

ISSN L2992-6424

Revista Científica

 **VIDA**
NATURAL

Vol. 1 No. 2, enero-junio, 2024.



Universidad Autónoma de Chiriquí



UNACHI
Hombre y cultura para el porvenir

Universidad Autónoma de Chiriquí

Ciudad Universitaria, David, Chiriquí
República de Panamá
REVISTAS.UNACHI.AC.PA

AUTORIDADES SUPERIORES
Rectora

Mgtr. Etelvina de Bonagas

Vicerrector Académico

Mgtr. Jorge Bonilla

Vicerrector de Investigación y Posgrado

Dr. Pedro González

Vicerrectora Administrativa

Dra. Rosa Moreno

Vicerrectora de Asuntos Estudiantiles

Dra. Rosemary Hernández

Vicerrectora de Extensión

Dra. Olda Cano

Secretario General

Mgtr. Pedro Rojas

REVISTA CIENTÍFICA VIDA NATURAL

Jefe Editorial

Diana Gómez

Vicerrectoría de Investigación y Posgrado
Universidad Autónoma de Chiriquí

Comité Editorial

Dr. Eyvar E. Rodríguez Quiel

Facultad de Ciencias Naturales y Exactas
Universidad Autónoma de Chiriquí

Dr. Alonso Santos Murgas

Facultad de Ciencias Naturales y Exactas
Universidad de Panamá

Dra. Edilia de la Rosa Manzano

Instituto de Ciencias aplicadas
Universidad de Tamaulipas.

Dra. Soizic Gibeaux

Université de Bretagne Sud

Ficha Técnica:

Páginas: 70

Diseño y diagramación: Gida Guerra y Tomás Herrera

Volumen 1 Número 2

Páginas

Publicación Digital

revista.vidanatural@unachi.ac.pa

Portada

"*Oxyrhopus petolaris*"

Contraportada del libro

Las serpientes de Panamá: venenosas y más
comunes no venenosa

2024

Contenido

- Genotipificación de aislados del complejo
Mycobacterium tuberculosis provenientes
del Hospital Materno Infantil José
Domingo de Obaldía, provincia de Chiriquí
1 - 17
- Efecto de la lateralización cerebral en el
comportamiento de aprendizaje de
Poecilia reticulata
18 - 28
- The biometry of *Cardisoma crassum*
(Brachyura: Gecarcinidae) from two
folkloric festivals in Veraguas, Panama
29 - 45
- White-nosed Coati (*Nasua narica*) a
predator of the Yellow-headed Caecilian
(*Oscacelia ochrocephala*) in Panama
46 - 52
- First record of *Oxyrhopus occipitalis*
(Wied-Neuwied, 1824) in Central America
53 - 62
- The critically endangered Amphibians
from the small Escudo de Veraguas Island
Panama
63 - 70



Genotipificación de aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis* provenientes del Hospital Materno Infantil José Domingo de Obaldía, provincia de Chiriquí
Genotyping of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex from the Hospital Materno Infantil José Domingo de Obaldía, province of Chiriquí

Sara Miranda^{1, 2}

<https://orcid.org/0000-0001-9235-1606>

Fermín Acosta¹

<https://orcid.org/0000-0003-4849-9704>

Amador Goodridge¹

<https://orcid.org/0000-0003-3910-0482>

¹Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología de Panamá. Ciudad del Saber, Panamá

²Universidad Autónoma de Chiriquí, David, Chiriquí

Autor correspondiente: agoodridge@indicasat.org.pa

Enviado el: 9 de septiembre de 2023 Aceptado el: 10 de noviembre de 2023

<https://doi.org/10.59722/rcvn.v1i2.703>

Resumen

La tuberculosis (TB) es una enfermedad global infectocontagiosa de alta prioridad debido a su patogenicidad y facilidad de propagación. En Panamá, la TB, causada por *Mycobacterium tuberculosis*, presenta desafíos significativos, especialmente en provincias como Chiriquí, Colón, Panamá y las comarcas Guna Yala y Ngäbe-Buglé, donde la incidencia es elevada. El Hospital Materno Infantil José Domingo de Obaldía (HMIJDO) en Chiriquí juega un papel crucial en el diagnóstico y tratamiento de casos de TB, especialmente provenientes de la Comarca Ngäbe-Buglé y Bocas del Toro.

El HMIJDO facilita el aislamiento microbiológico de la cepa bacteriana *M. tuberculosis*, permitiendo la caracterización y genotipado de cepas implicadas en los casos de TB. La investigación se centra en caracterizar aislados del complejo *M. tuberculosis* del HMIJDO en 2017, 2019 y 2021, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con oligonucleótidos de alelo específico (ASO-PCR), un método molecular y genómico para rastrear cepas de alta transmisión.

Los resultados revelaron la presencia de cepas A del linaje 2 (3.5%), cepas B del linaje 4 genotipo Haarlem (2.4%), y cepas C del linaje 4 genotipo LAM (5.8%). Además, se identificaron cepas con resistencia a fármacos como rifampicina, isoniacida y MDR. Se detectaron posibles cepas mixtas, lo que complica el análisis y requiere pruebas adicionales.

El estudio proporciona una visión detallada de la distribución de los linajes de *M. tuberculosis* en la provincia de Chiriquí y áreas cercanas, identificando 10 cepas de *M. tuberculosis*, algunas asociadas con una mayor transmisión previamente registrada en Panamá y Colón. Este análisis contribuye a la comprensión de la epidemiología de la TB en la región y destaca la importancia de abordar la resistencia a fármacos y las cepas de alta transmisión para mejorar las estrategias de control de la enfermedad.

Palabras claves

ASO-PCR, cepas, cluster, CTAB, genotipificación, genotipos, linajes, *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis.

Abstract

Tuberculosis (TB) is a high-priority global infectious disease due to its pathogenicity and ease of spread. In Panama, TB, caused by *Mycobacterium tuberculosis*, presents significant challenges, especially in provinces such as Chiriquí,



Colon, Panama and the Guna Yala and Ngäbe-Bugle region, where the incidence is high. The Hospital Materno Infantil José Domingo de Obaldía (HMIJDO) in Chiriqui plays a crucial role in the diagnosis and treatment of TB cases, especially from the Ngäbe-Bugle and Bocas del Toro region.

