédicas y Biofísicas (I2QB3), Universidad  
Mariano Gálvez (UMG), Guatemala

Lesly Marivel Rodríguez Pernillo  
Escuela de Biología, Fac. C.C.Q.Q. y Farmacia, USAC.

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (Digi), 2023. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada con recursos del Fondo de Investigación de la Digi de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de del código DIGI B31-2022, en el Programa Universitario de Investigación en Recursos Naturales y Ambiente -PUIRNA-.

Los autores son responsables del contenido, de las condiciones éticas y legales de la investigación desarrollada.



Universidad de San Carlos de Guatemala  
Dirección General de Investigación



## INFORME FINAL

### 1. Índice general

	Pag.
2. Resumen y palabras clave	5
Abstract and key words	5
3. Introducción	6
4. Planteamiento del problema	7
5. Delimitación en tiempo y espacio	8
6. Marco teórico	8
6.1 Murciélagos de Guatemala: conocimiento y amenazas	8
6.2 Cuevas como refugios de murciélagos	11
6.3 La genética de la conservación	12
7. Estado del arte	13
8. Objetivos	14
9. Hipótesis	15
10. Materiales y métodos	15
10.1 Enfoque de la investigación	15
10.2 Métodos	15
10.3 Recolección de información	20
10.4 Técnicas e instrumentos	22
10.5 Procesamiento y análisis de la información	28
11. Resultados y discusión	32
11.1 Resultados	29
11.2 Discusión de resultados	55
12. Conclusiones	63
13. Referencias	64
14. Aspectos éticos y legales	74
15. Vinculación	74
16. Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual	75
17. Aporte de la propuesta de investigación a los ODS	75
18. Orden de pago final	76
19. Declaración del Coordinador del proyecto de investigación	76
20. Aval de la Directora del IIQB	77
21. Visado de la Dirección General de Investigación	77

## Índice de tablas

Tabla 1. Listado de especies registradas	33
Tabla 2. Número de individuos capturados	34
Tabla 3. Capturas entre época seca y lluviosa	36
Tabla 4. Frecuencia de edades	38
Tabla 5. Frecuencia de sexos y épocas	40
Tabla 6. Hembras preñadas y épocas	42
Tabla 7. Capturas con redes de niebla	44
Tabla 8. Parámetros acústicos	46
Tabla 9. Número de archivos efectivos acústicos	47
Tabla 10. Resultados de búsquedas BLAST	51
Tabla 11. Estimadores de diversidad genética	52
Tabla 12. Diversidad genética por sexo	54

## Índice figuras

Figura 1. Ubicación de Grutas de Lanquín	9
Figura 2. Ubicación de los sitios de muestreo	17
Figura 3. Toma de muestras de tejido	18
Figura 4. Clasificación de usos/coberturas	20
Figura 5. Gel de electroforesis	26
Figura 6. Cromatograma de secuencias de ADN	27
Figura 7. Curva de acumulación de especies	35
Figura 8. Abundancia relativa	37
Figura 9. Edades por épocas	39
Figura 10. Porcentaje de sexos y épocas	41
Figura 11. Porcentaje de hembras preñadas y épocas	43
Figura 12. Espectrograma de pulso de ecolocalización	45
Figura 13. Archivos efectivos por distancia a la cueva	48
Figura 14. Archivos efectivos para ribera y bosque	49
Figura 15. Red de haplotipos	53

## 2. Resumen y palabras claves

Se estudiaron murciélagos en el Parque Nacional Grutas de Lanquín, Alta Verapaz, específicamente en las cuevas que componen el ecosistema subterráneo y el paisaje exterior. El ecosistema subterráneo se encuentra amenazado por actividades humanas directas y el paisaje exterior por el cambio de uso del suelo, por lo que es importante generar conocimiento básico para las estrategias de conservación de la biodiversidad. El objetivo fue generar información bajo enfoques de investigación ecológica y genética, mediante métodos de muestreo complementario. Se utilizaron redes de niebla, micrófonos ultrasónicos y una trampa de arpa para el registro de las especies, y protocolos estandarizados para la toma de muestras y su procesamiento en laboratorio para obtener secuencias genéticas de especies de interés de conservación. Se registraron ocho especies en las grutas, sin cambios en la abundancia relativa de las tres especies con mayor número de capturas entre las épocas de secas y de lluvias, pero con cambios en el porcentaje total de hembras y hembras preñadas de *Pteronotus fulvus*, con un valor mayor para las primeras en la época de lluvias y presencia de las segundas únicamente en la época de secas, de manera similar para *Mormoops megalophylla*. También se observaron cambios en el porcentaje de individuos juveniles de *Balantiopteryx io*, con un valor mayor en la época de lluvias. Por último, se presenta la caracterización acústica de las especies registradas en las grutas y cálculos de la intensidad de su actividad en el paisaje exterior, y análisis genéticos de *B. io*, especie clasificada como vulnerable.

**Palabras clave:** acústica animal; ecología de poblaciones; ecosistema subterráneo; genética de poblaciones; muestreo complementario.

### Abstract

We studied bats in Las Grutas de Lanquín National Park, Alta Verapaz, specifically in the caves that conform the underground ecosystem and the exterior landscape. The subterranean ecosystem is threatened directly by human activities and the external landscape by changes in land use, then, it is important to generate basic knowledge for biodiversity conservation strategies. Our objective was to generate information under ecological and genetic research approaches, through complementary sampling methods. We used mist nets, ultrasonic microphones, and a harp trap to

record the bat species, and standardized protocols for sampling and processing DNA samples in order to obtain genetic sequences of a conservation interest species. We recorded eight bat species at the caves, without changes in the relative abundance of the three species with the highest number of captures between the dry and rainy seasons, but with changes in the total percentage of females and pregnant females of *Pteronotus fulvus*, with a value higher for the former in the rainy season and presence of the latter only in the dry season, similarly for *Mormoops megalophylla*. We also observed changes in the percentage of juvenile individuals of *Balantiopteryx io*, with a higher value in the rainy season. Finally, we present the acoustic characterization of the species recorded in the caves and calculations of the intensity of their activity in the outdoor landscape, and genetic analyzes of *B. io*, a species classified as vulnerable.

**Key words:** animal acoustics; complementary sampling; population ecology; populations genetics; underground ecosystems.

### 3. Introducción

Los murciélagos (Orden Chiroptera) representan el segundo orden de mamíferos con mayor número de especies en el planeta (Kunz, 2013). Guatemala alberga 103 de las 170 especies reportadas para Centroamérica (Rodríguez-Herrera y Sánchez, 2015; Kraker-Castañeda et al., 2016; Trujillo et al., 2020). Según la Red Latinoamericana y del Caribe para la Conservación de los Murciélagos (RELCOM, 2010), estos mamíferos enfrentan serias amenazas.

Estos mamíferos desempeñan papeles importantes en los ecosistemas, principalmente la dispersión de semillas, la polinización de plantas silvestres y cultivadas, y el control de insectos plaga (Ferrarezzi y Gimenez, 1996; Simmons, 2005). Sin embargo, los servicios ecosistémicos que brindan se ven contrastados por el mal concepto que se tiene de ellos, lo que lleva al exterminio indiscriminado de individuos e incluso colonias enteras, por lo que es necesario establecer prioridades para su conservación (Burneo et al., 2015).

El Parque Nacional Grutas de Lanquín, ubicado al noreste del departamento de Alta Verapaz, es uno de los sistemas de cuevas más sobresalientes de la región constituido por rocas sedimentarias de origen kárstico (INGUAT, 2019); sin embargo, no se cuenta con estudios sobre la biodiversidad que albergan. Las investigaciones en otros países indican que las cuevas tienen

un papel fundamental en la conservación de los murciélagos, ya que suelen ser el principal refugio de muchas especies amenazadas (Arita, 1996).

Asimismo, en el área, hay presencia de comunidades Maya-Q'eqchi', las cuales tienen una mala percepción sobre los murciélagos debido a la interacción con una especie hematófaga (*Desmodus rotundus*). Esto último puede ser perjudicial para el resto de las especies que habitan las cuevas. El objetivo de este proyecto fue generar conocimiento ecológico y genético sobre los murciélagos, para establecer su estado de conservación y sentar las bases para la evaluación de sus poblaciones a mediano y largo plazo.

#### 4. Planteamiento del problema

Las cuevas forman parte de la atracción turística de Guatemala. El INGUAT estima que los complejos de cuevas en el municipio de Lanquín, conformado por las Grutas de Lanquín y las Cuevas de Kan'ba', son visitadas por 16,000 turistas anualmente (INGUAT, 2019). Las Grutas de Lanquín (en adelante *las grutas*) están ocupadas por colonias numerosas de murciélagos de distintas especies y familias taxonómicas; sin embargo, hasta este estudio, aún no se había realizado investigación que documentara esta diversidad y, por lo tanto, no existían datos para integrarlos en el plan de manejo, específicamente por la importancia de este grupo taxonómico para el ecosistema subterráneo y el paisaje exterior.

En las grutas y su paisaje exterior se han documentado, a partir de observaciones eventuales, especies de murciélagos de interés para conservación; por ejemplo, *Natalus mexicanus*, la cual es especialista de bosque y *Balantiopteryx io*, la cual está incluida en el Listado de Especies Amenazadas (LEA) del Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP, 2009). Esta última, es considerada vulnerable por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), y se encuentra incluida en el catálogo del programa *Evolutionarily Distinct and Globally Endangered* (EDGE), el cual contempla especies que podrían estar experimentando la disminución de sus poblaciones y estar en riesgo de extinción local.

Algunas especies de murciélagos, además de utilizar las cuevas como refugio, son dependientes de la cobertura boscosa en el paisaje exterior (p. ej., *B. io*; B. Miller, com. pers.). Los bosques ofrecen condiciones adecuadas para especies de vuelo lento y altamente maniobrable, y proveen conectividad estructural, ya que las áreas abiertas implican un mayor costo energético

debido a la fuerza del viento (Lacki et al., 2007; Fuentes-Montemayor et al., 2013). Por lo tanto, identificar las áreas con presencia y actividad de abastecimiento en el paisaje exterior es fundamental para establecer acciones de conservación.

## 5. Delimitación en tiempo y espacio

### 5.1. Delimitación en tiempo

La investigación se enmarca en un proyecto con financiamiento parcial de la Sociedad Zoológica de Londres (ZSL, por sus siglas en inglés). Dicho proyecto, inició en mayo de 2021 y finalizará en marzo de 2023, y lleva por título *Ecology and conservation of the sac-winged bat, Balantiopteryx io, in Lanquín, Guatemala*. El componente de investigación propuesto para la Dirección General de Investigación (DIGI) tuvo una duración de ocho meses, de febrero a septiembre de 2022, y contempló el análisis ecológico y genético de las poblaciones de distintas especies de murciélagos presentes en las grutas y su paisaje exterior.

### 5.2. Delimitación espacial

La investigación se llevó a cabo en el Parque Nacional Grutas de Lanquín, ubicado en el municipio de Lanquín, Alta Verapaz, específicamente en las grutas (Figura 1, Apéndice) y su paisaje exterior. Las coordenadas geográficas de las grutas son 15.58° N, 89.99° O. El área está representada por Bosque Subtropical Húmedo, con temperaturas entre 24 y 30 °C, y precipitación anual entre 2,000 y 4,000 mm (Castañeda, 2008; Segeplan, 2014). El origen geológico de la región es sedimentario, con presencia de rocas kársticas (INGUAT, 2019).

## 6. Marco teórico

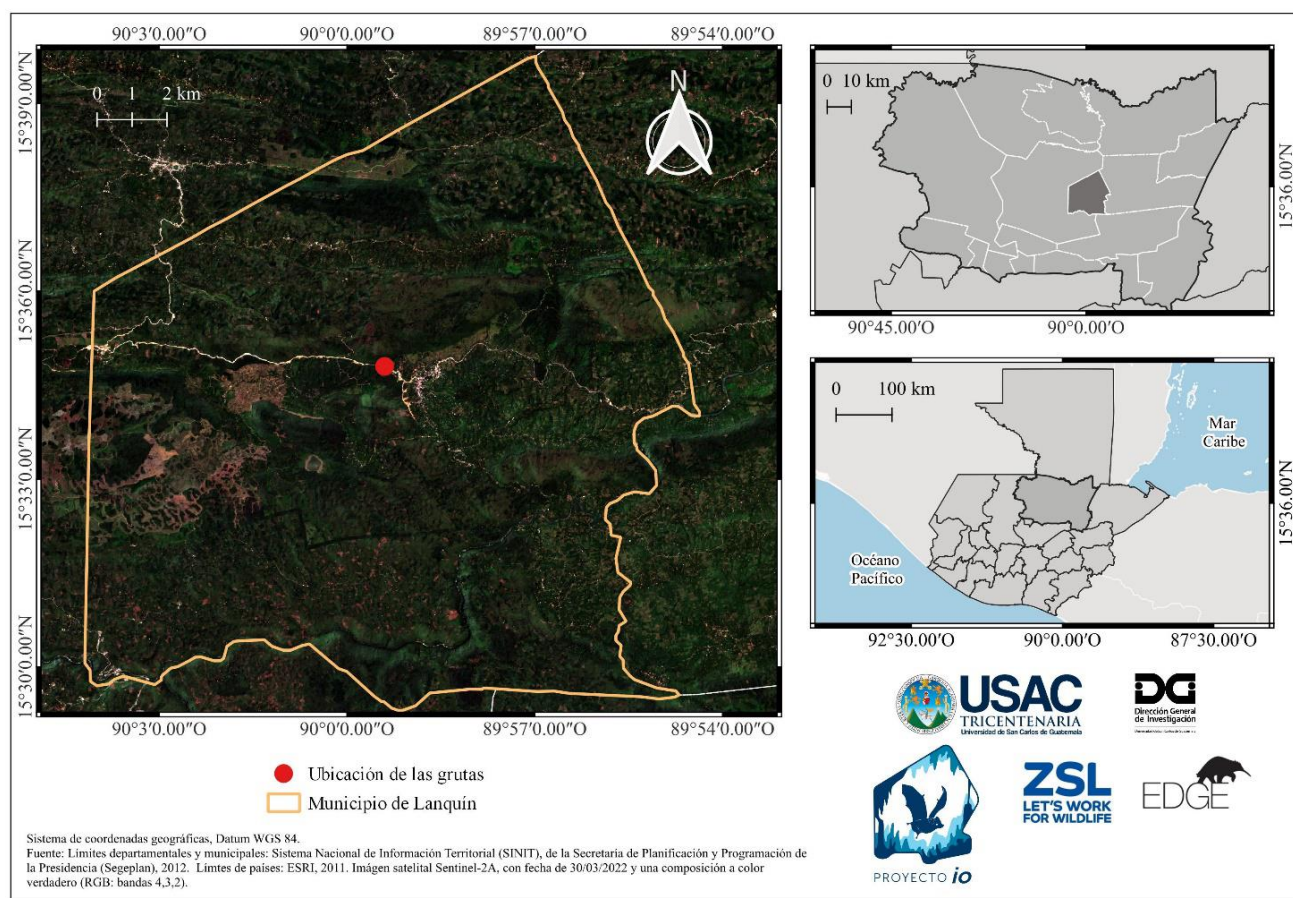
### a. Murciélagos de Guatemala: conocimientos y amenazas

En Guatemala, se tienen reportadas 104 especies de murciélagos pertenecientes a las familias Emballonuridae, Mormoopidae, Noctilionidae, Natalidae, Vespertilionidae, Molossidae, Phyllostomidae y Thyropteridae (McCarthy y Pérez, 2006; Kraker-Castañeda et al., 2016; Trujillo et al., 2020). El LEA (artículo 24, Decreto 4-89; CONAP, 2009), el cual se basa en criterios internacionales establecidos por la UICN, The Nature Conservancy (TNC) y la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora



Silvestre (CITES), incluye 18 especies de murciélagos, algunas de las cuales se refugian en las grutas, como *B. io* y *Pteronotus* spp., y otras cuyo estado de conservación debe ser evaluado, como *N. mexicanus* (C. Kraker, obs. pers.), la cual es considerada especialista de bosque (López-Wilchis et al., 2021).

**Figura 1.** Ubicación de las grutas de Lanquín, en el municipio del mismo nombre, en el departamento de Alta Verapaz, Guatemala.



**Fuente:** Elaboración propia.

El conocimiento de los murciélagos de Guatemala se basa principalmente en el uso de redes de niebla como método de muestreo. Sin embargo, está documentado que esta técnica está sesgada a la familia Phyllostomidae (murciélagos de hoja nasal), cuyos representantes impactan en las mallas por sus características de orientación durante el vuelo, mientras que,

los detectores ultrasónicos, permiten la detección de representantes del gremio trófico-conductual de los insectívoros aéreos, como *B. io*, cuyas vocalizaciones o pulsos de ecolocalización pueden ser grabados y que difícilmente son capturados en las redes de niebla debido a su capacidad de detectarlas (Pech-Canche et al., 2010). En cambio, la trampa de arpa, está diseñada para el trabajo efectivo en cuevas y refugios con densidad alta de murciélagos, lo cual tiene como resultado una gran cantidad de individuos capturados que deben ser manipulados y procesados rápidamente, lo cual no es posible con las redes de niebla debido al tiempo de manipulación requerido y la posibilidad de dañar a los individuos. Las redes de niebla operadas en ambientes fuera de las cuevas (como bosques) brindan mejores resultados en términos de la cantidad de individuos capturados, en comparación con la trampa de arpa, esto debido a la superficie desplegada de mallas que puede ser de varias decenas de metros lineales y la versatilidad para su colocación, en contraste con la superficie de contacto de la trampa de arpa, ya que usualmente se cuenta con un solo dispositivo.

En el país, varias publicaciones han contemplado el uso de redes de niebla como técnica principal de muestreo (Kraker-Castañeda & Pérez-Consuegra, 2011; Kraker-Castañeda & Echeverría-Tello 2012; Cajas-Castillo et al., 2015; Kraker et al., 2016); en contraste, los estudios y las publicaciones que contemplan el uso de detectores ultrasónicos son escasos (Kraker & Pérez, 2012; Trujillo et al., 2021), aun cuando se ha determinado que brindan datos complementarios, es decir, que lo registrado por medio de redes de niebla no es registrado con detectores y viceversa (Pech-Canche et al., 2010; Kraker & Pérez, 2012), y no hay publicaciones que contemplen el uso de trampas de arpa ya que el esfuerzo de investigación en cuevas, cuando se contaba con equipo, ha sido esporádico.