The HMIJDO, facilitates the microbiological isolation of the bacterial strain *M. tuberculosis*, allowing the characterization and genotyping of strains implicated in TB cases. This research focuses on characterizing and isolating strains of *M. tuberculosis* complex gathered from HMIJDO in 2017, 2019, and 2021, using allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction (ASO-PCR), a molecular and genomic method for tracking high-transmission strains.

The results revealed the presence of strains A of lineage 2 (3.5 %), strains B of lineage 4 Haarlem genotype (2.4 %), and strains C of lineage 4 LAM genotype (5.8 %). In addition, strains with resistance to drugs such as rifampicin, isoniazid, and MDR were identified. Possible mixed strains were detected, which complicates the analysis and requires additional testing.

This study provides insights into the distribution of *M. tuberculosis* lineages in the province of Chiriqui and nearby areas, identifying 10 strains of *M. tuberculosis*, some of these associated with increased transmission previously reported in Panama and Colon. This analysis contributes to the understanding of TB epidemiology in the region and highlights the importance of addressing drug resistance and high-transmission strains to improve disease control strategies.

Keywords

ASO-PCR, cluster, CTAB, genotypes, genotyping, lineages, *Mycobacterium tuberculosis*, strains, tuberculosis.

Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa originada por *Mycobacterium tuberculosis* agente etiológico de la TB en seres humanos, y en la actualidad es la principal causa de mortalidad a nivel global, cobrando aproximadamente 4000 vidas diarias (Organización Mundial de la Salud [OMS 2], 2020). En las últimas décadas, los estudios evolutivos han mejorado nuestra comprensión de la historia del complejo *M. tuberculosis*, enfatizando su larga coevolución con los seres humanos gracias a su habilidad para mantenerse en estado latente dentro del huésped.

Aunque el agente causal de la TB en seres humanos es la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), integrante del Complejo *M. tuberculosis*; este complejo alberga diversas especies, diferenciadas por el huésped de infección, entre las que se incluyen *Mycobacterium bovis* (afectando ganados bovinos), *Mycobacterium caprae* (presente en cabras), *Mycobacterium microti* (relacionada con roedores), entre otras (Dorransoro & Torroba, 2007).



Adicionalmente, hay otro grupo heterogéneo de bacterias que constituye, en numerosas ocasiones, la causa de infecciones en seres humanos, destacándose especies como *Mycobacterium avium complex* (MAC), *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium chelonae*, entre otras. Estas especies son conocidas como micobacterias no tuberculosas (MNT) o micobacterias atípicas que se aíslan con mayor frecuencia en humanos (Dorronsoro y Torroba, 2007; Porvaznik et al. 2017).

Sin embargo, el éxito patogénico principalmente de la especie *M. tuberculosis* se sustenta en su modalidad de infección y el desenvolvimiento de su patología en la forma pulmonar de la tuberculosis, ya que los pulmones constituyen su principal objetivo. Dicho proceso se compone de cuatro etapas secuenciales: la fagocitosis de bacilos, su reproducción intracelular, el estado latente de la infección y, finalmente, la activación de la infección pulmonar (Bañuls et al. 2015).

En Panamá, la TB exhibe elevadas tasas de incidencia (39.9 casos/100 000 hab.) y su epidemiología varía entre provincias y comarcas. La provincia de Chiriquí enfrenta desafíos y limitaciones en términos de diagnóstico, monitoreo de casos, tecnología y equipamiento para brindar atención adecuada a los pacientes de TB. La información concerniente a los genotipos de cepas circulantes en Chiriquí y regiones cercanas, como Bocas del Toro y la Comarca Ngäbe-Buglé, es limitada. Por lo tanto, se realizó un estudio de caracterización genotípica de cepas de *M. tuberculosis* obtenidas en Chiriquí, con el propósito de generar datos relevantes para el manejo de casos de TB y las cepas involucradas. La provincia de Chiriquí figura en la lista de regiones con elevada tasa de incidencia de TB, presentando un 25.3 % de la incidencia total de Panamá en una población de 100 000 habitantes. Es por ello que el objetivo central del estudio fue caracterizar las cepas aisladas de *M. tuberculosis* obtenidas del Hospital Materno Infantil José Domingo de Obaldía (HMIJDO) en Chiriquí durante los años 2017, 2019 y 2021 mediante técnicas moleculares y genómicas. Para ello, se emplearon técnicas de extracción de ADN utilizando la metodología con Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB) basada en solventes orgánicos y se caracterizaron las cepas de *M. tuberculosis* mediante la implementación de la reacción en cadena de la polimerasa con oligonucleótidos de alelos específicos (ASO-PCR).



Uno de los enfoques principales consistió en aplicar tres ASO-PCRs específicas (PCR **A**-Beijing, **B**-Haarlem y **C**-LAM) a muestras obtenidas de cultivos microbiológicos. Esta herramienta fue diseñada previamente para identificar cepas bacterianas de alta transmisión (**A**- Beijing, **B**- Haarlem y **C**- LAM) de *M. tuberculosis* en las provincias de Panamá y Colón. El propósito fue investigar la persistencia de la circulación de estas cepas a través del análisis retrospectivo de una colección de 85 cepas del HMIJDO en Chiriquí, las cuales fueron inactivadas utilizando métodos de bioseguridad de nivel 3 y posteriormente sometidas a extracción de ADN y genotipificación en el laboratorio del Centro de Biología Molecular y Celular del INDICASAT-AIP.

Materiales y Métodos

El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad Santander de Panamá con los siguientes Protocolos: CBI-USantander-M-041-2022 y CBI-USantander-M-081-2022 (2022).

En el marco de nuestro estudio retrospectivo, las cepas del complejo *M. tuberculosis*, fueron obtenidas gracias a la colaboración entre las instituciones INDICASAT-AIP y el HMIJDO para el estudio investigativo para entender la circulación de cepas de MTB en la región occidental. Nuestro estudio abordó el análisis de 85 cepas del Complejo *M. tuberculosis* recolectados y archivados durante un periodo de tres años: 2017, 2019 y 2021.

Obtención de cepas

De acuerdo al nivel de Bioseguridad 3, la colección de cepas de *M. tuberculosis*, forma parte del procedimiento estándar de cultivo y almacenamiento de aislados en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Materno Infantil José Domingo de Obaldía, donde fueron desarchivadas e inactivadas en buffer de lisis, incubadas a 95°C por 20 minutos por el personal técnico del laboratorio del HMIJDO. Las muestras inactivadas fueron enviadas al INDICASAT-AIP para su posterior análisis en el área de Bioseguridad nivel 2. El número de aislados y las pruebas de sensibilidad fueron realizadas (en su momento) mediante método GenoType (Hain).

Genotipificación



La genotipificación completa de las cepas de *M. tuberculosis* se llevó a cabo en el Centro de biología celular y molecular de enfermedades (CBCME) del INDICASAT-AIP, que incluye los siguientes espacios

1-Extracción de ADN y cuantificación del material genético en nivel de Bioseguridad 2

- Se utilizó la técnica de extracción de ADN con Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB) que consiste en el agregado de solventes orgánicos, procedimiento que consta de realizar toda la extracción en el mismo tubo de tapa rosca. Siguiendo la metodología elaborada por Doyle y Doyle, pero adaptada a este estudio, ya que en un principio se aplicó en la extracción de ADN para plantas, pero, ahora es ampliamente utilizado en la extracción de ADN de diversos microorganismos (Doyle y Doyle, 1987; Doyle, 1990).
- La cuantificación del ADN de *M. tuberculosis* se determinó evaluando la calidad y la cantidad del ADN utilizando el equipo NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific, utilizando los estándares y manual del fabricante (Thermo fisher Scientific, 2010). La metodología consta de tomar 1 µl de la muestra de ADN y colocarla a en la celda de lectura para pedir la concentración en ng/ µl y la absorbancia 260/280.

2-PRE-PCR y POST-PCR= Implementación de las mezclas de reactivos para las tres ASO-PCRs (clústeres A, B y C)

- La caracterización genotípica de aislados de *M. tuberculosis* se realizó utilizando la metodología de la ASO-PCR, la cual se llevó a cabo siguiendo las condiciones descritas por Domínguez et al. (2019) presentadas en la tabla 1.

Tabla 1.

Mezclas de reacción y condiciones para cada PCR (A, B y C).

Reactivo	Volumen por reacción, µL		
	Cepa A	Cepa aB	Cepa C
HotStarTaq polimerasa, 5 U/µL diluido 1:10	1.25	1.25	1.25
MgCl ₂ , 25 mM	0.4	0.3	0.4
Búffer de PCR, 10µcon 15 mM MgCl ₂	2.5	2.5	2.5
Solución Q, 5µ	5.0	5.0	5.0
Mezcla de cebadores, 10µ	2.5	2.5	2.5
dNTP, 10 mM	0.2	0.2	0.2
H ₂ O	10.65	10.75	10.7
Diana de ADN		2.5 µL c/u	
Volumen de reacción final de 25 µL			

Nota: *dNTPs, desoxinucleótidos; MgCl₂, Cloruro de magnesio de magnesio. Las condiciones de PCR para cada cepa fueron las siguientes: 95° C durante 15 min, seguido de 27 ciclos de 95°C durante 1 min, recocido (64°C para Cluster A y 60 °C tanto para Cluster B como C durante 1 min) y 72°C durante 10 min.



La Post-PCR consiste del procedimiento de la electroforesis, donde los amplicones obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3 % en 100 ml de Buffer TBE, con tinción de bromuro de etidio (6 μ l). Una vez el gel solidificado se carga la muestra de ADN con un volumen de 12 μ l en cada uno de los pocillos del gel de agarosa; estas se mezclaron con 4 μ l de Buffer o tinte de carga: Blue/Orange Loading Dye, 6X de Promega. Los tamaños de los amplicones se estimaron por comparación con marcadores de peso molecular de la escalera de ADN de 100 pb, PROMEGA. Posteriormente, las electroforesis, corrieron a 95V durante una hora y media y fueron visualizadas en un Transiluminador ultravioleta de CHEMIDOC.

Finalmente, el análisis de fragmentos se realizó después de la electroforesis, constaba de tomar el gel de agarosa y colocarlo en el Transiluminador (CHEMIDOC), en la bandeja lectora del gel #2 que tiene la especificidad para revelar gel de garosa con tinte de Bromuro de etidio. Una vez realizada la lectura se muestra en la pantalla el gel con las bandas reflejadas. El análisis se lleva a cabo comparando el tamaño de la banda con el control positivo de cada Cluster (Cluster A, Cluster B y Cluster C) además del control negativo la cepa H37RV y así determinar el tipo de cepa. El tamaño de la banda se corroboraba con la escalera de 100 bp (Promega).

Resultados

En el transcurso de este estudio, se logró acceder a una colección compuesta por un total de 85 cepas de *M. tuberculosis*. Estas cepas se distribuyen en tres años distintos de recolección: 22 cepas provienen del año 2017, 55 cepas del 2019 y finalmente, 8 cepas del año 2021; a todas estas cepas, se llevó a cabo un análisis microbiológico de su susceptibilidad a fármacos. Se determinó la presencia de drogorresistencia en las 85 cepas de *M. tuberculosis* estudiadas, dando como resultado la identificación de dos cepas correspondientes a casos de mono-resistencia; distribuidas de la siguiente manera:

- 1 cepa mostró resistencia únicamente a Rifampicina.
- 1 cepa demostró resistencia exclusiva a Isoniacida.



Resulta relevante destacar que estas dos cepas monorresistentes fueron aisladas y obtenidas de la Provincia de Chiriquí. No se encontraron cepas monorresistentes entre los 12 aislados provenientes de la Comarca Ngäbe-Buglé ni los nueve aislados de Bocas del Toro. Por lo tanto, se puede concluir que estos números específicos a las regiones corresponden a cepas sensibles a los fármacos antituberculosos.

Por otro lado, en relación a la identificación de cepas multidrogorresistentes (MDR), se obtuvo el resultado de que entre los 85 aislados totales, solamente tres cepas corresponden a casos de MDR, es decir, cepas resistentes tanto a Rifampicina como a Isoniacida. Estas cepas MDR están distribuidas entre los 58 aislados de la provincia de Chiriquí. En cambio, no se lograron identificar cepas MDR en las muestras provenientes de la Comarca Ngäbe-Buglé ni de Bocas del Toro.