Actualmente, los murciélagos se encuentran amenazados y expuestos a distintas presiones por actividades antropogénicas. Según la RELCOM (2010), son cinco las principales amenazas para este grupo de mamíferos en la región y, particularmente, en Guatemala:

- a) Pérdida de hábitat; la cual es producto del avance de la frontera agrícola, ganadería, deforestación, urbanización, industrialización, entre otros. Las acciones anteriormente mencionadas ocasionan la destrucción y fragmentación del paisaje. Estudios indican que existe

- un recambio de las especies de murciélagos cuando se modifica el hábitat, afectando el ensamblaje de especies y provocando la disminución de las poblaciones (Muylaert et al., 2016).
- b) Destrucción y perturbación de refugios; ya sea con el objetivo de eliminar a los murciélagos o por actividades humanas que afectan a los refugios. Estos son espacios que brindan condiciones óptimas para la hibernación, reproducción, descanso y alimentación. Aquí se incluyen las cuevas, termiteros, techos, follaje, edificaciones abandonadas, sitios arqueológicos, entre otros (Estrada et al., 2006).
  - c) Conflictos murciélago-humano y enfermedades emergentes que provocan la exterminación indiscriminada de los murciélagos; esto como resultado de los intentos por controlar las poblaciones de murciélagos que representan una amenaza hacia los animales domésticos y por la desinformación de la población en general que genera concepciones erróneas sobre los murciélagos (Estrada et al., 2006).
  - d) Uso indiscriminado de sustancias tóxicas; tales como pesticidas y químicos que tienden a acumularse en los organismos por consumo de insectos y frutos contaminados o por exposición (Kunz et al., 1977).
  - e) Amenazas emergentes; relacionadas a la necesidad de nuevas fuentes de energía como las plantas eólicas, que causan tasas altas de mortalidad en aves y murciélagos (Frick et al., 2019).

## 6.2. Cuevas como refugio de murciélagos

Las cuevas tienen un papel importante en la conservación de los murciélagos ya que suelen ser el principal refugio de muchas especies y estas, a su vez, participan en el equilibrio ecológico manteniendo las condiciones ambientales y de sustrato para otros organismos, a través del guano que se acumula como materia orgánica (Trajano, 1995; Arita, 1996). Estos refugios ofrecen condiciones ventajosas como poca luz, humedad y temperatura relativamente constante y a menudo flujo de aire estable, lo cual le proporciona a los murciélagos variedad de microhábitats y sitios para descanso (Hernández-Aguilar y Santos-Moreno, 2020).

Aunque algunas especies solamente utilizan las cuevas de manera temporal, otras dependen completamente de estas como refugio; por ende, la protección de estos sitios es crucial para la conservación de los murciélagos (Kunz, 1982). En México, 45% de las especies de murciélagos, de un total aproximado de 139, habita en cuevas; de este porcentaje, 45% las

utilizan como refugio permanente y el resto de forma ocasional. Para el año 1996, 19 de estas especies se hallaban en estado vulnerable o en peligro de extinción (Arita, 1996).

Lamentablemente, los murciélagos que habitan cuevas son especialmente vulnerables a perturbaciones antropogénicas, ya que son utilizadas para fines turísticos y/o extractivos (Segura-Trujillo & Navarro-Pérez, 2010). Además, enfrentan amenazas como la aniquilación directa, situación exacerbada por la pandemia de COVID-19 (Espinosa, 2020; Estrada, 2020), y la pérdida de hábitat relacionada al cambio de uso de suelo en el paisaje exterior (Mickelburg et al., 2002). El declive de poblaciones de murciélagos provocaría desbalances en estos sistemas.

### 6.3. La genética de la conservación

La diversidad genética es definida como cualquier medida que cuantifique la magnitud de la variabilidad genética, sea dentro un individuo, una población o un área geográfica (Hughes et al., 2008). Esta, refleja el potencial evolutivo y la capacidad de adaptación de una especie a los cambios ambientales. La UICN reconoce a la diversidad genética como uno de los tres niveles de biodiversidad y, por lo tanto, la incluye dentro de las tres prioridades de conservación a nivel mundial (Frankham et al., 2002).

En una población, los cambios demográficos en respuesta a las interacciones ecológicas, junto con la historia natural y los rasgos ecológicos de las especies (p. ej., filopatría, vagilidad, entre otros), influyen en los niveles de diversidad genética (Cruz-Salazar et al., 2018; Lamy et al., 2017). Los niveles de esta también están determinados por impactos antropogénicos. Por ejemplo, la pérdida del bosque afecta directamente la capacidad de carga y, por consiguiente, su capacidad de mantener poblaciones grandes. Asimismo, se da la interrupción de patrones de movimiento (p. ej., dispersión) y el aislamiento de individuos y poblaciones locales.

La pérdida de diversidad genética reduce las probabilidades de persistencia de las poblaciones a largo plazo y, como una consecuencia, los vórtices de extinción (Höglund, 2009). Estos, predicen que los factores genéticos son determinantes en la extinción de especies amenazadas (Höglund, 2009): 1) las poblaciones pequeñas y especies amenazadas tienen

menor variación genética comparadas con taxones emparentados no amenazados, y 2) los casos de extinción están precedidos por una pérdida drástica de la diversidad genética.

Las poblaciones pequeñas son más vulnerables a la estocasticidad demográfica, a la ambiental, y a factores genéticos que tienden a reducir aún más el tamaño poblacional (p. ej., deriva génica). En las poblaciones pequeñas el nivel de consanguinidad se incrementa y, del mismo modo, aumenta la importancia de la deriva génica; esto, dado que la consanguinidad reduce las tasas de supervivencia y reproducción (depresión por endogamia), ocasionando que la proporción de homocigotos y la expresión de alelos deletéreos recesivos se incrementen (Höglund, 2009). Las mutaciones deletéreas pueden fijarse mediante deriva génica, lo que gradualmente erosiona la adecuación en estas poblaciones (Frankham, 2005).

El enfoque de conservar la capacidad de respuesta de las especies en el nivel genético ha cobrado auge en la disciplina conocida como *genética de la conservación*. El problema básico que aborda es que las poblaciones pequeñas y aisladas, tienden a perder la variación genética con el tiempo (Scribner et al., 2006). Por lo tanto, las estrategias de conservación no deben enfocarse únicamente en la representación de especies, sino que deben garantizar la continuidad de los procesos poblacionales (Koleff & Urquiza-Haas, 2011).

## 7. Estado del arte

En Latinoamérica, México es de los países pioneros en el estudio de la biodiversidad en cuevas. A través de la investigación científica se han priorizado los sitios a conservar tomando en cuenta las especies que los habitan, incluidos los murciélagos (ver Arita, 1996; Torres-Flores & Santos-Moreno, 2017; Hernández-Aguilar & Santos-Moreno, 2020). Mientras tanto, en Guatemala, los esfuerzos han sido limitados; la información está dirigida principalmente al turismo y a la importancia de las cuevas para la cosmovisión maya (INGUAT, 2013; 2019). El único trabajo con murciélagos en cuevas, del que se tiene conocimiento, es el de Cajas-Castillo y colaboradores (2015) en la Cueva del Silvino, ubicada en Morales, Izabal; sin embargo, los muestreos fueron interrumpidos por conflictos sociales y vandalismo, por lo que los resultados son parciales. Por lo tanto, generar conocimiento sobre la ecología y genética de los murciélagos que habitan cuevas es clave para establecer las

acciones que permitirán mitigar el declive de sus poblaciones (Frick et al., 2019). A su vez, la conservación de las cuevas permitirá la continuidad de los servicios ecosistémicos que brindan los murciélagos en el paisaje exterior (Santos-Moreno y Hernández-Aguilar, 2020).

## 8. Objetivos

**8.1** Generar conocimiento sobre la ecología y genética de los murciélagos en las Grutas de Lanquín y su paisaje exterior, en Alta Verapaz, Guatemala.

- 8.1.1.** Establecer la riqueza de especies y abundancia relativa en las grutas, diferenciando las épocas seca y lluviosa.
- 8.1.2.** Documentar los cambios temporales en la estructura poblacional de las especies que se refugian en las grutas.
- 8.1.3.** Determinar la abundancia (capturas) y actividad (acústica) de las especies que se refugian en las grutas en la cobertura boscosa del paisaje exterior.
- 8.1.4.** Caracterizar los niveles de diversidad genética de las poblaciones de especies de interés para conservación.

## 9. Hipótesis

**9.1 Hipótesis 1.** La riqueza de especies tendrá recambio y la abundancia relativa fluctuaciones significativas, como respuesta a la dinámica de las especies que utilizan las grutas como refugio temporal. Como refugio permanente, para las especies con patrón de reproducción sincrónico y unimodal, la estructura poblacional se modificará significativamente.

**9.2 Hipótesis 2.** Las especies de murciélagos que utilizan las grutas como refugio, con morfología alar de relación de aspecto pequeña y carga baja, exhibirán mayor abundancia o actividad en sitios cercanos con cobertura boscosa, la cual disminuirá paulatinamente con la distancia en el paisaje exterior.

**9.3 Hipótesis 3.** Las especies que tienden a la filopatría, en el caso de los murciélagos cuando las hembras nacen, permanecen y se reproducen en el mismo territorio, mostrarán niveles de diversidad genética distintos a las especies con dispersión al azar de ambos sexos.

## 10. Materiales y métodos

**10.1. Enfoque de la investigación:** cuantitativo. Este tipo de investigación se utiliza para cuantificar el problema mediante la generación de datos numéricos o datos que pueden transformarse en estadísticas.

### 10.2. Métodos

#### **10.2.1. Objetivo específico 1: Establecer la riqueza de especies y abundancia relativa en las grutas, diferenciando las épocas seca y lluviosa.**

10.2.1.1. Riqueza de especies en las grutas: durante los meses de marzo a agosto de 2022, se realizaron muestreos sistemáticos para el registro de las especies de murciélagos en el área de estudio. En dichos muestreos se utilizó una trampa arpa (AusBat, Faunatech, Australia) colocada en la entrada de la cueva o en el interior de esta. La trampa de arpa se adquirió por medio de la contrapartida del proyecto.

**10.2.1.2.** Cálculo de la abundancia relativa en las grutas: con los datos obtenidos de las capturas de murciélagos se estableció el número de individuos por especie estandarizado al esfuerzo de muestreo (abundancia relativa) para las épocas de secas y de lluvias.

## **10.2.2. Objetivo específico 2: Documentar los cambios temporales en la estructura poblacional de las especies que se refugian en las grutas**

Estructura poblacional en las grutas: a partir de las capturas realizadas con la trampa arpa se obtuvieron las frecuencias de los atributos poblacionales de sexo, edad y estado reproductivo de las especies de murciélagos que se refugian en las grutas, lo cual permitió el cálculo de proporciones/porcentajes respecto al total obtenido, para las épocas de secas y de lluvias.

## **10.2.3 Objetivo específico 3: Determinar la abundancia (capturas) y actividad (acústica) de las especies que se refugian en las grutas en la cobertura boscosa del paisaje exterior.**

**10.2.3.1** Clasificación del paisaje en el exterior de las grutas: se llevó a cabo mediante el uso de percepción remota, técnicas de procesamiento y análisis de imágenes multiespectrales. La percepción remota o teledetección, específicamente la teledetección desde satélites cuenta con numerosas aplicaciones y es una de las pocas fuentes de información globales, ya que los sistemas orbitales permiten tomar información de todo el planeta (Chuvieco, 2008).

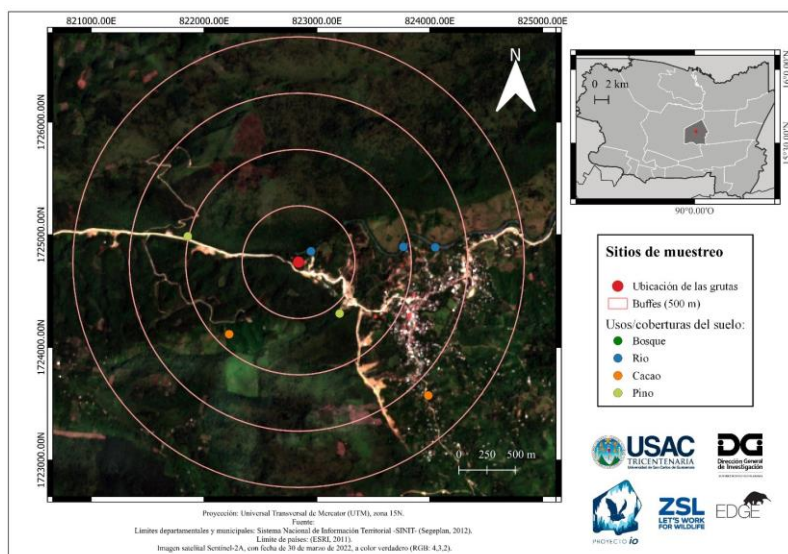
La teledetección satelital ofrece muchos datos útiles y a veces esenciales para el mapeo, monitoreo y gestión de sitios del patrimonio cultural mundial, ya sean sitios naturales como parques o sitios culturales como sitios arqueológicos y monumentos. Al combinar estas técnicas con Sistemas de Información Geográfica (SIG), el proceso de monitoreo de dichos sitios puede respaldarse de manera eficiente de manera confiable, repetitiva, no invasiva, rápida y rentable (Hadjimitsis & Themistocleus, 2008).



**10.2.3.2** Librería acústica y cálculos de actividad relativa: técnicas de campo de bioacústica y muestreo sistemático. La bioacústica se enfoca en las señales sonoras producidas por los animales, para el estudio de su biología y ecología (Urbina et al., 2015). Se colocaron micrófonos ultrasónicos autónomos Audiomoth (*acoustic loggers*), paralelamente a las capturas. Con los datos obtenidos de los detectores, se determinó la intensidad de la actividad relativa (archivos efectivos con evidencia de las especies presentes en las grutas).

**10.2.3.3** Capturas con redes de niebla y abundancia relativa: técnicas de campo para captura de murciélagos y muestreo sistemático. Se utilizaron de tres a cuatro redes de niebla de 3 x 12 m (Avinet, EE.UU.), para la obtención de datos de riqueza y número de individuos. Con los datos obtenidos, se determinó el número de individuos por especie registrada en las grutas, en distintos puntos de muestreo, en el paisaje exterior.

**Figura 2.** Ubicación de los sitios de muestreo.

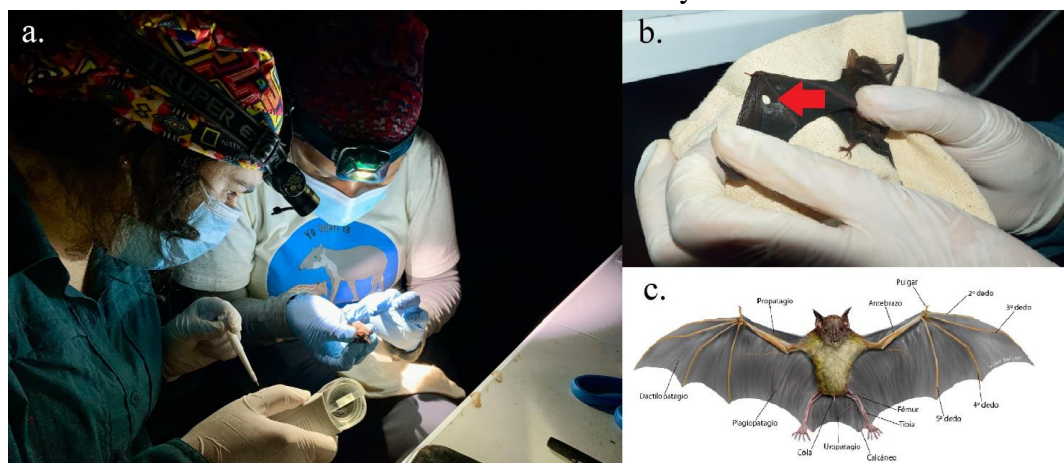


**Fuente:** Elaboración propia.

## 10.2.4 Objetivo específico 4: Caracterizar los niveles de diversidad genética de las poblaciones de especies de interés para conservación.

Caracterización de la diversidad genética: los análisis genéticos parten de la extracción del ADN de muestras biológicas. En este caso se empleó una técnica que no implica la eutanasia de los ejemplares y que consiste en realizar biopsias en las membranas alares de los individuos capturados. Para la obtención de las muestras (una vez realizado el registro de los datos morfométricos y otras características de cada espécimen capturado con la trampa de arpa), se realizó una biopsia en una posición estándar a algunos individuos (p. ej., no fueron tomadas en cuenta hembras preñadas). Para este fin se empleó un punch dermatológico de 3 mm de diámetro (Figura 2, Anexos).

**Figura 3.** Proceso de obtención de muestras de tejido alar de *Balantiopteyx io*: **a.** manipulación del espécimen capturado al momento de realizar la biopsia con el *punch* dermatológico; **b.** orificio producido al realizar la biopsia en la membrana alar; **c.** esquema de algunos de los caracteres externos de un murciélago, que muestra la ubicación del 4° y 5° dedo.



**Fuente:** fotografías propias. Esquema: ilustración de D. Barletta, obtenido de Kraker et al., 2021.

Este método para la obtención de muestras de tejido en murciélagos se ha vuelto relativamente común, pues permite la extracción de ADN, ARN y proteínas para análisis moleculares. Cabe resaltar que la membrana alar de los murciélagos es susceptible de sufrir daños, que pueden ser ocasionados por distintas fuentes, incluyendo impactos con objetos naturales y artificiales, peleas entre congéneres y ataques de depredadores o debido a patógenos (Pollock et al., 2016). Algunos trabajos sugieren el uropatagio para la obtención de muestras para análisis moleculares, dada la mayor masa de tejido y concentración de ADN, sin embargo, en este caso utilizamos una posición estándar en el dactilopatagio del ala derecha, entre el cuarto y quinto dedo

(Figs. 2b, 2c en Anexos), ya que, en esta parte de la membrana, el orificio producido al realizar la biopsia es fácilmente identificable en campo a corto plazo. De igual forma, la cicatriz también se usa como método de marcado e identificación de murciélagos en campo. Una vez obtenidas las muestras de tejido, éstas se almacenaron en viales con 2 ml de alcohol al 95%. A cada muestra se le asignó un código. Posteriormente, los viales fueron trasladados y almacenados a una temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$  (en congelador común).

## **10.3 Recolección de información**

### **10.3.1 Objetivo específico 1: Establecer la riqueza de especies y abundancia relativa en las grutas, diferenciando las épocas seca y lluviosa.**

Riqueza de especies en las grutas: se colocó la trampa de arpa disponible por parte de la contrapartida en el interior y en la salida de las grutas para capturar a los individuos a través de muestreos en épocas seca y lluviosa. Los individuos capturados se identificaron en campo utilizando la Guía de Identificación de los Murciélagos de México (Medellín et al., 2007) y la Guía Ilustrada de Mamíferos de Centroamérica y Sur de México (Reid, 2009). Se tomaron datos en cuatro ocasiones en la época de secas y siete ocasiones en la época de lluvias, para un total de 11 observaciones. Se empleó el equipo necesario para la captura, contención y medición de los caracteres para identificación taxonómica (p. ej., guantes de cuero, bolsas de manta, calibrador digital, balanzas, claves y guías).