En última instancia, dentro de este conjunto de 85 aislados, se asignó una categoría particular denominada "Datos no disponibles". En esta categoría se incluyen seis aislamientos sometidos a pruebas de resistencia a fármacos. Sin embargo, debido a problemas técnicos en el formulario de inscripción, no se reflejó adecuadamente la provincia a la que pertenecían los pacientes en cuestión.

Tabla 2.
Resistencia de los aislados M. tuberculosis obtenidas en el Hospital materno infantil José domingo de Obaldía, Chiriquí (N°85).

Región	N° de aislados	Monorresistente	MDR	Sensibilidad	No data
Chiriquí	58	2 (RR, IR)	3	53	0
Comarca Ngäbe-Buglé	12	0	0	12	0
Bocas del Toro	9	0	0	9	0
Datos no disponibles	6	0	0	5	1

Nota: R-R (resistente Rifampicina), R-I (resistente Isoniacida), MDR (Multidrogoresistente)

* Datos no disponible: Datos no llenados en el formulario del paciente, por ejemplo, la región donde reside.

Hallazgos de las Tres ASO-PCR

En esta sección, se exponen los resultados obtenidos a través de la implementación de las tres ASO-PCR (ASO-PCR A-Beijing, B-Haarlem y C-LAM). La colección compuesta por 85 aislados fue sometida a los tres

ensayos de PCR con el propósito de identificar y caracterizar los genotipos más predominantes pertenecientes a los linajes 2 y 4, los cuales habían sido previamente señalados como problemáticos en las áreas de Panamá y Colón. De los 85 aislamientos recolectados durante los tres años mencionados, fue posible llevar a cabo la caracterización genotípica de manera exitosa en 10 de estas cepas, las cuales fueron clasificadas como parte de los Cluster específicos:

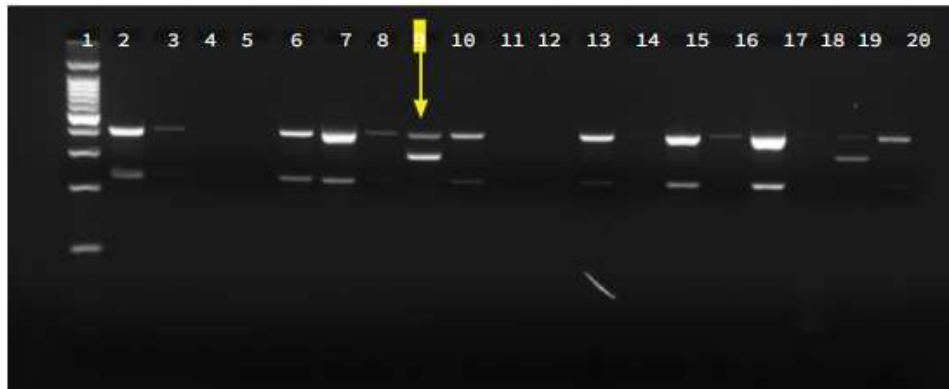


Figura 1.

Resultados de cepa A (Linaje 2, genotipo Beijing). Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la identificación de la cepa de Cluster A (linaje2 genotipo Beijing). El pocillo 1 representa la escalera/marcador de peso molecular de 100 pb PROMEGA, el pocillo 2 al 18 representan las muestras de ADN amplificadas, la flecha del pocillo 9 indica la presencia de la cepa A, el pocillo 19 y 20 representan los controles utilizados (Pocillo 19: control positivo y pocillo 20 el control negativo).

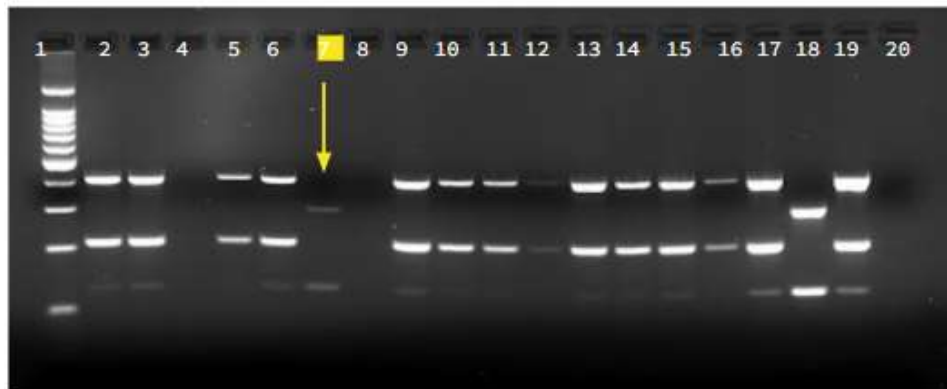


Figura 2.

Resultados de cepa B (Linaje 4 genotipo Haarlem). Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la identificación de la cepa de Cluster B (linaje 4 genotipo Haarlem). El pocillo 1 representa la escalera de peso molecular de 100 pb PROMEGA, el pocillo 2 al 17 representan las muestras de ADN amplificadas, la flecha del pocillo 7 indica la presencia de la cepa B, el pocillo 18 y 19 representan los controles utilizados (Pocillo 18: control positivo y pocillo 19 el control negativo). Por último, el pocillo 20 se le agregó agua como control de contaminación.

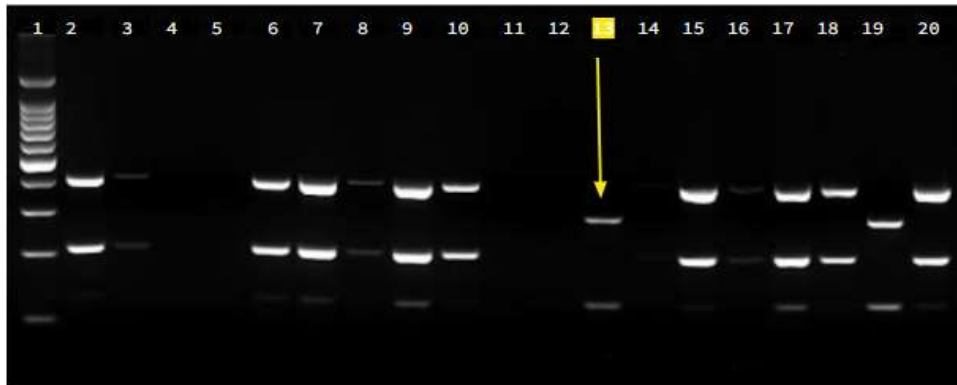


Figura 3.