Cálculo de la abundancia relativa en las grutas: la muestra correspondió al número de individuos por especie capturados de la población. Se utilizó la trampa de arpa disponible por parte de la contrapartida. El esfuerzo con la trampa de arpa (una trampa) fue variable con respecto al tiempo en que esta fue utilizada en cada evento de muestreo, pero considerando un mínimo de cuatro horas por noche a partir del atardecer para un total de 11 eventos de muestreo, mientras que, su superficie de captura permanece constante respecto a las dimensiones del dispositivo. Al finalizar, los datos fueron estandarizados con base en el esfuerzo de muestreo realizado.

### **10.3.2 Objetivo específico 2: Documentar los cambios temporales en la estructura poblacional de las especies que se refugian en las grutas.**

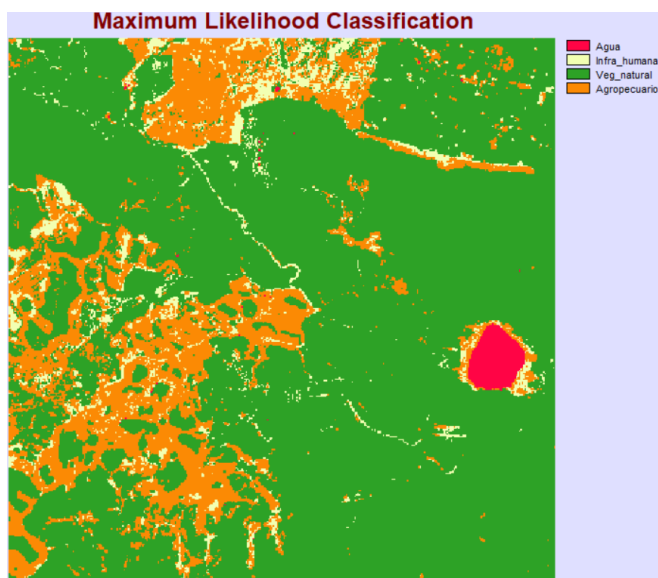
Estructura poblacional en las grutas: la muestra correspondió al número de individuos por especie capturados de la población (frecuencia), que representan cada atributo poblacional (edad, sexo y estado reproductivo). Se utilizó la trampa de arpa, disponible por parte de la contrapartida.

### 10.3.3 Objetivo específico 3: Determinar la abundancia (capturas) y actividad (acústica) de las especies que se refugian en las grutas en la cobertura boscosa del paisaje exterior.

**10.3.3.1** Clasificación del paisaje en el exterior de las grutas: se obtuvo una imagen multispectral Sentinel-2A, disponible a través de la plataforma facilitada por la Agencia Espacial Europea (ESA, por sus siglas en inglés) en el siguiente enlace <https://scihub.copernicus.eu/>.

El nivel de procesamiento del producto descargado fue L2A, lo que significa que además de estar ortorrectificado, y se aplicó una corrección atmosférica. La fecha de toma de la imagen fue el 30 de marzo de 2022 y el porcentaje de nubes fue de 2.55%. El instrumento multispectral (MSI, por sus siglas en inglés) de Sentinel-2A muestrea 13 bandas espectrales: cuatro bandas a 10 metros (B2, B3, B4, B8), seis bandas a 20 metros (B5, B6, B7, B8A, B11, B12) y tres bandas a 60 metros (B1, B9, B10) de resolución espacial.

**Figura 4.** Clasificación de usos/coberturas del área presentes en el área de estudio, con el algoritmo de Máxima Verosimilitud.



Nota: la clase agua se representa de color rosa, la clase infraestructura humana de color amarillo, la clase vegetación arbórea de color verde y la clase agropecuario de color naranja.

Se llevó a cabo una combinación de las bandas B8 (infrarrojo cercano), B4 (rojo) y B3 (verde). La combinación de bandas se utiliza para revelar o mejorar características que de otro modo serían invisibles o poco visibles para el ojo humano. Esta combinación de bandas (8, 4, 3), conocida como “infrarrojo”, hace énfasis en la vegetación “sana” y la “no sana”. La banda 8, es especialmente buena para reflejar la clorofila presente en las plantas. La combinación de bandas se hizo en el programa IDRISI Selva versión 17.0 (Clark Labs).

**10.3.3.2** Librería acústica y cálculos de actividad relativa: la muestra correspondió a las grabaciones de los individuos de cada especie capturados de la población. Para la librería acústica se consideraron capturas con trampa de arpa en las grutas y con redes de niebla en el paisaje exterior. Los murciélagos capturados fueron grabados en condiciones semi-controladas en una zona semiabierta cercana al sitio de captura para luego ser liberados. A partir de las grabaciones, se obtuvo una muestra de vocalizaciones de las distintas especies.

Para la actividad relativa, los detectores fueron colocados en espacios acústicos adecuados (p. ej., brechas amplias en cobertura boscosa), a distancias variables a partir de las grutas (centroide) en tres categorías de distancia (radio de 0.5 km, 0.5 a 1 km, 1 a 1.5 km) y en dos sitios de muestreo en bosque.

**10.3.3.3** Capturas con redes de niebla y abundancia relativa: la muestra correspondió a las especies registradas mediante captura y al número de individuos por especie capturados de la población. Las redes fueron colocadas en sitios de muestreo en tres coberturas boscosas (bosque, cacao y pino). Los murciélagos capturados fueron procesados y posteriormente liberados.

## **10.3.4 Objetivo específico 4: Caracterizar los niveles de diversidad genética de las poblaciones de especies de interés para conservación**

Caracterización de la diversidad genética: de las especies más abundantes registradas con la trampa de arpa, se seleccionó a la especie *B. io* para llevar a cabo los análisis de diversidad genética, debido a que está catalogada como una especie EDGE (acrónimo de *Evolutionarily Distinct and Globally Endangered*), que como se mencionó previamente, dicho catálogo contempla especies que podrían estar experimentando disminución de sus poblaciones y estar en riesgo de extinción local. El flujo de trabajo para poder llevar a cabo los análisis genéticos fue el siguiente: extracción de ADN genómico a partir de las muestras de tejido, amplificación (multiplicación) de una región de interés de la molécula de ADN y la secuenciación del fragmento amplificado. Estos procedimientos serán detallados en la siguiente sección.

Como marcador molecular se usó el ADN mitocondrial (ADNmt, en adelante), específicamente un fragmento de la región control, llamado bucle de desplazamiento o *D-loop*. El ADNmt se trata de un ADN extra-cromosómico que consiste en una molécula circular. En cada mitocondria hay varias copias de este ADN, además tiene un tamaño relativamente pequeño y un arreglo de genes conservado, con una tasa de mutación generalmente alta (lo que significa que generalmente muestra niveles relativamente altos de polimorfismo). Estas características, hacen que el ADNmt sea relativamente fácil de trabajar (Freeland et al., 2011).

Como cebadores (secuencias cortas de ADN diseñadas para flanquear la región que se desea amplificar) se utilizaron los incluidos en la publicación de Nagy et al. (2014), siendo éstos el par E: 5'-CCTGAAGTAGGAACCCAGATG-3' y P\*: 5'-CCCCACCATCAACACCCAAAGCTGA-3'.

## **10.4 Técnicas e instrumentos**

### **10.4.1 Objetivo específico 1: Establecer la riqueza de especies y abundancia relativa en las grutas, diferenciando las épocas seca y lluviosa**

**10.4.1.1** Riqueza de especies en las grutas: por medio de las capturas realizadas dentro de las grutas, se obtuvo un listado de las especies de murciélagos que la utilizan como refugio, en época de secas y de lluvias. Se utilizó la trampa de arpa, la cual garantizó la captura de murciélagos sin lastimarlos. Los datos fueron recabados en una boleta de campo y sistematizados en programas especializados. Asimismo, se documentaron las especies capturadas con fotografías utilizando una cámara profesional (Nikon D5200).

**10.4.1.2** Cálculo de la abundancia relativa en las grutas: por medio de las capturas realizadas dentro de las grutas, en épocas seca y lluviosa, se obtuvo un listado del número de individuos entre las especies, que permitió el cálculo de abundancia relativa estandarizado al esfuerzo de muestreo. Los datos fueron recabados en una boleta de campo y sistematizados en programas especializados.

## **10.4.2 Objetivo específico 2: Documentar los cambios temporales en la estructura poblacional de las especies que se refugian en las grutas**

Estructura poblacional en las grutas: por medio de las capturas realizadas dentro de las grutas, en épocas seca y lluviosa, se obtuvo las frecuencias de los atributos poblacionales de cada especie, que permitieron el cálculo de proporciones/porcentajes respecto al total obtenido. Los datos fueron recabados en una boleta de campo y sistematizados en programas especializados.

## **10.4.3 Objetivo específico 3: Determinar la abundancia (capturas) y actividad (acústica) de las especies que se refugian en las grutas en la cobertura boscosa del paisaje exterior**

**10.4.3.1** Clasificación del paisaje en el exterior de las grutas: se llevó a cabo una clasificación supervisada, la cual parte del conocimiento previo del área de estudio y puntos de control tomados en campo. En la clasificación supervisada, se deben seleccionar muestras de entrenamiento (generalmente, a partir de los puntos de control) que representen los principales usos/coberturas del suelo presentes en el área de interés y se clasifica la imagen satelital en función de las muestras elegidas (Chuvienco, 2008).

Para propósitos de esta clasificación se consideraron cuatro clases de usos/coberturas del suelo: (1) agua, incluye cuerpos de agua como ríos y lagos; (2) infraestructura humana, incluye asentamientos humanos e infraestructura vial; (3) agropecuario, se incluyen pastizales, potreros y cultivos principalmente herbáceos (p. ej., maíz); y (4) vegetación arbórea, como bosque, plantaciones forestales y sistemas agroforestales (cultivos de café bajo sombra, cultivo de cacao y cultivo de cardamomo). Durante las salidas de campo al área de estudio, se registraron puntos de control con la ayuda de un GPS. También se hizo uso del programa Google Earth Pro (Google LLC, 2022), para la ubicación de áreas de entrenamiento. Se usó una rutina de segmentación, disponible en el programa IDRISI Selva.

**10.4.3.2** Librería acústica y cálculos de actividad relativa: por medio de las grabaciones, se realizó la caracterización acústica de las especies siguiendo un protocolo de estandarización (Kraker-Castañeda et al., 2020). Los datos fueron recabados en un portafolio por especie, compuesto por una plantilla en un archivo Word con la información de soporte, un archivo Excel con las mediciones de los parámetros acústicos y la descripción estadística, y un archivo WAV con la grabación de referencia de cada especie. La caracterización se utilizó como referencia para la identificación de murciélagos grabados en vuelo libre en el paisaje exterior de las grutas. Para la actividad relativa, se consideraron eventos de grabación de cuatro a cinco horas de duración, para establecer el número de archivos efectivos con evidencia de las especies registradas en las grutas, en el paisaje exterior.

**10.4.3.3** Capturas con redes de niebla y abundancia relativa: por medio de las capturas de murciélagos en cada sitio de muestreo, se obtuvo el número de individuos por especie registrada en las grutas en el espacio exterior. Las redes de niebla estuvieron abiertas aproximadamente por cuatro horas y fueron revisadas sistemáticamente cada 20 minutos para evitar algún incidente con los murciélagos capturados. Los datos fueron recabados en una boleta de campo y sistematizados en programas especializados. Asimismo, se documentaron las especies capturadas con fotografías utilizando una cámara profesional.

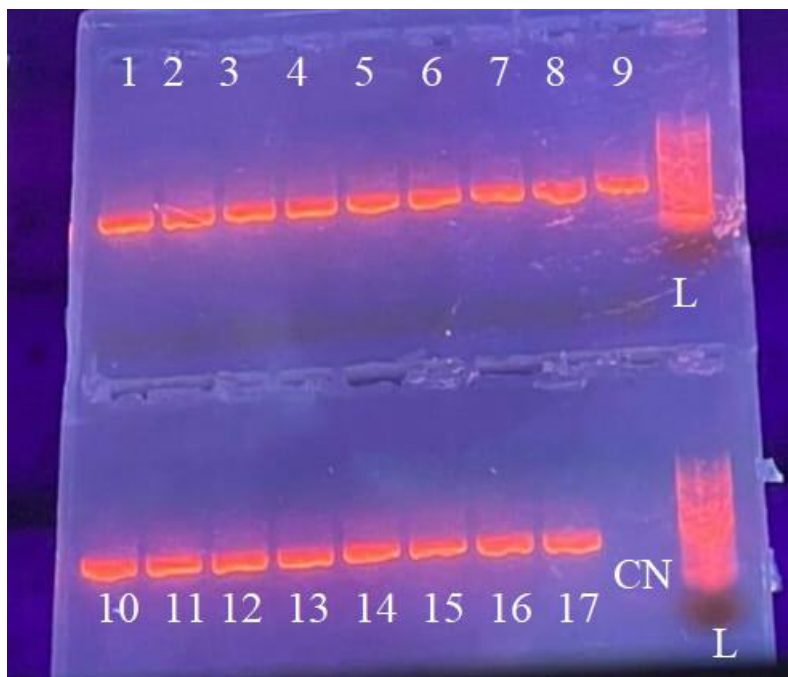


## **10.4.4 Objetivo específico 4: Caracterizar los niveles de diversidad genética de las poblaciones de especies de interés para conservación**

Caracterización de la diversidad genética: para la extracción de ADN genómico se utilizó un *kit* comercial basado en el uso de columnas de extracción compuestas de una matriz inorgánica, específicamente *ReliaPrep™ gDNA tissue Miniprep System* de la empresa Promega. Este método permite obtener un extracto libre de inhibidores, lo que resulta ideal para poder llevar a cabo amplificaciones exitosas (Alejos Velázquez et al., 2014). Se siguió el protocolo 3.A sugerido por el fabricante, disponible en <https://worldwide.promega.com/>, tomando en cuenta las siguientes consideraciones: la incubación a 56 °C para la homogeneización del tejido se llevó a cabo durante toda la noche y se omitió el uso de la solución RNasa A, ya que la presencia de ARN no era motivo de preocupación para nuestros análisis (Promega Corporation, 2013). El ADN extraído se diluyó en agua libre de nucleasas y se almacenó a 4 °C. El éxito de las extracciones se verificó a través de electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en una cámara de electroforesis Fisherbrand™. Se usó el tinte fluorescente GelRed® (Biotium), diseñado para reemplazar el bromuro de etidio en la tinción del ADN en los geles de agarosa. Como solución tampón se usó TAE (tris-acetato-EDTA) de la marca Promega. El equipo de fotodocumentación empleado fue BioDoc-it™ System (UVP, LLC).

Las amplificaciones se llevaron a cabo mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). El programa de amplificación se basó en el incluido en la publicación de Nagy et al. (2014); sin embargo, se realizaron modificaciones, quedando de la siguiente manera: 1 ciclo a 94 °C, durante 1 minuto (fase de desnaturalización); 40 ciclos a 94 °C por 30 segundos, a 50 °C por 45 segundos, a 72 °C por 1 minuto; 1 ciclo a 72 °C durante 1 minuto (fase de hibridación); y el paso final a 4 °C, infinito (fase de extensión). Se usó el termociclador *Applied Biosystems™ Veriti™* de 96 pozos con rampa. La mezcla maestra empleada fue la *GoTaq Green Master Mix* (Promega). El volumen para cada reacción PCR fue de 60  $\mu$ l: 31.5  $\mu$ l de *GoTaq Green 2x*, 7.5  $\mu$ l de cada cebador a una concentración 1 pM, 8.75  $\mu$ l de agua libre de nucleasas y 5  $\mu$ l de la solución de ADN extraído. Del mismo modo que para corroborar el éxito de las extracciones, se llevaron a cabo corridas en geles de agarosa 1.5% para corroborar el éxito de las amplificaciones (Figura 4, Anexos).

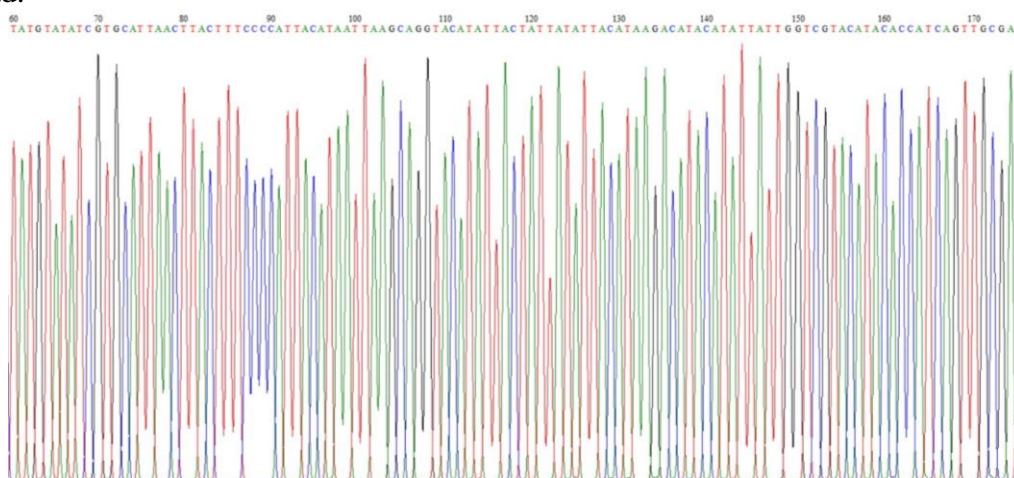
**Figura 5.** Resultados de amplificaciones positivas (bandas presentes) para una corrida en electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con 17 muestras.



**Nota:** Los pozos numerados del 1-17 muestran un resultado positivo. El pozo 18, incluye un control negativo (CN). Los últimos pozos tanto de la sección superior como la inferior, incluyen un Ladder.

Los productos de las amplificaciones (amplicones) fueron enviados a la empresa Macrogen Inc. (Corea del Sur, <https://dna.macrogen.com/>) para su secuenciación. La secuenciación de fragmentos de ADN proporciona los medios más precisos para evaluar la variación genética, pues permite identificar las diferencias exactas en el par de bases nitrogenadas entre individuos (Freeland et al., 2011). El servicio de secuenciación ofrecido por esta empresa se basa en el método Sanger por electroforesis capilar, con la cual se cuantifica la intensidad de luz de los cuatro nucleótidos teñidos en cada posición del fragmento de ADN estudiado.

**Figura 6.** Porción de un electroferograma visualizado en el programa BioEdit que muestra una secuencia de bases nitrogenadas (parte superior): adenina (A) de verde, guanina (G) de negro, timina (T) de rojo y citosina (C) de azul), desde la posición 60 hasta la 175 del fragmento amplificado (aprox. 350 pb). La secuencia incluida resulta de la interpretación de los picos luminosos emitidos durante el proceso de secuenciación. Se observa que los picos están bien definidos, separados entre sí y con poco ruido de fondo, representando una secuencia de buena calidad.



## 10.5 Procesamiento y análisis de la información

### **10.5.1 Objetivo específico 1: Establecer la riqueza de especies y abundancia relativa en las grutas, diferenciando las épocas seca y lluviosa**

**10.5.1.1** Riqueza de especies en las grutas: se elaboró una curva de acumulación de especies global para determinar la completitud del inventario a través de la estabilización de esta. El proceso de iteraciones para suavizar la curva se llevó a cabo en el software EcoSim (Acquired Intelligence Inc. & Kessey-Bear).

**10.5.1.2** Cálculo de la abundancia relativa en las grutas: la abundancia relativa promediada se comparó entre las épocas seca y lluviosa a través de métodos no paramétricos, como la prueba Mann-Whitney. Se utilizó el programa GraphPad InStat (GraphPad Software).

### **10.5.2 Objetivo específico 2: Documentar los cambios temporales en la estructura poblacional de las especies que se refugian en las grutas**

Estructura poblacional en las grutas: las frecuencias de cada atributo poblacional se compararon entre las épocas de secas y de lluvias, a través de la prueba exacta de Fisher. Se utilizó el programa GraphPad InStat (GraphPad Software).

### **10.5.3 Objetivo específico 3: Determinar la abundancia (capturas) y actividad (acústica) de las especies que se refugian en las grutas en la cobertura boscosa del paisaje exterior**

**10.5.3.1** Clasificación del paisaje en el exterior de las grutas: previo a realizar la clasificación supervisada se aplicó un filtro sobre la composición generada a partir de la combinación de bandas, con la finalidad de incrementar la distinción entre las diferentes características de la imagen (usos/coberturas del suelo) y así mejorar su interpretación. Posteriormente, se llevó a cabo una rutina de segmentación, disponible en el programa IDRISI Selva.

El primer paso consistió en crear una imagen conformada de segmentos que presentaran similitud espectral. Los segmentos se definen de acuerdo con un umbral de similitud, que para este caso se usó un umbral de 100. Este umbral facilitó la selección de las muestras de entrenamiento, debido al tamaño de los segmentos generados. Luego, los segmentos fueron asignados a un uso o cobertura del suelo en específico (con ayuda de los puntos de control registrados en campo y el Programa Google Earth Pro). Finalmente, se procedió a clasificar la imagen con el algoritmo de Máxima Verosimilitud (Eastman, 2012). La clasificación obtenida se volvió a clasificar con el objetivo de corregir pixeles mal asignados (Figura 5, Anexos).

**10.5.3.2** Librería acústica y cálculos de actividad relativa: la descripción estadística de los parámetros acústicos incluyó medidas de tendencia central (media y mediana) y cálculos de dispersión de los datos (desviación estándar). Para el análisis de las grabaciones, se utilizaron programas de descarga gratuita para la visualización y el análisis acústico (p. ej., Kaleidoscope Pro) y aplicaciones de paquetes ofimáticos (p. ej., Excel).

Para la actividad relativa en las categorías de distancia, se llevarán a cabo comparaciones múltiples a través de técnicas no paramétricas, como las pruebas Kruskal-Wallis y post hoc (comparación múltiple de Dunn). Se utilizará el programa GraphPad InStat (GraphPad Software).

**10.5.3.3** Capturas con redes de niebla y abundancia relativa: se presentó el número de individuos capturados en cada uno de los sitios de muestreo definidos para la condición de cobertura boscosa: bosque, cacao y pino. Debido al bajo número de capturas no se procedió con análisis estadísticos.

**10.4.4. Objetivo específico 4: Caracterizar los niveles de diversidad genética de las poblaciones de especies de interés para conservación**

Los gráficos provenientes del secuenciador o electroferogramas fueron visualizados en programas especializados para evaluar su calidad (Figura 6, Anexos). Esta visualización permitió editar las secuencias, al remover los tramos considerados poco confiables (generalmente ubicados en ambos extremos de una secuencia); asimismo, permitió excluir a las secuencias que no cumplieron con los criterios de calidad: electroferogramas con picos perceptibles, pero con mucho ruido de fondo en la parte inferior, lo que pudo haber interferido en la correcta identificación de la base nitrogenada. La remoción de los extremos (tramo comprendido entre las bases 1-20 y tramo comprendido entre la base 330 en adelante, aproximadamente) en las secuencias seleccionadas se llevó a cabo en el programa BioEdit versión 7.2.5 (Tom Hall-Ibis Biosciencias, 1997-2013).

Previo a realizar el alineamiento de las secuencias a fin de poder identificar los motivos comunes en ellas, se usó la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para nucleótidos BLASTN (Zhang et al., 2000), disponible a través del siguiente enlace: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Esta herramienta permitió comparar las secuencias obtenidas en este proyecto con otras secuencias que han sido previamente caracterizadas y depositadas en una base de datos, como la del GenBank®. Lo anterior permite encontrar secuencias que están relacionadas con las secuencias de interés. Específicamente, se buscan regiones de similitud entre secuencias, al comparar las secuencias obtenidas con las depositadas en las bases de datos y se calcula la significancia estadística de las coincidencias. Se seleccionaron al azar 10 secuencias para hacer esta comparación.

El alineamiento de las secuencias se hizo en el programa BioEdit mediante la función *ClustalW Multiple Alignment* (Thompson et al., 1994), usando los parámetros por defecto. El alineamiento es necesario previo a que las secuencias sean comparadas y utilizadas en los análisis de diversidad genética, pues resulta útil para la detección de SNPs (*Single-nucleotide polymorphism*).

Como estimadores de la diversidad genética se usaron los siguientes parámetros: número de haplotipos únicos ( $h$ ), diversidad de haplotipos ( $H_d$ ) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ). Como medida de polimorfismo, también uno de los elementos de la diversidad genética, se usó el número de sitios segregados, de segregación o polimórficos ( $S$ ). Los anteriores estadísticos se calcularon en el programa DnaSP versión 6.12.03 (Rozas et al., 2017). Un haplotipo es la versión haploide de un genotipo, se refiere a una única secuencia de ADN (para marcadores moleculares provenientes de organelos, como las mitocondrias). La diversidad de haplotipos ( $H_d$ ) se refiere a la probabilidad de que dos haplotipos muestreados aleatoriamente sean diferentes (Nei, 1987), mientras que la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) es el número promedio de diferencias de nucleótidos por sitio entre dos secuencias muestreadas aleatoriamente (Nei & Li, 1979).

Además, se llevó a cabo una prueba de Tajima ( $D$ ) en el programa DnaSP, con el propósito de identificar si las secuencias se encuentran bajo el modelo de la Teoría Neutral o si se desvían del mismo. La prueba de Tajima se basa en las diferencias entre el número de sitios segregados y el número promedio de diferencias de nucleótidos (Tajima, 1989). Si estos dos números son iguales o lo suficientemente cercanos como para que la diferencia entre ellos sea menor que dos desviaciones estándar del promedio (bajo los supuestos de evolución neutral: no selección, no recombinación, no subdivisión poblacional, no cambios en el tamaño poblacional), entonces no se puede rechazar la hipótesis nula de neutralidad. En caso contrario, se rechaza la hipótesis nula de neutralidad.

Se construyó una red de haplotipos en el programa PopART versión 1.7 (Leigh & Bryant, 2015) para la visualización de la variación intraespecífica, específicamente, para representar las relaciones genéticas entre las secuencias (haplotipos únicos identificados) dentro del conjunto de datos. Se usó el algoritmo de *Median-joining* (Bandelt et al., 1999) con los parámetros por defecto ( $\epsilon = 0$ ).

Finalmente, para evaluar parcialmente la hipótesis de filopatría en hembras de *B. io* (descrita en la sección 9, inciso 9.3), se calcularon los estimadores de diversidad genética por sexo (machos y hembras). Se partió de la idea que la diversidad genética mitocondrial dentro de una colonia debería ser mayor en los machos en relación con las hembras, pues se esperaría que la dispersión este sesgada hacia los machos (Nagy et al., 2014).

## 11. Resultados y discusión

### 11.1 Resultados:

#### 11.1.1 Riqueza y abundancia relativa

En las grutas, entre marzo y agosto de 2023, obtuvimos una riqueza de ocho especies y seis géneros, distribuidos en cuatro familias taxonómicas (Tabla 1). El total de murciélagos capturados fue menor en la época de secas, lo cual está determinado por el esfuerzo de muestreo en términos de horas de operación de la trampa de arpa, siendo este mayor en la época de lluvias; sin embargo, al estandarizar los datos, esta diferencia se ve equiparada (Tabla 1).



**Tabla 1.** Listado de especies registradas en las grutas, diferenciando entre época de secas y de lluvias. Se incluye el número de individuos capturados y entre paréntesis la estandarización al número total de horas de muestreo en cada época (25 horas en secas y 34.5 horas en lluvias).

Taxon	Secas	Lluvias	Total
<b>PHYLLOSTOMIDAE</b>			
Stenodermatinae			
<i>Artibeus jamaicensis</i>	1 (0.04)	1 (0.03)	2
Glossophaginae			
<i>Glossophaga</i> sp.	1 (0.04)	0	1
<b>NATALIDAE</b>			
<i>Natalus mexicanus</i>	0	1 (0.03)	1
<b>MORMOOPIDAE</b>			
<i>Mormoops megalophylla</i>	39 (1.56)	37 (1.07)	76
<i>Pteronotus fulvus</i>	154 (6.16)	199 (5.77)	353
<i>Pteronotus mesoamericanus</i>	1 (0.04)	7 (0.20)	8
<i>Pteronotus personatus</i>	5 (0.20)	16 (0.46)	21
<b>EMBALLONURIDAE</b>			
<i>Balantiopteryx io</i>	121 (4.84)	182 (5.28)	303
Total	322 (12.88)	443 (12.84)	765

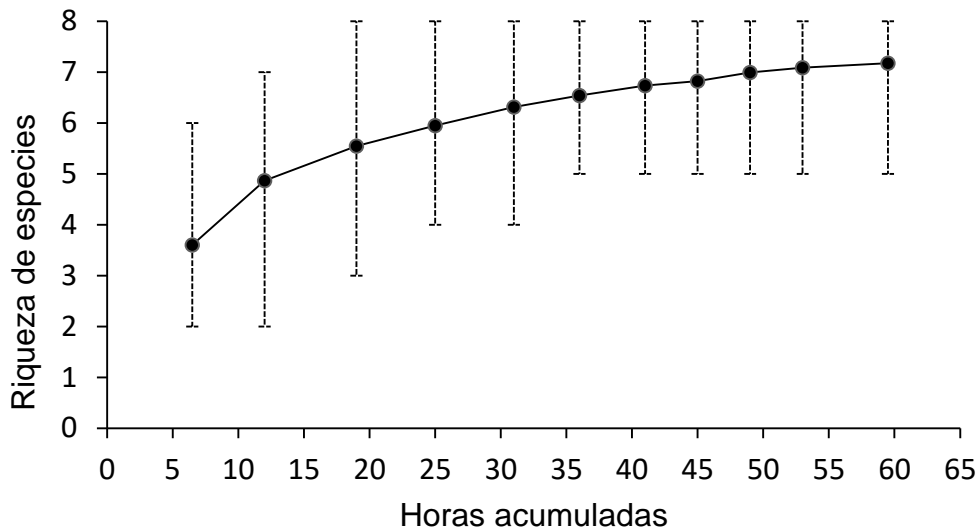
En la Tabla 2, presentamos el número individuos de las tres especies con mayor número de capturas, por evento de muestreo, así como su estandarización con base en las horas de operación de la trampa de arpa. Se pueden observar diferencias en la abundancia relativa de dichas especies, con un valor menor para *Mormoops megalophylla* en comparación con *P. fulvus* y *B. io*.

**Tabla 2.** Número de individuos capturados por evento de muestreo en las grutas, diferenciando entre época de secas y de lluvias. Entre paréntesis se presenta la estandarización con base en el esfuerzo (horas).

<b>Fecha (época)</b>	<b><i>Mormoops megalophylla</i></b>	<b><i>Pteronotus fulvus</i></b>	<b><i>Balantiopteryx io</i></b>	<b>Esfuerzo (h)</b>
03-mar (secas)	1 (0.15)	2 (0.31)	51 (7.85)	6.5
04-mar (secas)	0	12 (2.18)	1 (0.18)	5.5
25-abr (secas)	8 (1.14)	17 (2.43)	50 (7.14)	7
25-may (secas)	30 (5)	123 (20.50)	19 (3.17)	6
26-jul (lluvias)	24 (4)	149 (24.83)	33 (5.50)	6
27-jul (lluvias)	0	26 (5.20)	1 (0.20)	5
28-jul (lluvias)	0	0	3 (0.60)	5
29-jul (lluvias)	0	0	16 (4)	4
30-jul (lluvias)	5 (1.25)	1 (0.25)	12 (3)	4
31-jul (lluvias)	4 (1)	0	15 (3.75)	4
30-ago (lluvias)	4 (0.62)	23 (3.54)	102 (15.69)	6.5
<b>Total</b>	<b>76 (1.27)</b>	<b>353 (5.93)</b>	<b>303 (5.09)</b>	<b>59.5</b>

Complementariamente, elaboramos una curva de acumulación de especies para describir gráficamente la riqueza y reflejar la completitud del inventario. Pudimos observar que al inicio se presenta una pendiente pronunciada y a partir de aproximadamente 30 horas de muestreo se estabiliza, y en términos absolutos únicamente se agrega una especie hasta que finalizamos el muestreo, lo cual nos indica una cobertura adecuada (Figura 1).

**Figura 7.** Curva de acumulación de especies reescalada al número de horas acumuladas de muestreo con la trampa de arpa.



Nota: La curva fue suavizada mediante un procedimiento de iteraciones (1000), lo cual permitió el cálculo de los intervalos de confianza de 95%. El procedimiento de iteraciones se llevó a cabo en el programa EcoSim v. 7.0 (Acquired Intelligence, Inc. & Kessey-Bear, EE.UU.)

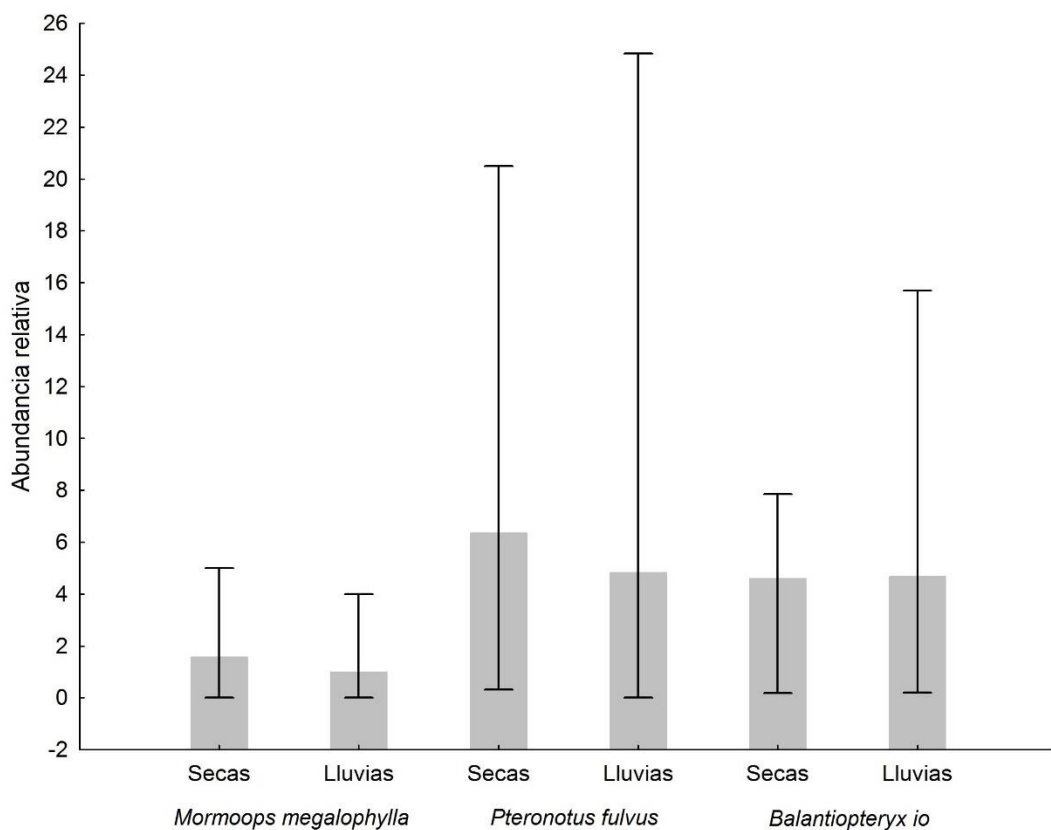
A partir de los resultados de abundancia relativa de las tres especies con mayor número de capturas, llevamos a cabo la comparación entre época de secas y de lluvias (Tabla 3). Con pruebas estadísticas, determinamos que no hay diferencias estadísticamente significativas de la media para cada especie entre épocas.

**Tabla 3.** Cálculos de tendencia central y dispersión de los datos para las tres especies con mayor número de capturas en las grutas, diferenciando entre época de secas y de lluvias. Con base en la prueba no paramétrica de Mann-Whitney no hay diferencias estadísticamente significativas de la media entre épocas.

<b>Especie (época)</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>	<b>Mann-Whitney</b>
<i>Mormoops megalophylla</i> (secas)	4	1.57	2.34	
<i>Mormoops megalophylla</i> (lluvias)	7	0.98	1.43	U = 11.5, $p = 0.7030$
<i>Pteronotus fulvus</i> (secas)	4	6.35	9.48	
<i>Pteronotus fulvus</i> (lluvias)	7	4.83	9.06	U = 10.0, $p = 0.5273$
<i>Balantiopteryx io</i> (secas)	4	4.58	3.59	
<i>Balantiopteryx io</i> (lluvias)	7	4.68	5.21	U = 13.0, $p = 0.9273$

Complementariamente, presentamos gráficamente el cálculo de la media de abundancia relativa para cada especie, contrastando la época de secas y de lluvias (Figura 2). Se puede observar que no hay diferencias notables en la magnitud de los cálculos entre épocas para cada especie.

**Figura 8.** Media de la abundancia relativa para las tres especies con mayor número de capturas en las grutas, diferenciando entre época de secas y de lluvias. Los bigotes indican valores mínimo y máximo.



### 11.1.2 Estructura poblacional

Para evaluar los cambios temporales en la estructura poblacional de los murciélagos de las grutas, comparamos las frecuencias de las tres especies con mayor número de capturas entre las épocas de secas y de lluvias, para las distintas categorías. En la Tabla 4, presentamos los resultados para individuos adultos, subadultos y juveniles. En este caso, agrupamos las categorías adultos y subadultos debido a la dificultad que se presentó para reconocerlos certeramente a través de la traslucidez de la epífisis metacarpal. Con base en la prueba estadística, encontramos una asociación estadísticamente significativa entre variables para los individuos juveniles de *B. io*, con mayor frecuencia en la época de lluvias.