Resultados de cepa B (Linaje 4 genotipo Haarlem). Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la identificación de la cepa de Cluster B (linaje 4 genotipo Haarlem). El pocillo 1 representa la escalera de peso molecular de 100 pb PROMEGA, el pocillo 2 al 18 representan las muestras de ADN amplificadas, la flecha del pocillo 13 indica la presencia de la cepa B, el pocillo 19 y 20 representan los controles utilizados (Pocillo 19: control positivo y pocillo 20 el control negativo).

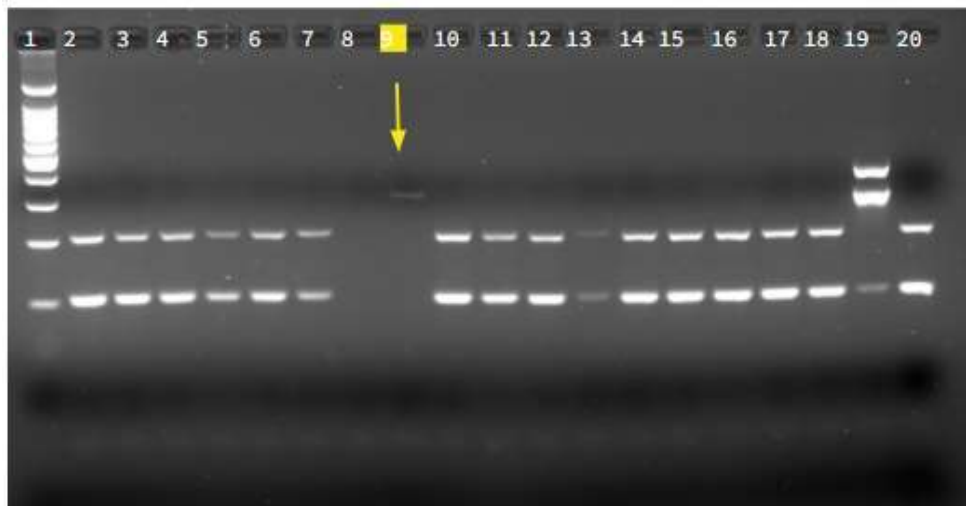


Figura 4.

Resultados de cepa C (Linaje 4 genotipo LAM). Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la identificación de la cepa de Cluster C (linaje 4 genotipo LAM). El pocillo 1 representa la escalera de peso molecular de 100 pb PROMEGA, el pocillo 2 al 18 representan las muestras de ADN amplificadas, la flecha del pocillo 9 indica la presencia de la cepa B, el pocillo 19 y 20 representan los controles utilizados (Pocillo 19: control positivo y pocillo 20 el control negativo).



Figura 5.

Resultados de cepa C (Linaje 4 genotipo LAM). Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la identificación de la cepa de Cluster C (linaje 4 genotipo LAM). El pocillo 1 representa la escalera de peso molecular de 100 pb PROMEGA, el pocillo 2 al 18 representan las muestras de ADN amplificadas, la flecha del pocillo 9 indica la presencia de la cepa B, el pocillo 19 y 20 representan los controles utilizados (Pocillo 19: control positivo y pocillo 20 el control negativo).

Tabla 3.

Resumen de resultados de las tres ASO-PCRs aplicadas sobre la colección de 85 aislados de del complejo *M. tuberculosis*.

ASO-PCR	CEPA (%)	NO CEPA (%)
CEPA-A (Beijing)	3 (3.5) *	82 (96.4)
CEPA-B (Haarlem)	2 (2.3)	83 (97.6)
CEPA-C (LAM)	5 (5.8) **	80 (94.1)

LAM: Latin America Mediterraneo, *Dentro del total de estas tres CEPAS A identificadas, dos muestras son mixtas. ** Del total de las CEPA C, dos muestras son mixtas.

Discusión

La transmisión de la TB es un tema global que requiere ser atendido en todo su aspecto. El abordaje de los distintos genotipos implicados en los casos de TB utilizando las herramientas de epidemiología molecular ha resultado útil para tales escenarios, permitiendo conocer la transmisión de las cepas más prevalentes o activas (Coll y García de Viedma, 2018).



En este sentido, la aplicación de herramientas de vigilancia epidemiológica como la PCR alelo específicas (ASO-PCR) ha simplificado los pasos en la identificación de cepas de alta transmisión o de mayor riesgo en Panamá y en otras regiones.

Teniendo en cuenta esto, se utilizaron herramientas de microbiología, biología molecular y genética en la provincia de Chiriquí con la necesidad de conocer la transmisión de cepas problemáticas o prevalentes del complejo *M. tuberculosis* dirigimos nuestro enfoque en el abordaje de análisis retrospectivo de una colección cepas colectadas en el HMIJDO, provincia de Chiriquí. La colección de 85 cepas del HMIJDO representa aproximadamente el 10% del total de los casos entre las tres regiones nivel del total de los casos de TB que recibe el hospital HMIJDO entre las tres regiones (Bocas del Toro, Comarca Ngäbe-Buglé y Chiriquí). De todos los casos reportados de TB durante los años 2017, 2019 y 2021, tuvimos acceso a 85 aislados repartidos entre las tres regiones como la provincia de Chiriquí Bocas del toro y la Comarca Ngäbe Buglé.

Análisis de la calidad de ADN de bacterias

En esta primera etapa nuestro punto de partida fue obtener la mayor cantidad de ADN posible utilizando el método de extracción de CTAB basado en solventes orgánicos, debido a que ofrece excelentes resultados y bajo costo (Huang, et al. 2018). Tiene la capacidad de analizar Micobacterias que se caracterizan por su resistencia a nivel de membrana, proteínas y lípidos, (Wilson, 2001). Nuestro análisis cuantitativo de ADN arrojó un promedio aproximado de 30 ng/ml y una absorbancia de 1.60 nm, valores aceptables durante la medición de acuerdo a los valores óptimos indicadas en el manual del equipo (Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers, 2010). Este método de extracción por CTAB demostró tener buen rendimiento durante el análisis de ADN. Es notorio mencionar que la cantidad de ADN a extraer dependerá de la cantidad del material inicial de trabajo, por lo que es necesario almacenar una cantidad de material necesario de cultivos que pudieran ser de potencial estudio en posteriores estudios como es el caso de subcultivo, extracción de DNA, análisis de genoma completo y otros ensayos que pudieran ser de interés.

Genotipificación de cepas de MTB prevalentes mediante PCR alelo específico (ASO-PCR)



Es una técnica que pretende simplificar la vigilancia epidemiológica de los casos de TB. En este caso, dirigimos esfuerzos en su aplicación a los aislados de *M. tuberculosis* obtenidas en la región occidental de Panamá con la finalidad de abordar y proveer nuevos datos para mejorar la comprensión de la transmisión de la TB mediante el uso del método evaluado y diseñado previamente en Panamá y Colón (Domínguez et al. 2019). Con el objetivo de identificar la presencia de cepas de *M. tuberculosis* prevalentes y activa en la provincia de Chiriquí, aplicamos tres PCR específicas para identificar Cluster A (cepa linaje 2, genotipo Beijing prevalente), Cepa B (linaje 4, genotipo Haarlem prevalente) y Cepa C (linaje 4, genotipo LAM de transmisión activa).

La primera ASO-PCR aplicada tiene la capacidad de caracterizar genotípicamente cepas de *M. tuberculosis* del Linaje 2 genotipo Beijing. Este linaje geográficamente se distribuye por toda Asia, pero característicamente el genotipo bacteriano Beijing es considerado actualmente uno de los linajes más prevalentes de *M. tuberculosis* siendo reportado en diversos países en todo el mundo (Mokrousov, 2016). Es de interés de estudio debido a que su prevalencia se debe a su alta transmisibilidad y virulencia hasta el punto de dispersarse por toda Latino América con gran adaptación a dicha población (Mokrousov, 2016). En nuestro estudio pudimos destacar la presencia de tres cepas correspondiente al genotipo Beijing (figura 1), que representó el 3.5 % del total de las muestras analizadas (n: 85). Aunque esta cifra es baja en comparación con la provincia de Colón, donde el genotipo Beijing llega a representar hasta el 44.1 % de los casos de tuberculosis (Acosta et. al 2020). Esto sigue siendo una señal importante para evaluar la epidemiología de la tuberculosis en Chiriquí y sus regiones aledañas, resulta crucial investigar a estos pacientes de genotipo Beijing y conocer su contacto con la población de Panamá y Colón y, evaluar si es un caso de transmisión independiente como ha ocurrido en otros entornos (López-Rocha et al. 2013).

Por otro lado, la aplicación de la segunda ASO-PCR tiene la capacidad de caracterizar genotípicamente el linaje 4 identificando las cepas B de transmisión prevalente y cepa C de transmisión activa del linaje 4 de *M. tuberculosis*. Nuestro estudio permitió identificar dos cepas B (genotipo Haarlem), representado el 2.3 % (figuras 2 y 3), mientras que la cepa C (genotipo LAM) fue del el 5.8 % del total de 85 muestras analizadas (figuras 4 y 5). Estos resultados indican que los genotipos de las cepas B y C se transmiten con baja frecuencia en la zona occidental (tabla 3), lo que sugiere la existencia de otros genotipos



involucrados en los casos de tuberculosis. De acuerdo a Demay et al. (2012) confirma que los genotipos Haarlem y LAM del Linaje 4 son los miembros más comúnmente observados en América del Sur, América Central y el Caribe aparte de estar distribuidos en Europa y África Central. Teniendo en cuenta esto es lógico haber encontrado en mayor proporción el genotipo Haarlem y LAM en este estudio, por lo que se puede tener certeza de que el linaje 4 está distribuido en toda América y nivel mundial; y que todos los aislados analizados en diversos estudios incluyendo este se van a detectar los genotipos Haarlem y LAM. En cuanto al resto de las muestras micobacterianas que no se clasificaron en Cepa A, Cepa B y Cepa C, la razón es atribuida a que los amplicones visualizados en el gel eran distintos al control positivo del Cluster A para identificar cepas de dicho Cluster del L2-genotipo Beijing, y así mismo, los amplicones eran diferentes a cepas del Cluster B para identificar L4-genotipo Haarlem y cepas del Cluster C para L4-genotipo LAM por lo que no se pudieron identificar el genotipo de *M. tuberculosis*, por lo tanto, tampoco se conoce el linaje, sin embargo existe la seguridad que son cepas de la especie de *M. tuberculosis* ya que sus amplificaciones eran iguales a la cepa micobacteriana modelo H37Rv. Esto señala que no se pudo determinar la identidad genotípica de estas cepas debido a que el análisis se enfocó en las tres cepas de mayor prevalencia descritas en estudios previos en Colón y Panamá, que son responsables de los casos de tuberculosis (Domínguez et al. 2019).

Entorno epidemiológico

Los resultados obtenidos revelan que la epidemiología de la provincia de Chiriquí difiere de la de otras provincias de Panamá. Estos hallazgos sugieren que las cantidades de genotipos reportados no son iguales para considerar que la epidemiología es homogénea, como lo es para el genotipo Beijing en las provincias de Panamá y Colón. Estos datos indican que la prevalencia de la tuberculosis en la región occidental se debe a las condiciones socioambientales y a la calidad de vida de las personas. En el caso de Chiriquí, la presencia de zonas desatendidas es notable, debido a la dificultad de acceso a estas regiones y a la falta de suministros básicos, lo que conduce a problemas como la desnutrición y la limitación del acceso a agua potable, afectando la higiene personal y ambiental. Esto podría aumentar la prevalencia de otras micobacterias (López et al. 2021). Las áreas más afectadas por estas circunstancias son la Comarca y las regiones circundantes. La Comarca Ngäbe Buglé, con una población de 213,860 habitantes, no cuenta con la atención médica necesaria debido a la falta de instalaciones de



salud adecuadas y equipamiento para el diagnóstico de la tuberculosis. Solo unos pocos habitantes tienen la posibilidad de viajar al HMIJDO para recibir atención médica y diagnóstico confiable.

En el estudio, de las 85 muestras analizadas, solo 12 corresponden a la Comarca (tabla 2), lo que no significa que haya pocos casos de tuberculosis en esa población, si comparamos esta cifra con los datos actualizados del HMIJDO, queda claro que la tuberculosis es la principal causa de ingreso hospitalario en todas las edades, especialmente en la población infantil. La falta de medicamentos específicos para cada paciente es otro problema importante, ya que el tratamiento inadecuado o la ausencia de medicación desarrollan el riesgo de cepas resistentes a los fármacos, aumentando la vulnerabilidad e inmunidad del huésped y el riesgo social de la población (Afshar et al. 2019, Gadoev et al. 2017).