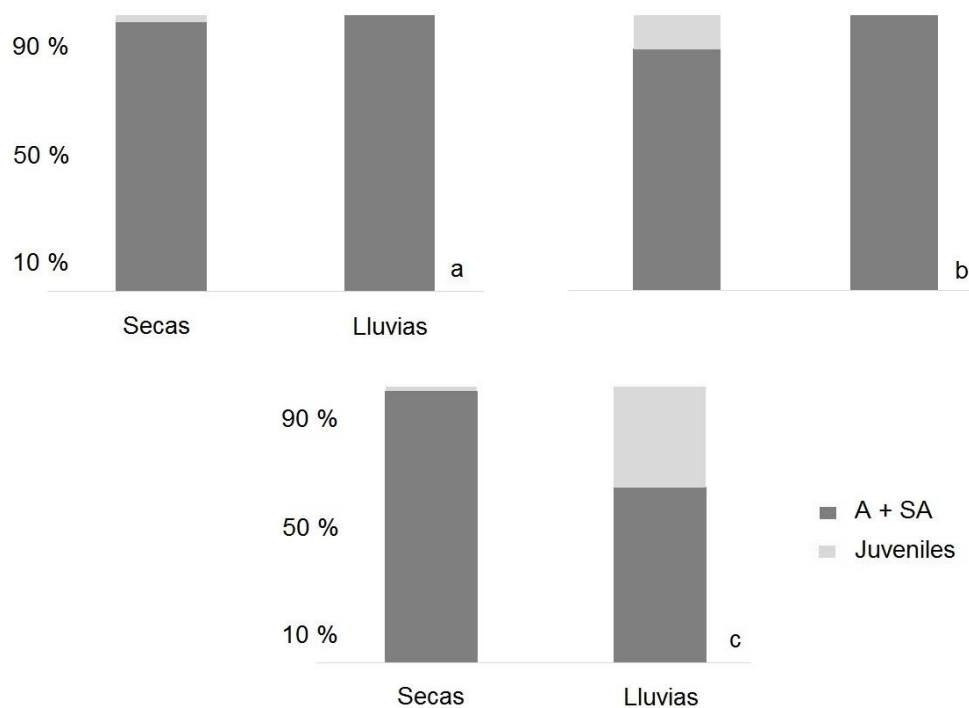
**Tabla 4.** Frecuencia de individuos adultos + subadultos (A + SA) y juveniles (J), diferenciando entre época de secas y de lluvias.

Especie (edad)	Secas	Lluvias	Total	Prueba de Fisher
<i>Mormoops megalophylla</i> (A + SA)	38	4	42	
<i>Mormoops megalophylla</i> (J)	1	0	1	
Total	39	4	43	$p = 1.0000$
<i>Pteronotus fulvus</i> (A + SA)	134	23	157	
<i>Pteronotus fulvus</i> (J)	19	0	19	
Total	153	23	176	$p = 0.1398$
<i>Balantiopteryx io</i> (A + SA)	118	65	183	
<i>Balantiopteryx io</i> (J)	2	37	39	
Total	120	102	222	$p < 0.0001$

Nota: Con base en tablas de contingencia y la prueba exacta de Fisher, con un nivel de confianza de 95% se determinó una asociación significativa entre las variables de agrupación y categóricas para el caso de *Balantiopteryx io*, con mayor frecuencia de juveniles en la época de lluvias.

Complementariamente, presentamos gráficamente los datos de adultos y subadultos (agrupados) y juveniles, para la visualización de las frecuencias en términos de porcentajes (Figura 3). En el caso de *B. io*, se puede observar un porcentaje de juveniles notablemente mayor en la época de lluvias.

**Figura 9.** Porcentaje de individuos adultos + subadultos (A + SA) y juveniles de a) *Mormoops megalophylla*, b) *Pteronotus fulvus* y c) *Balantiopteryx io*, diferenciando entre época de secas y de lluvias.



En la Tabla 5, presentamos los datos para los individuos diferenciados en hembras y machos. Con base en la prueba estadística, encontramos una asociación estadísticamente significativa entre variables en el caso de *P. fulvus*, con mayor frecuencia en la época de lluvias.

**Tabla 5.** Frecuencia de hembras (h) y machos (m), diferenciando entre época de secas y de lluvias.

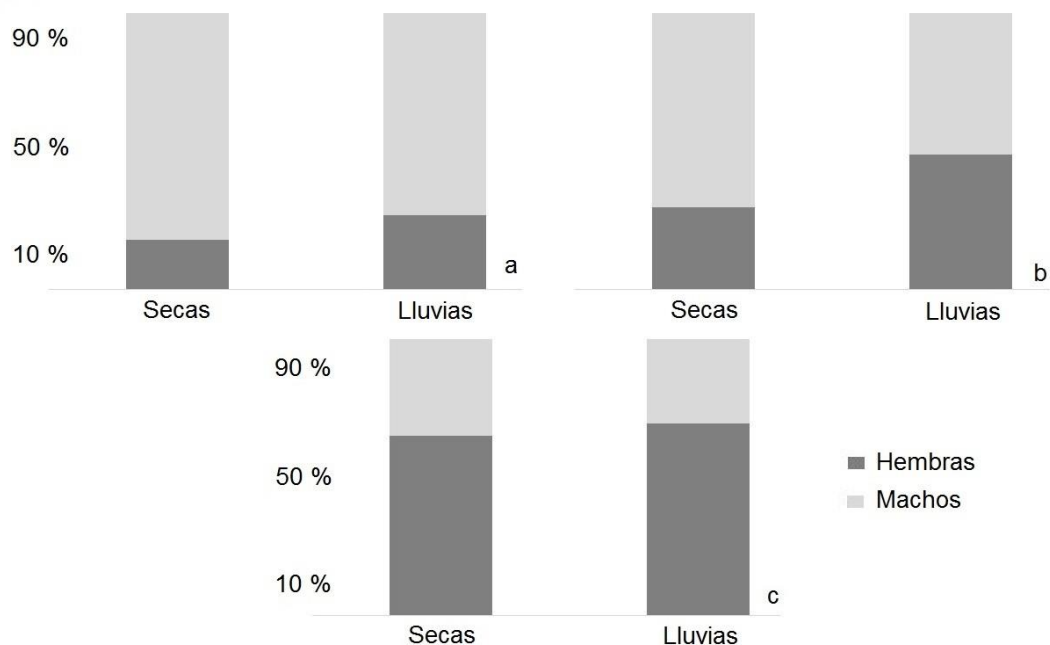
Especie (sexo)	Secas	Lluvias	Total	Prueba de Fisher
<i>Mormoops megalophylla</i> (h)	7	10	17	
<i>Mormoops megalophylla</i> (m)	32	27	59	
Total	39	37	76	$p = 0.4145$
<i>Pteronotus fulvus</i> (h)	46	97	143	
<i>Pteronotus fulvus</i> (m)	108	102	210	
Total	154	199	353	$p = 0.0004$
<i>Balantiopteryx io</i> (h)	78	127	205	
<i>Balantiopteryx io</i> (m)	42	56	98	
Total	120	183	303	$p = 0.4525$

Nota: Con base en tablas de contingencia y la prueba exacta de Fisher, con un nivel de confianza de 95% se determinó una asociación significativa entre las variables de agrupación y categóricas para el caso de *Pteronotus fulvus*, con mayor frecuencia de hembras en la época de lluvias.

Complementariamente, presentamos gráficamente los datos de hembras y machos, para la visualización de las frecuencias en términos de porcentajes (Figura 4). En el caso de *P. fulvus*, es más notable la diferencia del porcentaje de hembras entre épocas, con un valor mayor en la época de lluvias.



**Figura 10.** Porcentaje de hembras y machos de a) *Mormoops megalophylla*, b) *Pteronotus fulvus* y c) *Balantiopteryx io*, diferenciando entre época de secas y de lluvias.



En la Tabla 6, presentamos los datos para los individuos diferenciados en hembras preñadas y no preñadas. Con base en la prueba estadística, encontramos una asociación estadísticamente significativa entre variables para el caso de *P. fulvus*, con presencia de hembras preñadas únicamente en la época de lluvias.

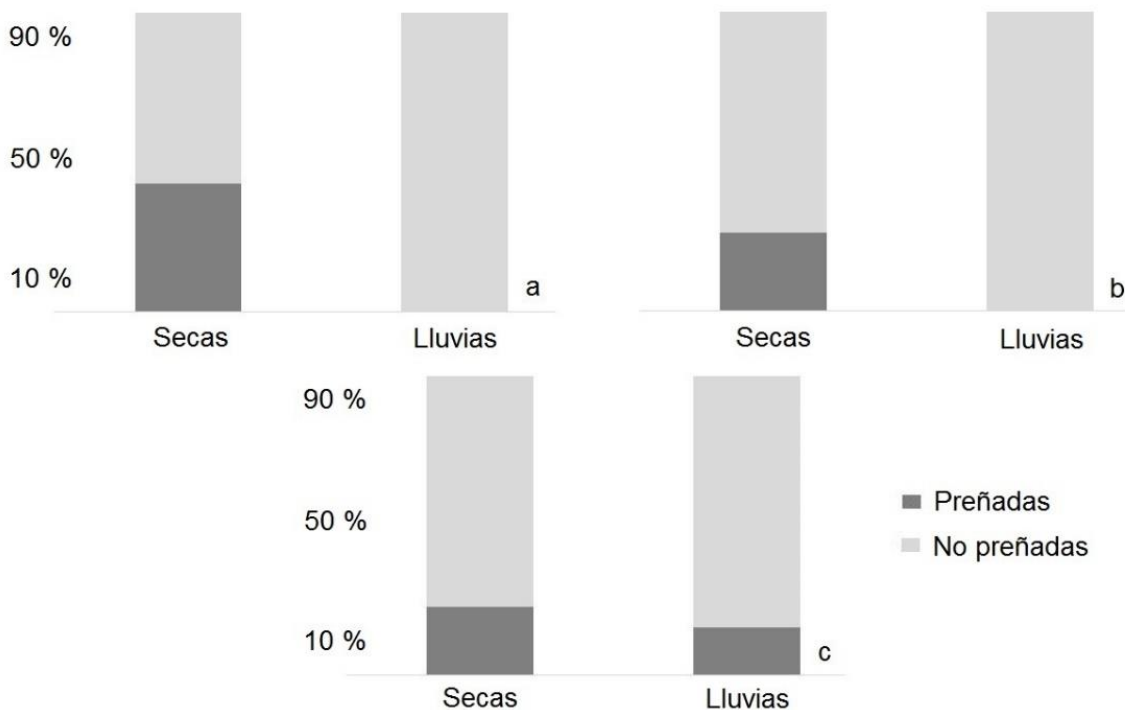
**Tabla 6.** Frecuencia de adultas preñadas (P) y no preñadas (NP), diferenciando entre época de secas y de lluvias.

Especie (estado reproductivo)	Secas	Lluvias	Total	Prueba de Fisher
<i>Mormoops megalophylla</i> (P)	3	0	3	
<i>Mormoops megalophylla</i> (NP)	4	10	14	
Total	7	10	17	p = 0.0515
<i>Pteronotus fulvus</i> (P)	12	0	12	
<i>Pteronotus fulvus</i> (NP)	34	96	130	
Total	46	96	142	p < 0.0001
<i>Balantiopteryx io</i> (P)	18	20	38	
<i>Balantiopteryx io</i> (NP)	60	105	165	
Total	78	125	203	p = 0.2669

Nota: Con base en tablas de contingencia y la prueba exacta de Fisher, con un nivel de confianza de 95% se determinaron asociaciones marginalmente significativa y significativa entre las variables de agrupación y categóricas para los casos de *Mormoops megalophylla* y *Pteronotus fulvus*, respectivamente, con presencia de hembras preñadas únicamente en la época de secas.

Complementariamente, presentamos gráficamente los datos de hembras preñadas y no preñadas, para la visualización de las frecuencias en términos de porcentajes (Figura 5). En el caso de *M. megalophylla* y *P. fulvus*, se observa que hay presencia de hembras preñadas únicamente en la época de secas.

**Figura 11.** Porcentaje de hembras preñadas y no preñadas de a) *Mormoops megalophylla*, b) *Pteronotus fulvus* y c) *Balantiopteryx io*, diferenciando entre época de secas y de lluvias.



### 11.1.3 Murciélagos en el paisaje exterior

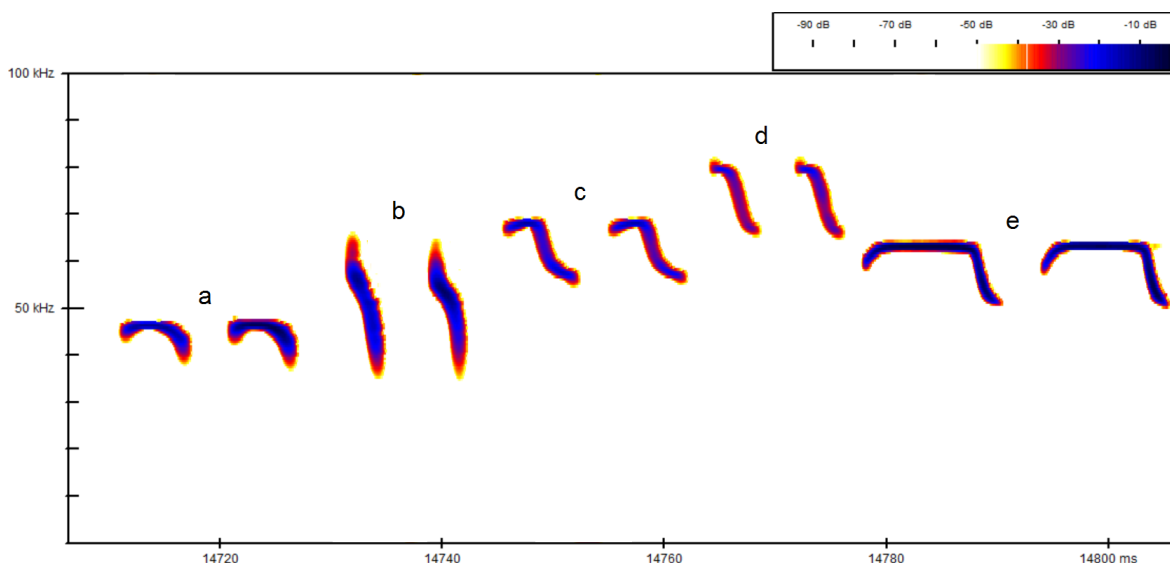
Con respecto a la determinación de la abundancia de las especies registradas en las grutas en el paisaje exterior, en la Tabla 7 se presenta el número de individuos capturados con redes de niebla en sitios con cobertura boscosa; sin embargo, los datos evidencian que dicha técnica no es adecuada para el monitoreo de estas especies.

**Tabla 7.** Número de individuos de las especies registradas en las grutas capturados en cobertura boscosa (bosque y sistemas agroforestales) en el paisaje exterior. La tasa de captura evidencia que el uso de redes de niebla no es adecuado para el monitoreo de dichas especies.

<b>Especie</b>	<b>Bosque</b>	<b>Cacao</b>	<b>Pino</b>	<b>Total</b>
<i>Mormoops megalophylla</i>	2	-	-	2
<i>Pteronotus fulvus</i>	5	1	-	6
<i>Pteronotus mesoamericanus</i>	2	-	-	2
<i>Pteronotus psilotis</i>	-	-	-	-
<i>Balantiopteryx io</i>	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>10</b>

En la Figura 6, presentamos las grabaciones de las especies registradas en las grutas, obtenidas a partir de individuos capturados y liberados en condiciones semi-controladas, como base para el monitoreo en el paisaje exterior. Entre especies se presenta una estructura (forma) particular que permite diferenciarlas entre sí, y aquellas que presentan estructura similar pueden ser diferenciadas mediante parámetros acústicos y de esta manera asignar especies a grabaciones en vuelo libre.

**Figura 12.** Espectrograma que muestra una secuencia de dos pulsos de ecolocalización para a) *Balantiopteryx io*, b) *Mormoops megalophylla*, c) *Pteronotus fulvus*, d) *P. psilotis* y e) *P. mesoamericanus*.



Nota: El eje del tiempo (abscisas) se encuentra comprimido. Para las grabaciones se utilizó un micrófono ultrasónico U256 (Pettersson Elektronik AB, Suecia) y el programa BatRecorder en un dispositivo portátil con sistema operativo Android.

En la Tabla 8, presentamos los parámetros acústicos obtenidos de las grabaciones de individuos capturados y liberados en condiciones semi-controladas. Por ejemplo, la frecuencia de máxima energía (FME) permite diferenciar congéneres como *P. fulvus* y *P. psilotis*, mientras que otras especies que muestran traslape en las frecuencias pueden ser diferenciadas con base en la estructura (forma) de sus pulsos de ecolocalización.

**Tabla 8.** Parámetros acústicos para las especies capturadas en las grutas, susceptibles de ser detectadas con micrófonos ultrasónicos. Se presenta la duración (DUR) y la frecuencia mínima (FMIN) y frecuencia máxima (FMAX) en kilohertz (kHz) obtenidas en el espectrograma (e) y en el espectro de poder (p) a -20 decibelios (dB) por debajo de la frecuencia de máxima energía (FME). Se indica el número de individuos capturados y grabados (n), y los valores corresponden a la media, seguido de la desviación estándar. *M.* = *Mormoops*, *P.* = *Pteronotus*, *B.* = *Balantiopteryx*.

Taxon	n	FMINe	FMAXe	FMINp	FMAXp	FME	DUR (ms)
<b>MORMOOPIDAE</b>							
<i>M. megalophylla</i>	4	36.1, 1.7	60.4, 2.1	38.2, 1.7	55.5, 2.0	48.1, 3.1	2.4, 0.4
<i>P. fulvus</i>	7	55.1, 1.3	73.1, 2.9	59.2, 2.4	71.5, 1.8	69.1, 2.5	4.4, 1.3
<i>P. mesoamericanus</i>	2	49.0, 1.0	64.1, 0.9	61.7, 0.7	63.4, 0.7	63.0, 0.7	16.8, 3.4
<i>P. psilotis</i>	1	63.5, 1.0	86.1, 1.9	66.2, 1.8	81.6, 1.0	78.8, 4.2	3.8, 0.7
<b>EMBALLONURIDAE</b>							
<i>B. io</i>	13	39.4, 1.3	49.4, 1.5	46.5, 1.1	48.4, 1.2	47.7, 1.2	5.4, 0.9

En la Tabla 9, presentamos los cálculos de la media de archivos efectivos con evidencia de las especies registradas en las grutas, grabadas en el paisaje exterior, como reflejo de su actividad. Diferenciamos dos condiciones: el aumento de la distancia hacia las grutas siguiendo el curso de la ribera y la comparación entre la ribera y el bosque.

**Tabla 9.** Cálculos de tendencia central y dispersión para el número de archivos efectivos con evidencia de las especies registradas en las grutas, diferenciando entre categorías de distancia en la ribera y comparación entre tratamientos (ribera y bosque).

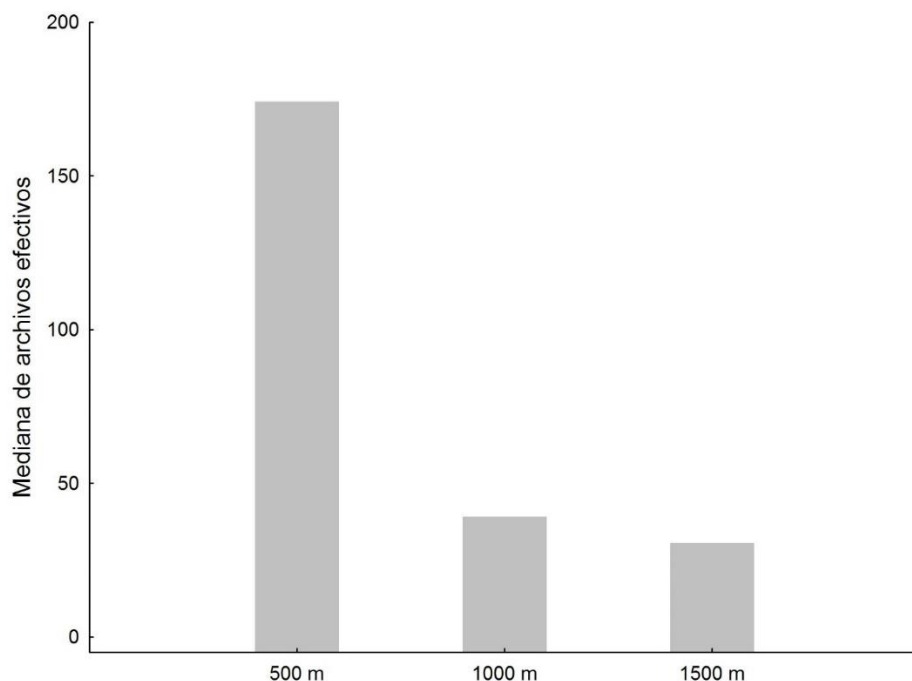
<b>Distancia</b>	<b>n</b>	<b>Mediana</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>
500 m	3	174.00	136.67	117.53
1000 m	3	39.00	120.67	151.08
1500 m	4	30.50	80.75	106.34

<b>Tratamiento</b>	<b>n</b>	<b>Mediana</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>
Ribera	6	106.50	128.67	121.38
Bosque	4	13.00	15.75	10.05

En la Figura 7, podemos observar la diferencia de la mediana de archivos efectivos con evidencia de las especies registradas en las grutas, en relación con el aumento de la distancia hacia estas últimas siguiendo el curso de la ribera. Aunque podemos observar que con el aumento de la distancia el valor de la mediana disminuye, con base en la prueba estadística aplicada, no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

**Figura 13.** Mediana del número de archivos efectivos con evidencia de las especies registradas en las grutas (centroide), para tres categorías de distancia a lo largo de la ribera: 500, 1000 y 1500 m.

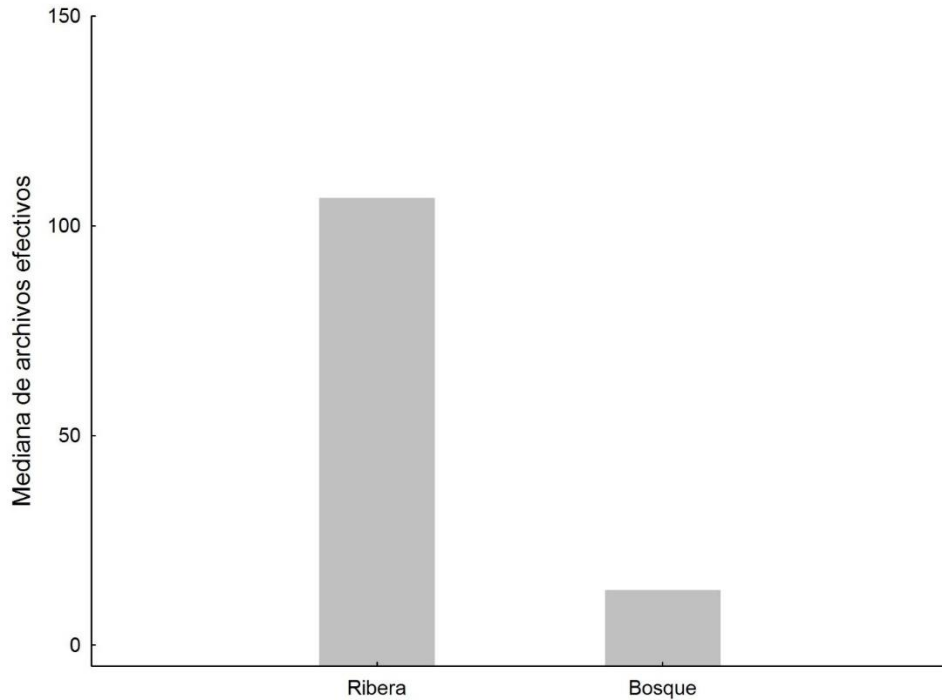


Nota: Con base en una prueba no paramétrica de comparación múltiple de medias (Kruskal-Wallis), con un nivel de confianza de 95% encontramos que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las distancias ( $KW = 0.7000$ ,  $p = 0.7643$ ). Para las grabaciones se utilizó un micrófono ultrasónico autónomo Ultramic 384K BLE (Dodotronic, Italia).

En la Figura 8, podemos observar la diferencia de la mediana de archivos efectivos con evidencia de las especies registradas en las grutas, comparando la ribera y el bosque. Aunque podemos observar que el valor de la mediana es notablemente mayor en la ribera, con base en la prueba estadística aplicada, no encontramos diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 14.** Mediana del número archivos efectivos con evidencia de las especies registradas en las grutas, para los tratamientos ribera y bosque.



Nota: Con base en una prueba no paramétrica de comparación de medias (Mann-Whitney), con un nivel de confianza de 95% encontramos que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $U = 5.000$ ,  $p = 0.1714$ ). Para las grabaciones se utilizó un micrófono ultrasónico autónomo Ultramic 384K BLE (Dodotronic, Italia).

## 11.1.4 Caracterización de la diversidad genética

Se obtuvo un total de 64 muestras de tejido de la membrana alar de *B. io*, de las cuales se logró extraer ADN, amplificar y secuenciar el fragmento de interés para la totalidad de las muestras. De las 64 secuencias obtenidas (correspondientes a 64 muestras), seis fueron excluidas para llevar a cabo los análisis de diversidad genética, después de la revisión visual de sus electroferogramas.

Al utilizar la herramienta BLASTN con las 10 secuencias seleccionadas al azar, se obtuvo un porcentaje de similitud (en función de los caracteres exactos que coinciden entre las secuencias comparadas) de 92.41 % para tres secuencias (Bio-A\_A07\_P1, Bio-A\_B08\_P1, Bio-A\_D04\_P1), 91.96 % para cuatro secuencias (Bio-A\_E01\_P1, Bio-A\_E02\_P1, Bio-A\_F01\_P1, Bio-A\_F02\_P1), 92.86 % para dos secuencias (Bio-A\_G02\_P1, Bio-A\_H04\_P1) y 92.89 % para una secuencia (Bio-A\_G04\_P1). La similitud de estas 10 secuencias fue con tres secuencias depositadas en GenBank<sup>®</sup>, la base de datos de secuencias genéticas del NIH (*National Institutes of Health*), con los números de acceso KJ438797.1, KJ438793.1 y KJ438792.1 (Tabla 10). Estos números de acceso corresponden a secuencias parciales de 311 pb de D-loop obtenidas de individuos de *B. plicata*.

**Tabla 10.** Resultados de las secuencias seleccionadas para hacer la comparación BLASTN. Se indica la longitud de cada fragmento comparado en pares de bases (pb), el valor esperado (valor-E)\* y el porcentaje de similitud con las tres secuencias con número de acceso KJ438797.1, KJ438793.1 y KJ438792.1 del GenBank®.

<b>Identificador secuencia</b>	<b>pb</b>	<b>Valor-E</b>	<b>Porcentaje de similitud</b>
Bio-A_A07_P1	305	3e <sup>-82</sup>	92.41 %
Bio-A_B08_P1	317	3e <sup>-82</sup>	92.41 %
Bio-A_D04_P1	318	3e <sup>-82</sup>	92.41 %
Bio-A_E01_P1	316	1e <sup>-80</sup>	91.96 %
Bio-A_E02_P1	317	1e <sup>-80</sup>	91.96 %
Bio-A_F01_P1	318	1e <sup>-80</sup>	91.96 %
Bio-A_F02_P1	310	1e <sup>-80</sup>	91.96 %
Bio-A_G02_P1	319	7e <sup>-84</sup>	92.86 %
Bio-A_G04_P1	306	7e <sup>-84</sup>	92.89 %
Bio-A_H04_P1	316	7e <sup>-84</sup>	92.86 %

Nota: BLASTN produce alineamientos locales entre cada pareja de secuencias, por lo que genera un valor de significación estadística para cada alineamiento. El valor-E (valor esperado) es el número de aciertos que se esperaría que ocurrieran cuando la secuencia de interés se busca en una base de datos contra secuencias aleatorias. El umbral típico para un buen valor-E de una búsqueda BLAST es  $e^{-5}$  ( $10^{-5}$ ) o inferior.

Se amplificó un fragmento de aproximadamente 350 pares de bases (pb) de la región control del ADNmt, pero, después de la edición para la remoción de tramos poco confiables, se obtuvo un fragmento de 302 pb. La alineación se llevó a cabo con 58 secuencias. Se identificaron 17 sitios segregados (S), de los cuales 15 sitios presentaron una mutación. Se identificó un total de 22 mutaciones. La diversidad de haplotipos fue de 0.608 ( $\pm 0.059$ ) y de nucleótidos de 0.00409 ( $\pm 0.00094$ ). Asimismo, se identificaron 8 haplotipos únicos (Tabla 11).

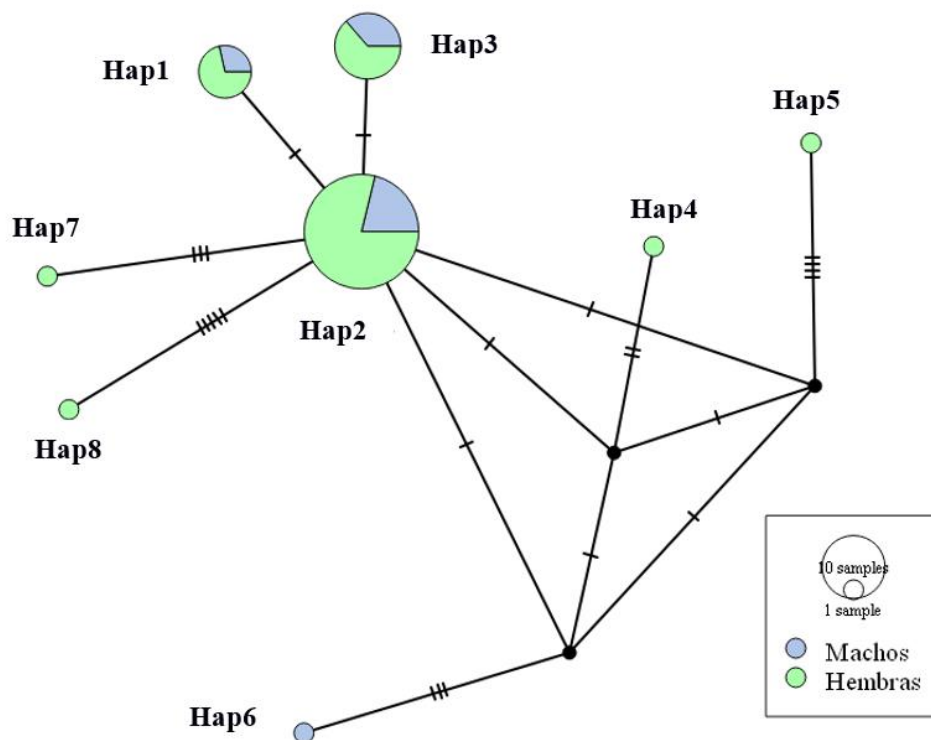
**Tabla 11.** Estimadores de diversidad genética a partir de un segmento de 302 pb de la región control de ADNmt de *Balantiopteryx io* para un total de 58 secuencias (n).

n	♀	♂	h	Hd ± s.d.	Π ± s.d.	k	S
58	42	14	8	0.608 ± 0.059	0.00409 ± 0.00094	1.23593	17
<b>D de Tajima: -2.33398**</b>							

Nota: Machos (♂) y hembras (♀). No se pudo determinar el sexo para dos individuos, pero se tomaron en cuenta para los análisis. Número de haplotipos únicos (h), diversidad de haplotipos (Hd) ± desviación estándar, diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) ± desviación estándar, número promedio de diferencias nucleotídicas (k) y sitios segregados (S). Nivel de significancia: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

En la Figura 9, se incluye la red de haplotipos que ilustra la relación entre los 8 haplotipos únicos identificados. El haplotipo 2 (Hap2) fue el más frecuente, presente en 33 individuos, de los cuales 26 eran hembras y 7 machos. Le sigue el haplotipo 3 (Hap3) presente en 11 individuos, 7 hembras y 4 machos. El haplotipo 1 presente en 7 individuos, 5 hembras y 2 machos. El resto de los haplotipos únicamente estuvieron presentes en un individuo cada uno.

**Figura 15.** Red de haplotipos por el método de unión por la mediana (*Median-Joinig*) basada en un segmento de 302 pb de la región control de ADNmt de *Balantiopteryx io*, para un total de 56 secuencias (n).



Nota: Los círculos representan un haplotipo único (Hap1, Hap2, Hap3, Hap4, Hap5, Hap6, Hap7, Hap8) y el color dentro de los círculos distingue entre machos (celeste) y hembras (verde). El tamaño de los círculos es proporcional al número de secuencias que posee determinado haplotipo. Los eventos de mutaciones simples están indicados por líneas transversales y los haplotipos no muestreados están representados por nodos de color negro.

En la Tabla 12 se incluyen algunos de los estimadores de diversidad genética calculados para todo el conjunto de datos (Tabla 11), sin embargo, aquí se presentan por sexo. Se puede apreciar que a pesar de que, para los machos se obtuvo una cantidad menor de secuencias, en relación con las hembras (así como de haplotipos únicos), sus valores de diversidad genética son ligeramente más altos que los obtenidos para las hembras.

**Tabla 12.** Estimadores de diversidad genética a partir de un segmento de 302 pb de la región control de ADNmt de *Balantiopteryx io* por sexo.

Sexo	n	Mutaciones	Hd ± s.d.	Π ± s.d.	k	S
Macho	14	6	0.692 ± 0.094	0.00422 ± 0.00155	1.275	6
Hembra	42	18	0.587 ± 0.077	0.00417 ± 0.00116	1.259	16

Nota: diversidad de haplotipos (Hd) ± desviación estándar, diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) ± desviación estándar, número promedio de diferencias nucleotídicas (k) y sitios segregados (S).

## 11.2 Discusión de resultados:

### 11.2.1 Riqueza y abundancia relativa

Se registraron ocho especies de murciélagos pertenecientes a cuatro familias: Mormoopidae (4), Phyllostomidae (2), Natalidae (1) y Emballonuridae (1). Estas representan el 7.69% de las especies reportadas para Guatemala (Kraker-Castañeda et al., 2016; Trujillo et al., 2021). Hasta ahora, solo se habían documentado parcialmente datos sobre los murciélagos que habitan la Cueva del Silvino, ubicada en Morales, Izabal. A pesar de que el número de especies encontradas es la mismo, en la Cueva del Silvino solo se identificaron dos familias, siendo Mormoopidae la predominante (5), y posteriormente Phyllostomidae (3) (Cajas-Castillo et al., 2015).

Diferentes estudios realizados en cuevas neotropicales (Salgado-Mejia et al., 2021; Moreno et al., 2006; Barbosa & Bernard, 2021) han encontrado que las familias Emballonuridae, Mormoopidae y Natalidae son recurrentes en la utilización de cuevas como refugios. La familia Mormoopidae es especialmente común en estos refugios, ya que está compuesta de especies cavernícolas estrictas y gregarias (Torres-Flores et al., 2012). Esto se observa en varios sistemas cavernarios de México (Hernández-Aguilar y Santos-Moreno, 2020). *Mormoops megalophylla*, por ejemplo, utiliza cuevas de origen kárstico de manera exclusiva y es sensible ante los cambios de temperatura en estos ambientes (Davalos et al., 2019). En contraste, las especies de la familia Phyllostomidae no dependen estrictamente de estos refugios (Torres-Flores et al., 2012).

Se capturaron siete especies en la época seca y ocho en la lluviosa. Se utilizó la trampa de arpa para el muestreo, la cual demostró ser bastante eficaz, dado que la curva de acumulación de especies se estabilizó después de 30 horas de esfuerzo. Durante la etapa de muestreo, se detectaron otras salidas alrededor de la principal, donde se observó un flujo considerable de murciélagos. Además, la trampa no cubrió completamente la entrada/salida principal de la cueva debido al cableado del sistema interior. Es posible que esto haya afectado la riqueza obtenida, ya que *N. mexicanus* fue capturado sola una vez durante la época lluviosa, al igual que *G. soricina* durante la época seca.

En este estudio, se observó que dos de las tres especies con el mayor éxito de captura fueron los mormópidos (*P. fulvus*, *M. megalophylla*) y un embalonurido (*B. io*). Los mormópidos y algunos embalonúridos como *B. io* utilizan exclusivamente cuevas como refugios (Lim, 2015).

Existe evidencia de que la composición de especies de murciélagos que habitan cuevas varía entre épocas seca y lluviosa (Torres et al., 2012). En particular, se ha observado que los mormópidos suelen ser más abundantes durante la época seca (Hernández-Aguilar y Santos-Moreno, 2020). A pesar de que la predominancia de *P. fulvus* es constante en esta como en otras cuevas de la región (Cajas-Castillo et al., 2015; Torres et al., 2012; Hernández-Aguilar y Santos-Moreno, 2020), estos murciélagos suelen ser más abundantes durante la época seca. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa en la abundancia relativa para ninguna de las tres especies durante las épocas seca y lluviosa. Esto en parte, se pudo deber a que los muestreos se comenzaron en marzo, por lo que se perdieron dos meses (enero, febrero) fundamentales para capturar estas especies.



## 11.2.2 Estructura poblacional

La precipitación juega un rol fundamental en los trópicos, ya que influye en la disponibilidad de recursos (Ferreira, 2015). Esta fluctuación de recursos durante la época seca y lluviosa afecta la abundancia y estructura de algunas poblaciones de murciélagos (Ferreira, et al., 2017). Asimismo, las condiciones internas de la cueva pueden afectar de manera directa la capacidad de las especies para reproducirse (Ávila-Flores y Medellín, 2004). En el caso de las tres especies más abundantes, la frecuencia entre adultos y juveniles, la única fue *B. io*, siendo mayor la de juveniles en época lluviosa.