En este estudio, identificamos cinco cepas con resistencia a los fármacos, que se dividen en dos cepas monorresistentes a rifampicina e isoniazida, y tres cepas MDR. La falta de medicamentos adecuados y la discontinuidad en el programa antituberculoso contribuyen a esta situación, ya que lamentablemente no se rigen a la norma técnica nacional para el control de la tuberculosis en Panamá (Ministerio de Salud [MINSAL], 2017). La presencia de estas cepas resistentes es un desafío considerable en los esfuerzos por erradicar la tuberculosis, y subraya la importancia de identificar las cepas de *M. tuberculosis* MDR (Organización Mundial de la Salud [OMS 2], 2020).

Por otro lado, durante el transcurso de esta investigación surgieron ciertas limitaciones, como la disponibilidad limitada de cepas proporcionadas por el HMIJDO debido a la pandemia de COVID-19 (OMS 1, 2020). Afectando el flujo de trabajo en microbiología y la logística de envío de cepas. Además, notamos un bajo número de muestras, lo que restringió la posibilidad de repetir tanto los análisis moleculares como los genómicos. En la etapa de análisis de la ASO-PCR, también detectamos cepas mixtas, que son infecciones con más de un genotipo, lo que puede complicar los resultados del tratamiento. Sin embargo, debido a la falta de acceso al medio de cultivo bacteriano, no pudimos resolver este problema (Kargarpour Kamakoli et al. 2020).

En última instancia, este estudio proporciona información valiosa sobre la epidemiología de la tuberculosis en la provincia de Chiriquí, que hasta ahora no había sido estudiada en profundidad en comparación con otras provincias de Panamá. Esta información es esencial para la provincia, el país y a



nivel internacional, ya que contribuye al conocimiento actualizado sobre la bacteria y sus características microbiológicas, así como a las medidas necesarias para su diagnóstico.

Conclusiones

- Este estudio permitió evidenciar la distribución de los linajes de aislamientos del complejo bacteriano de *M. tuberculosis* circulantes en la región occidental de Panamá. Se lograron identificar 10 cepas de *M. tuberculosis* distribuidas en la población de la provincia de Chiriquí y regiones cercanas de Bocas del Toro y Comarca Ngäbe Buglé; cepas encontradas con genotipos de mayor transmisión descritos previamente en Panamá y Colón.
- Con la información obtenida de los resultados de esta investigación se puede evidenciar que el Linaje 4 de *M. tuberculosis* es el de mayor transmisibilidad en la provincia de Chiriquí, donde se destaca la presencia del genotipo LAM.
- Hay una escasa predominancia de variantes genéticas problemáticas (cepa con genotipo Beijing) responsables de la enfermedad ya que no encontramos en la colección analizada de la región occidental la misma proporción de cepas problemáticas que en el resto del país (provincia de Panamá y Colón), posiblemente por la diferencia de entornos, diversas condiciones de vida, zona ambiental y cultural que lo hace limitante a que esa cepa se disperse.
- Los descubrimientos indican la necesidad de llevar a cabo investigaciones prospectivas con un enfoque sistémico, que relacionen los casos de tuberculosis con determinantes socioeconómicos y demográficos, con el propósito de lograr una comprensión más exhaustiva de su comportamiento.
- Es esencial emprender análisis de secuenciación completa de genomas de las cepas, con el fin de establecer vínculos genómicos a lo largo del tiempo y detectar nuevas instancias de resistencia a antimicrobianos.
- Definitivamente, este estudio adquiere relevancia primordial en el panorama investigativo y académico, puesto que contribuye de manera sustantiva a la identificación de cepas bacterianas con implicancias problemáticas y profundiza en la comprensión de su dinámica de transmisión y



resistencia.

Agradecimientos

A todas las entidades y organizaciones involucradas: UNACHI, INDICASAT-AIP, Hospital materno infantil José Domingo de Obaldía, MINSA, Apoyo por Fondos de Investigación: Sistema Nacional de Investigación (SNI) de la SENACYT, Fondos internos del INDICASAT, Red de Países de la Unión Europea (UE), América Latina y el Caribe (ALC)-ERANET-LAC y Beca mediante la Fundación Deveaux.

Referencias

- Acosta, F., Norman, A., Sambrano, D., Batista, V., Mokrousov, I., Shitikov, E., Jurado, J., Mayrena, M., Luque, O., Garay, M., Solís, L., Muñoz, P., Folkvardsen, D. B., Lillebaek, T., Pérez-Lago, L., Goodridge, A., García de Viedma, D. (2020). Prevalencia probable a largo plazo de un clon predominante de *Mycobacterium tuberculosis* de un genotipo Beijing en Colón, Panamá.
- Afshar, B., Carless, J., Roche, A., Balasegaram, S., & Anderson, C. (2019). Surveillance of tuberculosis (TB) cases attributable to relapse or reinfection in London, 2002-2015. *PloS one*, 14(2), e0211972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211972>
- Bañuls, A. L., Sanou, A., Van Anh, N. T., & Godreuil, S. (2015). *Mycobacterium tuberculosis*: ecology and evolution of a human bacterium. *Journal of medical microbiology*, 64(11), 1261-1269. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000171>
- Coll, D. García de Viedma. (2018). *Epidemiología molecular de la tuberculosis*. Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Demay, C., Liens, B., Burguière, T., Hill, V., Couvin, D., Millet, J., Mokrousov, I., Sola, C., Zozio, T., Rastogi N. (2012). SITVITWEB--a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol.* 12(4):755-66. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.02.004>
- Doyle, J., & Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, 19:11-15.
- Doyle, J. (1990). DNA protocols for plants. *Nato Asy Series*, 283-284.
- Domínguez, J., Acosta, F., Pérez-Lago, L., Sambrano, D., Batista, V., De La Guardia, C., Abascal, E., Chiner-Oms, Á., Comas, I., González, P., Bravo, J., Del Cid, P., Rosas, S., Muñoz, P., Goodridge, A., & García de Viedma, D. (2019). Simplified Model to Survey Tuberculosis Transmission in Countries Without Systematic Molecular Epidemiology Programs. *Emerging infectious diseases*, 25(3), 507-514. <https://doi.org/10.3201/eid2503.181593>
- Dorronsoro, I., & Torroba, L. (2007). Microbiología de la tuberculosis. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 30(Supl. 2), 67-85. Recuperado en 10 de noviembre de 2023, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S113766272007000400006&lng=es&tlng=es.