En relación con la frecuencia de hembras y machos se observados durante ambas épocas, sólo se registró variación en *P. fulvus*. Esto coincide a su vez con la frecuencia de hembras preñadas observadas durante la época seca. Fenómeno que se repite en *M. megalophylla*, aunque no se encontraron diferencias significativas entre hembras y machos.

En otros estudios en cuevas, la dinámica poblacional de los mormópidos está fuertemente ligada a la época seca, donde la gestación ocurre entre febrero y abril (Hernández-Aguilar y Santos-Moreno, 2020; Torres-Flores, et al., 2012). Esto se refleja únicamente en las hembras de *P. fulvus*. Asimismo, hay evidencia que las especies de estas familias pueden abandonar algunos refugios, posterior a la época reproductiva, quedando en su mayoría machos (Torre-Flores et al., 2012).

En cuanto a los embalonúridos, se tiene conocimiento de que *B. io* es activo reproductivamente de marzo a julio (Arroyo-Cabrales y Knox, 1988), lo que reflejó en la frecuencia de edades observadas durante ambas épocas. Es importante señalar que la toma de muestras no se realizó mensualmente, lo que resultó en la falta de documentación para algunas especies en los meses críticos, como el inicio de la época seca y la época lluviosa donde no se realizó muestreo en junio y septiembre.

## 11.2.3 Murciélagos en el paisaje exterior

Los métodos de muestreo de murciélagos ha sido comprobado que están sesgados al registro de distintas familias taxonómicas (MacSwiney et al. 2008; Gregorin et al. 2022; Carvalho et al. 2022). Por ejemplo, las redes de niebla son efectivas para la captura de murciélagos filostómidos (familia Phyllostomidae), mientras que los detectores ultrasónicos son efectivos para registrar a los murciélagos insectívoros aéreos (familias Mormoopidae, Emballonuridae, Vespertilionidae y Molossidae), lo cual está determinado por rasgos de vuelo de las especies y su sistema de ecolocalización (vuelo bajo vs. vuelo alto, intensidad baja vs. intensidad baja), así como por los hábitats y los estratos verticales estudiados (MacSwiney et al. 2008; Silva Mancini et al. 2022). Estas diferencias en la capacidad de detección se reflejaron en nuestros resultados de abundancia mediante capturas y actividad mediante acústica, de las especies de murciélagos insectívoros aéreos registradas en las grutas, en el paisaje exterior: obtuvimos un número bajo de individuos con el uso de redes de niebla en distintos sitios de muestreo bajo cobertura boscosa (bosque, cacao y pino), en contraste con un número alto de archivos efectivos con evidencia acústica de estas especies.

Para llevar a cabo muestreos acústicos eficientes es esencial partir de grabaciones semi-controladas en las distintas áreas de estudio, como referencia local, debido a las dificultades que se pueden presentar para reconocer especies por la convergencia filogenética de los pulsos de ecolocalización y las variaciones geográficas potenciales entre poblaciones (Jones 2008; Jiang et al. 2015). De esta manera, los micrófonos ultrasónicos nos permitieron generar una biblioteca compuesta por recursos gráficos para la visualización del sonido a partir de técnicas de tratamiento digital de las señales, así como por caracterizaciones que contemplan distintos parámetros acústicos que pueden diferir entre las especies, de tal manera que pudimos reconocerlas en las grabaciones en el paisaje exterior.

Respecto a las comparaciones del número de archivos efectivos con evidencia de las especies registradas en las grutas, en el paisaje exterior, llevamos a cabo dos contrastes: los cambios en relación con el aumento de distancia hacia las grutas siguiendo el curso

de la ribera (la ribera parte de la entrada de las grutas y fue considerada como el centroide para definir tres categorías de distancia) y la comparación entre la ribera y el bosque. Nuestros resultados mostraron que, aunque hay diferencias de magnitud perceptibles en los valores de tendencia central del número de archivos efectivos, específicamente valores mayores en proximidad a las grutas que disminuyen con la distancia, así como un valor mayor en la ribera en comparación con el bosque, las mismas no son estadísticamente significativas. Con respecto a este último resultado, otros autores han encontrado una relación positiva entre la actividad especie-específica y los elementos lineales del paisaje (Verboom y Huitema 1997; Lentini et al. 2012; Toffoli 2016), lo cual podría ser explicado en nuestra área de estudio por la anisotropía que genera este hábitat (concepto migrado del campo de la física para definir la propiedad de conductividad de la materia) y los recursos disponibles (agua y alimento). Consideramos que es necesario continuar con estos enfoques de investigación para determinar cómo rasgos naturales pequeños y elementos lineales del paisaje pueden contribuir a la conservación de los murciélagos en ambientes con una tasa alta de pérdida de la cobertura boscosa.

## 11.2.4 Caracterización de la diversidad genética

Las secuencias obtenidas en este proyecto, a partir de la región control del ADNmt, serán las primeras secuencias de *B. io* en ser depositadas en la base de datos del GenBank®. Lo anterior quedó evidenciado con la herramienta BLASTN, en donde los valores más altos de porcentaje de similitud fueron obtenidos únicamente para secuencias parciales provenientes de individuos del congénere de *B. io*, *B. plicata*; dado que dicha base de datos no cuenta, hasta el momento, con secuencias de nuestra especie de interés, con las cuales se pudo haber llevado a cabo la comparación con BLASTN.

El genoma mitocondrial en animales vertebrados es un genoma circular cerrado, de doble cadena, con múltiples copias, de un tamaño de ~16-18 kilobases (kb) y que comprende 13 genes codificadores de proteínas involucradas en la cadena de transporte de electrones, 22 genes de ARN de transferencia, dos genes de ARN ribosómico y algunas regiones no codificantes. El contenido de genes mitocondriales está fuertemente conservado en animales, con muy pocas duplicaciones, sin intrones y regiones intergenéticas muy cortas. La región control es el único segmento no codificante en el genoma mitocondrial. Esta región controla la síntesis de ARN y ADN. En comparación con el ADN nuclear, la mayoría del ADNmt en mamíferos, especialmente la región control, tiene una tasa de evolución más rápida. Esto hace que el ADNmt sea muy variable en las poblaciones naturales, lo que puede generar alguna señal sobre la historia de las poblaciones en períodos cortos de tiempo (Galtier et al., 2009). Los estimadores de diversidad utilizados en este estudio ( $H_d$ ,  $\pi$ ,  $S$ ) son de los más utilizados para el genoma mitocondrial. Varios estudios incluyen los anteriores estimadores para determinar los niveles de diversidad genética en una población (diversidad intraespecífica), así como para hacer comparaciones entre varias poblaciones (diversidad interespecífica) para murciélagos neotropicales, especialmente, de la familia Phyllostomidae (p. ej., Ripperger et al., 2013-2014). No obstante, para la familia Emballonuridae (a la cual pertenece *B. io*), se ha optado de manera más frecuente, por el uso de microsatélites (p. ej., Nagy et al., 2010; Nagy et al., 2013). De los trabajos que utilizan el genoma mitocondrial como marcador molecular (específicamente la región control) para embalonúridos, destacamos el trabajo de Nagy et al. (2014), por incluir a *B. plicata*, una especie cogenérica de *B. io*. En dicho estudio, se reportan valores similares a los obtenidos en este proyecto. Específicamente, reportan para los machos, valores más altos en relación con las hembras. En cuanto a la prueba de Tajima, nuestros resultados muestran una desviación del modelo de la Teoría Neutral de la evolución molecular, también llamada Teoría del Equilibrio Mutación-Deriva Génica (en referencia a las dos fuerzas predominantes en ella). Cuando un conjunto de datos no se ajusta a las predicciones de la Teoría Neutral, es necesario plantear escenarios alternativos, dado que la detección de desviaciones de la hipótesis nula de neutralidad

apunta a la violación de uno o más de sus supuestos. Estas desviaciones pueden deberse a eventos selectivos y/o demográficos. Por ejemplo, barridos selectivos recientes, expansiones poblacionales después de cuellos de botella recientes, estructuración poblacional, entre otros (EGE e IEGEBA, 2018).

Una  $D$  de Tajima negativa, como en nuestro caso (-2.33398), significa un exceso de polimorfismos poco frecuentes en relación con lo esperado, lo que a su vez podría indicar una expansión del tamaño de la población, por ejemplo, después de un cuello de botella o un barrido selectivo.

## 12. Conclusiones

- a) Se documentaron 8 especies de murciélagos que habitan la cueva de Lanquín, Alta Verapaz, pertenecientes a las familias Phyllostomidae (2), Natalidae (1), Mormoopidae (4) y Emballonuridae (1). En total se capturaron 765 ejemplares, siendo las especies más abundantes *Mormoops megalophylla* (76), *Pteronotus fulvus* (353) y *Balantiopteryx io* (303). Se observaron algunas variaciones estacionales en las capturas de murciélagos en la cueva de Lanquín, aunque estas diferencias no fueron significativas entre las capturas en época seca y lluviosa, aunque si se observó variación en la estructura de edades entre las dos épocas, con los juveniles siendo mas abundantes en la época de lluvias, especialmente para *Balantiopteryx io*. el comportamiento fue distinto para las diferentes especies
- b) Las capturas de esas especies con redes de niebla en los hábitats alrededor de la cueva no fue muy productiva, ya que solo se logró la captura de 5 de las mismas especies de la cueva, y con números muy limitados, por lo que se considera que las redes de niebla no son un método adecuado para el estudio y monitoreo de murciélagos de la cueva.
- c) Se observó una mayor actividad de murciélagos, medida con detectores de murciélagos, en las áreas de ribera del río, y menor en el interior de los bosques.
- d) Los detectores de murciélagos son una herramienta poderosa y recomendada para los monitoreos de murciélagos en el área. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que, aunque hay diferencias de magnitud perceptibles en los valores de tendencia central del número de archivos efectivos, específicamente valores mayores en proximidad a las grutas que disminuyen con la distancia, así como un valor mayor en la ribera en comparación con el bosque, las mismas no son estadísticamente significativas, aunque es necesario realizar mas muestreos para eliminar el sesgo generado por la presencia de microhábitats que pueden diluir estas diferencias.
- e) Los resultados de diversidad genética para *Balantiopteryx io* muestran una desviación del modelo de la Teoría Neutral de la evolución molecular, aunque todavía no se pudo determinar la causa de esta desviación, que podría al menos parcialmente ser debida a cambios poblacionales recientes.

### 13. Referencias

- Alejos Velázquez L. P., Aragón Martínez, M. C. y Cornejo Romero, A. (2014). Extracción y Purificación de ADN. En A. Cornejo Romero, A. Serrato Díaz, B. Rendón Aguilar, M. G. Rocha Minuve (Compiladores, pp. 1-25). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I).
- Ávila-Flores, R. & Medellín, R. (2004). Ecological, taxonomic, and physiological correlates of cave use by Mexican bats. *Journal of Mammalogy*, 85(4), 675-687.
- Arita, H. (1996). The conservation of cave-roosting bats in Yucatán, México. *Biological Conservation*, 76(1996), 177-185. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(95\)00105-0](https://doi.org/10.1016/0006-3207(95)00105-0)
- Bandelt, H., Forster, P. & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Barbosa, E. & Bernard, E. (2021). Morcegos cavernícolas do carste arenítico do Parque Nacional do Catimbau, nordeste do Brasil. *Mastozoología Neotropical*, 28(2), 1-17.
- Burneo, S. F., Proaño, M. D. y Tirira, D. G. (2015). *Plan de acción para la conservación de los murciélagos del Ecuador*. Quito: Programa para la Conservación de los Murciélagos del Ecuador and Ministerio del Ambiente del Ecuador. [Archivo PDF]. [https://www.researchgate.net/profile/DiegoTirira/publication/309459149\\_Plan\\_de\\_accion\\_para\\_la\\_conservacion\\_de\\_los\\_murcielagos\\_del\\_Ecuador\\_Accion\\_plan\\_for\\_conservation\\_of\\_bats\\_of\\_Ecuador/links/58115b6608aea04bbcbd5431/Plandeaccionparalaconservacion-de-los-murcielagos-del-Ecuador-Accion-plan-for-conservation-of-bats-ofEcuador.pdf](https://www.researchgate.net/profile/DiegoTirira/publication/309459149_Plan_de_accion_para_la_conservacion_de_los_murcielagos_del_Ecuador_Accion_plan_for_conservation_of_bats_of_Ecuador/links/58115b6608aea04bbcbd5431/Plandeaccionparalaconservacion-de-los-murcielagos-del-Ecuador-Accion-plan-for-conservation-of-bats-ofEcuador.pdf)
- Cajas-Castillo, J., Echeverría, J. y Trujillo, L. (2015). Murciélagos del Parque Nacional Cuevas del Silvino, Izabal, Guatemala. *Boletín Red Latinoamericana Conservación Murciélagos*, 6(1), 4-8.
- Cajas-Castillo, J. O., Kraker-Castañeda, C., López-Gutiérrez, J. E., Pérez-Consuegra, S. G. & Grajeda-Godínez, A. L. (2015). *Choeronycteris mexicana* in Guatemala: temporal



- occurrence, feeding and reproductive activity. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, (86), 835-838. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmb.2015.07.010>
- Carvalho, W. D., Miguel, J. D., da Silva Xavier, B., López-Baucells, A., de Castro, I. J., Hilário, R. R., de Toledo, J. J., Rocha, R. & Palmeirim, J. M. (2022). Complementarity between mist-netting and low-cost acoustic recorders to sample bats in Amazonian rainforests and savannahs. *Community Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s42974-022-00131-5>
- Castañeda, C. (2008). Diversidad de ecosistemas de Guatemala. En *Guatemala y su biodiversidad: un enfoque histórico, cultural, biológico y económico*, 181-229. Guatemala: Oficina Técnica de Biodiversidad, Consejo Nacional de Áreas Protegidas.
- Chuvieco, E. (2008). *Teledetección ambiental: la observación de la Tierra desde el Espacio*. (3ª ed.). Editorial Ariel.
- Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP). (2009). *Lista de Especies Amenazadas de Guatemala*. Documento Técnico No. 67. [Archivo PDF]. <https://issuu.com/conap24/docs/m400>
- Cruz-Salazar, B., Ruiz-Montoya, L., Mendoza-Sáenz, V. H., Riechers-Pérez, A. y García-Bautista, M. (2018). Genetic Diversity of Tropical Bats and Its Relationship with Ecological Role in a Tropical Semievergreen Rain Forest in El Ocote Biosphere Reserve, Chiapas, Mexico. *Tropical Conservation Science*, 11, 1-21. <https://doi.org/10.1177/1940082917752473>
- Departamento de Ecología, Genética y Evolución (EGE) e Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires (IEGEBEA). (2020). *Teoría Neutralista (Módulo 2). Guía de trabajos prácticos y seminarios*. Evolución. Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. <https://www.ege.fcen.uba.ar/wp-content/uploads/2014/05/MODULO-2-TEOR%C3%8DA-NEUTRALISTA-2C-20201.pdf>
- Eastman, J. R. (2012). *IDRISI selva tutorial: manual versión 17*. Clark Labs, Clark University.
- Espinosa, R. (29 de junio de 2020). *Murciélagos cargan con la culpa de la pandemia*. La Prensa. <https://www.prensa.com/imprensa/vivir/murcielagos-cargan-con-la-culpa-de-la-pandemia/>
- Estrada, A. (19 de mayo de 2020). *Murciélagos muertos en Mérida: ¿un ataque a causa del Covid-19?* Diario de Yucatán. <https://www.yucatan.com.mx/merida/murcielagos-muertos-en-merida-un-ataque-a-causa-del-covid-19>

- Estrada, C. G., Damon, A., Hernández, C. S., Pinto, L. S. y Núñez, G. I. (2006). Bat diversity in montane rainforest and shaded coffee under different management regimes in southeastern Chiapas, Mexico. *Biological Conservation*, 132(3), 351-361.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.04.027>
- Ferrarezzi, H. y Gimenez, E. (1996). Systematic patterns and the evolution of feeding habits in Chiroptera (Archonta: Mammalia). *Journal of Integrative and Comparative Biology*, 1, 75-94.
- Ferreira, D., Rocha, R., López, A., Farneda, F., Carreiras, J., Palmeirim, J. & Meyer, C. (2017). Season-modulated responses of Neotropical bats to forest fragmentation. *Ecology and Evolution*, 7, 4059-4071.
- Ferreira, D. (2015). Effects of seasonality on responses of Neotropical bats to local and landscape-scale attributes in fragmented landscape (Tesis de Maestría). Universidad de Lisboa.
- Frankham, R. (2005). Genetics and extinction. *Biological Conservation*, 126, 131-140.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.05.002>
- Frankham, R., Ballou, J. & Briscoe, D. (2002). Genetic diversity (Chapter 3). *Introduction to conservation genetics* (45-71). Cambridge University Press.
- Freeland, J. R., Kirk, H., & Petersen, S. (2011). Molecular markers in ecology (2nd. Ed.). *Molecular ecology* (29-52). Wiley-Blackwell.
- Frick, W., Kingston, T. & Flanders, J. (2019). A review of the major threats and challenges to global bat conservation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1469(2020), 5-25.  
<https://doi.org/10.1111/nyas.14045>
- Fuentes-Montemayor, E., Goulson, D., Cavin, L., Wallace, J.M. & Park, K.J. (2013). Fragmented woodlands in agricultural landscapes: The influence of woodland character and landscape context on bats and their insect prey. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 172, 6-15.  
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.03.019>
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S. & Hurst, G. D. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, 18, 4541-4550.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04380.x>

- Gregorin, R., Tahara, A., Mancini, M., Lobão, K., Oliveira, L., & Tavares, V. (2022). Mixed sampling methods reveal elevated bat richness in a semideciduous Atlantic Forest remnant. *Acta Chiropterologica*, 24(1), 139-150.
- Hadjimitsis, D. G. & Themistocleous, K. (2008). *The importance of considering atmospheric correction in the pre-processing of satellite remote sensing data intended for the management and detection of cultural sites: a case study of the Cyprus area*. 14th International Conference on Virtual Systems and Multimedia (VSMM).
- Hernández-Aguilar, I. y Santos-Moreno, A. (2020). Bat diversity in three roots in the Coast region of Oaxaca, México. *Neotropical Biology and Conservation*, 15(2), 135-152.  
<https://doi.org/10.3897/neotropical.15.e50136>
- Hernández-Aguilar, H. & Santos-Moreno, A. (2020). Reproduction and population of cave-dwelling bats in Costa of Oaxaca, México. *Revista de Biología Tropical*, 68(3), 785-802.
- Höglund, J. (2009). Genetic diversity in changing environments (Chapter 4). *Evolutionary Conservation Genetics* (60-80). Oxford University Press.
- Hughes, R., Inouye, B., Johnson, M., Underwood, N. & Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, 11, 609-623. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x>
- INGUAT. (2013). *Guía de espeleoturismo de Las Verapaces, Paraíso natural*. Gobierno de Guatemala.
- Jiang, T., Wu, H. & Feng, J. (2015). Patterns and causes of geographic variation in bat echolocation pulses. *Integrative Zoology*, 10(3), 241-246. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12129>
- Jiménez-Valverde, A. y Hortal, J. (2003). Las curvas de acumulación de especies y la necesidad de evaluar la calidad de los inventarios biológicos. *Revista Ibérica de Aracnología*, 8, 151-161.
- Jones, G. (2008). Bat echolocation calls: adaptation and convergent evolution. *Proceedings of the Royal Society B*, 274(1612), 905-912. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.0200>
- Kraker, C., Lorenzo, C., Bolaños, J., Oryiz, D. y Leiva, E. (2021). *Los murciélagos filostómidos de Chiapas, México y Guatemala. Guía fotográfica y geográfica*. El Colegio de la Frontera Sur.
- Kraker, C. y Pérez, S. (2012). Detección ultrasónica de murciélagos insectívoros en cafetales de la Antigua Guatemala, Guatemala. *Revista Científica, Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas*, 22(1), 43-53.

- Kraker-Castañeda, C., Cajas-Castillo, J. O. & Lou, S. (2016). Opportunistic feeding by the little yellow-shouldered bat *Sturnira lilium* (Phyllostomidae, Stenodermatinae) in northern Guatemala: a comparative approach. *Mammalia*, 80(3), 349-352.  
<http://dx.doi.org/10.1515/mammalia-2014-0139>
- Kraker-Castañeda, C. y Echeverría-Tello, J. L. (2012). Riqueza de especies y variabilidad trófica de murciélagos en zonas de riesgo de rabia de origen silvestre en Izabal, Guatemala. *Therya*, 3(1), 87-99. <http://dx.doi.org/10.12933/therya-12-57>
- Kraker- Castañeda, C., Ku-Peralta, W. & Santos-Moreno, A. (2020). Missing something? Importance of measurement criteria of acoustic parameters in the analysis of bat recordings. *Journal of Bat Research and Conservation*, 13(1), 94-99.  
<https://doi.org/10.14709/BarbJ.13.1.2020.15>
- Kraker-Castañeda, C. y Pérez-Consuegra, S. G. (2011). Contribución de los cafetales bajo sombra en la conservación de los murciélagos en la Antigua Guatemala, Guatemala. *Acta Zoológica Mexicana* (n. s.), 27(2), 291-303. <http://dx.doi.org/10.21829/azm.2011.272754>
- Kraker-Castañeda, C., Pérez, S. G., Cajas-Castillo, J. O. y Echeverría-Tello, J. L. (2016). Lista actualizada de los murciélagos (Mammalia, Chiroptera) de Guatemala. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(2), 409-416. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmb.2015.10.005>
- Koleff, P. y Urquiza-Haas, T. (2011). Conservación de la diversidad terrestre: planeación, reflexiones y lecciones aprendidas. En P. Koleff, T. Urquiza-Haas (Coordinadoras). *Planeación para la conservación de la biodiversidad terrestre en México: retos en un país megadiverso* (173-201). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) y Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP).
- Kunz, T. H. (1982). Roosting ecology of bats. In *Ecology of bats*, (ed.). T. H. Kunz. Plenum Press, New York, pp. 1-55.
- Kunz, T. H. (2013). *Ecology of bats*. Springer Science & Business Media.
- Kunz, T. H., Anthony, E. L. & Ramage III, W. T. (1977). Mortality of little brown bats following multiple pesticide applications. *The Journal of Wildlife Management*, 476-483.  
<http://dx.doi.org/doi.org/10.2307/3800519>
- Lacki, M. J., Hayes, J.P. & Kurta, A. (eds.) (2007). *Bats in Forests: Conservation and Management*. The Johns Hopkins University Press.

- Lamy, T. Laroche, F., David, P., Massol, F. & Jarne, P. (2017). The contribution of species-genetic diversity correlations to the understanding of community assembly rules. *Oikos*, 126, 759-771. <https://doi.org/10.1111/oik.03997>
- Leigh, J. W. & Bryant, D. (2015). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9),1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- Lentini, P. E., Gibbons, P., Fischer, J., Law, B., Hanspach, J. & Martin, T. G. (2012). Bats in a Farming Landscape Benefit from Linear Remnants and Unimproved Pastures. *PLOS ONE* 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048201>
- Lim, B., Engstrom, M., Simmons, N. & Dunlop, J. (2003). Phylogenetics and biogeography of least sac-winged bats (*Balantiopteryx*) based on morphological and molecular data. *Mammalian Biology*, 69(4), 225-237. <https://doi.org/10.1078/1616-5047-00139>
- López-Wilchis, R., Méndez-Rodríguez, A., Juste, J., Serrato-Díaz, A., Rodríguez-Gómez y Guevara-Chumacero, L. M. (2021). Genetic Consequences of Forest Fragmentation in a Widespread Forest Bat (*Natalus mexicanus*, Chiroptera: Natalidae). *Diversity*, (13), 140. <https://doi.org/10.3390/d13040140>
- MacSwiney, M. C., Clarke, F. M. & Racey, P. A. (2008). What you see is not what you get: the role of ultrasonic detectors in increasing inventory completeness in Neotropical bat assemblages. *Journal of Applied Ecology*, 45, 1364-1371. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2008.01531.x>
- Medellín, R. (1993). Estructura y diversidad de una comunidad de murciélagos en el trópico húmedo mexicano. En R.A. Medellín, y G. Ceballos (Eds.). *Avances en el estudio de los mamíferos de México* (pp. 353-354). México: Asociación Mexicana de Mastozoología, A.C.
- Medellín, R., Arita, H. y Sánchez, O. (2007). *Identificación de los murciélagos de México, clave de campo*. Instituto de Ecología, UNAM.
- McCarthy, T. J., & Pérez, S. G. (2006). Land and freshwater mammals of Guatemala: faunal documentation and diversity. *Biodiversidad de Guatemala*, 1, 625-674.
- Mickleburgh, S., Hutson, A. y Racey, P. (2002). A review of the global conservation status of bats. *Oryx*, 36,18-34. <https://doi.org/10.1017/S0030605302000054>

- Moreno, E., Arita, H. & Solis, L. (2006). Morphological assembly mechanisms in Neotropical bat assemblages and assembles within a landscape. *Oecología*, 149(1), 133-140.
- Muylaert, R. L., Stevens, R. D. & Ribeiro, M. C. (2016). Threshold effect of habitat loss on bat richness in cerrado-forest landscape. *Ecological Applications*, 26(6), 1854-1867.  
<https://doi.org/10.1890/15-1757.1>
- Nagy, M., Günther, L., Knörnschild, M. & Mayer, F. (2013). Female-biased dispersal in a bat with a female-defence mating strategy. *Molecular Ecology*, 22(6), 1733–1745. DOI:  
<https://doi.org/10.1111/mec.12202>
- Nagy, M., Knörnschild, M., Günther, L. & Mayer, F. (2011). Dispersal and social organization in the Neotropical Grey sac-winged bat *Balantiopteryx plicata*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 68, 891-901. <https://doi.org/10.1007/s00265-014-1702-2>
- Nagy, M., Ustinova, J. & Mayer, F. (2010). Characterization of eight novel microsatellite markers for the neotropical bat *Rhynchonycteris naso* and cross-species utility. *Conservation Genetics Resources*, 2, 41-43 (2010). <https://doi.org/10.1007/s12686-009-9139-z>
- Nei, M. & Li, W.-H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), 5269-5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>
- Pech-Canche, J. M., MacSwiney C. y Estrella, E. (2010). Importancia de los detectores ultrasónicos para mejorar los inventarios de murciélagos. *Therya*, (1), 227-234.  
<https://doi.org/10.12933/therya-10-17>
- Pollock, T., Moreno, C. R., Sánchez, L., Ceballos-Vasquez, A., Faure, P. A. & Mora, E. C. (2016). Wound healing in the flight membranes of wild Big Brown Bats. *The Journal of Wildlife Management*, 80(1), 19–26. [https://doi.org/10.1002/jwmg.997open\\_in\\_new](https://doi.org/10.1002/jwmg.997open_in_new)
- Promega Corporation. (2013). *Technical Manual. ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System*.  
[https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/reliaprep-gdna-tissue-miniprep-system-protocol.pdf?rev=237f26e6d17c4dfcbddb7ecfb8c1779f&sc\\_lang=en](https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/reliaprep-gdna-tissue-miniprep-system-protocol.pdf?rev=237f26e6d17c4dfcbddb7ecfb8c1779f&sc_lang=en)
- Reid, F. (2009). *A field guide to the mammals of Central America and Southeast Mexico*. Oxford University Press.

- RELCOM. (2010). *Estrategias para la conservación de los murciélagos de Latinoamérica y el Caribe*. [Archivo PDF]. <http://www.relcomlatinoamerica.net/images/PDFs/Estrategia.pdf>
- Ripperger SP, Tschapka M, Kalko EKV, Rodriguez-Herrera B, Mayer F. 2013. Life in a mosaic landscape: anthropogenic habitat fragmentation affects genetic population structure in a frugivorous bat species. *Conservation Genetics*, 14:925-934. <https://doi.org/10.1007/s10592-012-0434-y>
- Ripperger, S. P., Tschapka, M., Kalko, E. K. V., Rodriguez-Herrera, B. & Mayer, F. (2014). Resisting habitat fragmentation: high genetic connectivity among populations of the frugivorous bat *Carollia castanea* in an agricultural landscape. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 185:9-15. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.12.006>
- Rodríguez-Herrera, B. y Sánchez, R. (2015). *Estrategia centroamericana para la conservación de los murciélagos*. Universidad de Costa Rica. [Archivo PDF]. <http://35.196.33.155/bitstream/handle/11606/698/Estrategia%20centroamericana%20para%20la%20conservaci%3%b3n%20de%20los%20murci%3%a9lagos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E. y Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP v6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Molecular Biology Evolution*, 34(12), 3299-3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Salgado-Mejia, F. López-Wilchis, R., Guevara, L., Valverde-Padilla, P., Martínez, P., Porto-Ramírez, S., Rojas-Martínez, I. y Sámano-Barbosa, G. (2021). Characterization of assemblages in neotropical cave dwelling bats based on their diet, wing morphology, and flight performance. *Therya*, 12(3), 435-447.
- Santos-Moreno, A. & Hernández-Aguilar, I. (2020). Estimation a bat colony size even with low recapture rates: an example based on the Cormack-Jolly-Seber model in Oaxaca, México. *Revista de Biología Tropical*, 69(1), 231-244. <https://doi.org/10.15517/rbt.v69i1.38777>
- Secretaría de Planificación y Programación de la Presidencia (Segeplan). (2014). *Plan de desarrollo municipal de Lanquín, Alta Verapaz*. Gobierno de Guatemala.

- Segura-Trujillo, C. A. y Navarro-Pérez, S. (2010). Escenario y problemática de conservación de los murciélagos (Chiroptera) cavernícolas del Complejo Volcánico de Colima, Jalisco-Colima, México. *Therya*, 1(3), 189-206. <https://doi.org/10.12933/therya-10-23>
- Scribner, K. T., Meffe, G. K., & Groom, M. J. (2006). Conservation Genetics: the use and importance of genetic information. In M. J. Groom, G. K. Meffe, C. R. Carroll (Editors). *Principles of Conservation Biology* (3rd ed., 375-415). Sinauer Associates.
- Segeplan. (2014). Plan de desarrollo municipal de Lanquín, Alta Verapaz.
- Silva Mancini, M. C., Hintze, F., de Souza Laurindo, R., de Macêdo Mello, R. & Gregorin, R. (2022). Tradition vs. innovation: comparing bioacoustics and mist-net results to bat sampling. *Bioacoustics*, 31(5), 575-593. <https://doi.org/10.1080/09524622.2021.2008494>
- Simmons, N. B. (2005). An Eocene big bang for bats. *Science*, 307(5709), 527-528. <https://doi.org/10.1126/science.1108871>
- Simmons, N.B. y A.L. Cirranello. (2020). *Bat Species of the World: A taxonomic and geographic database*.
- Sikes, R.S. y American Society of Mammalogists. (2016). 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogist for the use of wild animals in research and education. *Journal of Mammalogy*, 97(3), 663–688. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyw078>.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- Toffoli, R. (2016). The importance of linear landscape elements for bats in a farmland area: the influence of height on activity. *Journal of Landscape Ecology*, 9(1), 49-62. <https://doi.org/10.1515/jlecol-2016-0004>
- Torres-Flores, J. W. & Santos-Moreno, A. (2017). Inventory, Features, and Protection of Underground Roosts Used by Bats in Mexico. *Acta Chiropterologica*, 19(2), 439-454. <https://doi.org/10.3161/15081109ACC2017.19.2.019>
- Torres-Flores, J., López-Wilchis, R. y Soto-Castruita, A. (2012). Dinámica poblacional, selección de sitios de percha y patrones reproductivos de algunos murciélagos cavernícolas en el oeste de México. *Revista de Biología Tropical*, 60(30), 1369-1389.



- Trajano, E. (1995). Protecting caves for the bats or bats for the caves? *Chiroptera Neotropical*, 1(2), 19-21. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-383832-2.00092-x>
- Trujillo, L., Fong, R. y Pérez, S. (2020). Filling gaps in the distribution of the four free-tailed bat species of the genus *Nyctinomops* Miller, 1902 (Mammalia, Chiroptera, Molossidae), with three new records for Guatemala. *Check List*, 16, 1747. <https://doi.org/10.15560/16.6.1747>
- Trujillo, L. A., Barahona-Fong, R., Kraker-Castañeda, C., Medina-Fitoria, A., Hernández, J. & Pérez, S. G. (2021). Noteworthy records of bats of the genus *Eumops* Miller, 1906 from Guatemala: first confirmed record of Underwood's Bonneted Bat, *Eumops underwoodi* Goodwin, 1940 (Mammalia, Chiroptera, Molossidae), in the country. *Check List*, 17(4): 1147–1154. <https://doi.org/10.15560/17.4.1147>
- Urbina Torres, F., Romo del Vivar Álvarez, C.A., y González-García, F. (2015). Coleccionista de sonidos de aves. *Hypatia*, (51). <https://revistahypatia.org/bioacustica-51.html>
- Verboom, B. & Huitema, H. (1997). The importance of linear landscape elements for the pipistrelle *Pipistrellus pipistrellus* and the serotine bat *Eptesicus serotinus*. *Landscape Ecology*, 12, 117-125. <https://doi.org/10.1007/BF02698211>
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7(1-2), 203-214. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>.

## 14. Aspectos éticos y legales

La presente investigación se realizó bajo la Licencia de Investigación 00719-B y Licencia de Colecta No. 01003 (Titular Sergio G. Pérez) del Consejo Nacional de Áreas Protegidas, con vigencia de 2020 a 2023. Los protocolos siguieron las recomendaciones del American Society of Mammalogists para el uso de animales silvestres en la investigación y educación (Sikes & ASM, 2016).

## 15. Vinculación

Se establecieron relaciones de colaboración entre el Laboratorio Molecular de Biodiversidad, el Programa para la Conservación de Murciélagos de Guatemala (PCMG), la Sociedad Zoológica de Londres (la cual funge como contrapartida de esta propuesta de investigación), el Instituto Guatemalteco de Turismo (INGUAT), el Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP, extensión Cobán), la Municipalidad de Lanquín y con las comunidades Q'eqchi', a través de sus líderes. El trabajo colaborativo permitió concretar acciones de conservación en las grutas y su paisaje exterior. Asimismo, fortalecerá la capacidad y permitirá la continuidad del monitoreo de las poblaciones de murciélagos que utilizan las grutas como refugio.

## 16. Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual

Se compartieron los resultados de forma técnica a través de un documento en formato digital con los administradores del Parque Nacional Rutas de Lanquín y se hizo la difusión y resultados del proyecto a través de la participación en reuniones y talleres locales en Lanquín, Alta Verapaz. También se hizo la difusión de los resultados preliminares en congresos especializados en la conservación de los murciélagos en México. Asimismo, se incorporarán los datos recolectados en el Portal de Biodiversidad de Guatemala, SNIBgt y GenBank®. También se generó material de divulgación para distribuir en las comunidades; específicamente, el diseño de un afiche con información de las especies que utilizan las grutas como refugio, su importancia y amenazas, así como un pequeño diorama conteniendo una piel de estudio de *Mormoops megalophylla* especialmente preparada para ser expuesta en el área pública del Parque Nacional Rutas de Lanquín.

## 17- Aporte de la propuesta de investigación a los ODS:

Se trata de un enfoque pionero, que contempló varias disciplinas científicas y herramientas técnicas para lograr sus objetivos, que podrá ser replicado en otras regiones del país. Provee parámetros ecológicos y genéticos para el monitoreo y evaluación de poblaciones de murciélagos de interés para conservación, con un enfoque a largo plazo. La información que se generó permitirá identificar acciones de conservación, que podrán integrarse al manejo sostenible del área y ser contrastadas en una línea de tiempo a través de las respuestas poblacionales. De esta manera, se contribuye con el Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) 15, correspondiente a “Vida de ecosistemas terrestres”.

# Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación -DIGI-

## 18. Orden de pago final

Nombres y apellidos	Categoría (investigador /auxiliar)	Registro de personal	Procede pago de mes (Sí / No)	Firma
----	---	---	---	---

## 19. Declaración del Coordinador(a) del proyecto de investigación

El Coordinador de proyecto de investigación con base en el *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación*, artículos 13 y 20, deja constancia que el personal contratado para el proyecto de investigación que coordina ha cumplido a satisfacción con la entrega de informes individuales por lo que es procedente hacer efectivo el pago correspondiente.

<b>Dr. Sergio Guillermo Pérez Consuegra</b> Coordinador del proyecto	<b>Firma</b>
Fecha: 22/febrero/2023	

# Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación -DIGI-

## 20. Aval del Director(a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario

De conformidad con el artículo 13 y 19 del *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación* otorgo el aval al presente informe mensual de las actividades realizadas en el proyecto (escriba el nombre del proyecto de investigación) en mi calidad de (indique: Director del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario), mismo que ha sido revisado y cumple su ejecución de acuerdo a lo planificado.

<b>Vo.Bo. Dra. Eunice Enríquez Cotton</b> <b>Directora, Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas -IIQB-, Fac. CC. QQ. y Farmacia, USAC</b>	<b>Firma</b>
Fecha: 22/febrero/2023	

## 21. Visado de la Dirección General de Investigación

<b>Vo.Bo. MSc. Andrea Eunice Rodas Morán</b> <b>Coordinadora del Programa Universitario de Investigación en Recursos Naturales y Ambiente</b>	<b>Firma</b>
Fecha: 22/febrero/2023	

<b>Vo.Bo. Ing. Julio Rufino Salazar</b> <b>Coordinador General de Programas Universitarios de Investigación</b>	<b>Firma</b>
Fecha: 22/febrero/2023	