- Gadoev, J., Asadov, D., Harries, A. D., Parpieva, N., Tayler-Smith, K., Isaakidis, P., Ali, E., Hinderaker, S. G., Ogtay, G., Ramsay, A., Jalolov, A., & Dara, M. (2017). Recurrent tuberculosis and associated factors: A five-year countrywide study in Uzbekistan. *PLoS one*, 12(5), e0176473. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176473>
- Huang, X., Duan, N., Xu, H., Xie, T. N., Xue, Y. R., & Liu, C. H. (2018). *Molekuliarnaia biologii*, 52(4), 718–726. <https://doi.org/10.1134/S0026898418040080>
- Kargarpour Kamakoli, M., Farmanfarmaei, G., Masoumi, M., Khanipour, S., Gharibzadeh, S., Sola, C., Fateh, A., Siadat, S. D., Refregier, G., & Vaziri, F. (2020). Prediction of the hidden genotype of mixed infection strains in Iranian tuberculosis patients. *International Journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 95, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.056>
- López, A., Acosta, F., Sambrano, D., Tarajia, M., Navajas, S., Arias, F., Escobar, B., Ortis, P., Adames, F., & Goodridge, A. (2021). Caracterización Molecular Directa del Frotis de Bacilos Ácido-Resistentes de Especies de *Mycobacterium* NoTuberculosis 96 Causantes de Tuberculosis Pulmonar en la Región Guna Yala, Panamá. *The American Journal of tropical medicine and hygiene*, 105(3), 633–637. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-0096>
- López-Rocha, E., Juárez-Álvarez, J., Riego-Ruiz, L., Enciso-Moreno, L., Ortega-Aguilar, F., Hernández-Nieto, J., Enciso-Moreno, J. A., & López-Revilla, R. (2013). Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in San Luis Potosí, México. *BMC research notes*, 6, 172. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-172>
- Ministerio de Salud. [MINSA]. (2017). Norma técnica nacional para el control de la tuberculosis. Revisión y actualización de las Normas y Procedimientos para la Prevención y Control de la Tuberculosis. https://www.minsa.gob.pa/sites/default/files/programas/10sept_norma_tb_digital.pdf
- Mokrousov I, Vyazovaya A, Iwamoto T. (2016). Linaje latinoamericano-mediterráneo de *Mycobacterium tuberculosis*: rastros humanos a través de la filogeografía de patógenos. *Mol Phylonet Evol*. 99 :133–143.
- Organización Mundial de la Salud. [OMS 1]. (2020). La OMS caracteriza a COVID-19 como una pandemia. <https://www.paho.org/es/noticias/11-3-2020-oms-caracteriza-covid-19-como-pandemia>
- Organización Mundial de la Salud [OMS 2]. (2020) Directrices consolidadas de la OMS sobre tuberculosis Módulo 4: Tratamiento de la tuberculosis resistente a los medicamentos. Ginebra.
- Porvaznik, I., Solovič, I., & Mokry, J. (2017). Non-Tuberculous Mycobacteria: Classification, Diagnostics, and Therapy. *Advances in experimental medicine and biology*, 944, 19–25. https://doi.org/10.1007/5584_2016_45
- Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers. (2010). Nucleic Acid. <https://www.thermofisher.com/documentconnect/documentconnect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FCAD%2Fmanuals%2Fts-nanodrop-nucleicacid-olvr2.pdf>
- Wilson K. (2001). *Preparation of genomic DNA from bacteria*. Current protocols in molecular biology, Chapter 2. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56>



Efecto de la lateralización cerebral en el comportamiento de aprendizaje de *Poecilia reticulata* Effect of Cerebral Lateralization on the Learning Behavior of *Poecilia reticulata*

Arianis Mojica Lezcano¹
<https://orcid.org/0009-0007-2663-764X>

Reggie Guerra Montenegro^{2,3}
<https://orcid.org/0000-0001-8471-2862>

Reynaldo Vargas Vargas^{2,3}
<https://orcid.org/0000-0002-5420-9761>

¹ Colegio Secundario de Alanje. Proyecto Jóvenes Científicos 2022 SENACYT

² Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Zootecnia

³ Sistema Nacional de Investigación de la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SNI-SENACYT)
Autor correspondiente: reggie.guerra@up.ac.pa

Enviado el: 10 de octubre de 2023 Aceptado el: 13 de diciembre de 2023

<https://doi.org/10.59722/rcvn.v1i2.704>

Resumen

Lateralización cerebral se refiere al análisis preferencial de tipos particulares de información y procesos en un hemisferio cerebral específico y se cree que esta influye en un mayor rendimiento cognitivo. El objetivo del proyecto fue evaluar el efecto de la lateralización cerebral en el comportamiento de aprendizaje de *Poecilia reticulata*. Se separaron 60 individuos en tres fenotipos derecho, izquierdo y no lateralizado. Se seleccionaron ocho individuos lateralizados derechos e izquierdos y seis no lateralizados para la prueba cognitiva de discriminación visual y aprendizaje inverso. Los peces lateralizados representaron el 88 % de la población ($\chi_1^2=115.5$; $p<0.001$). No se encontró diferencias significativas en el porcentaje de individuos que se orientó hacia la izquierda o derecha ($\chi_1^2=1.28$; $p=0.25$). No se encontró diferencias significativas en la prueba de discriminación visual entre los tratamientos (K-W=3.97; $p=0.13$). Se observaron diferencias significativas entre las repeticiones (K-W=8.00; $p=0.04$). La interacción tratamiento por repeticiones no mostró diferencias significativas (K-W=14.55; $p=0.20$). En la prueba de aprendizaje inverso los fenotipos mostraron diferencias significativas en las latencias de entrada al nuevo ambiente (K-W=6.65; $p=0.03$). No se encontró diferencias significativas en las repeticiones (K-W=0.99; $p=0.80$), ni en la interacción tratamiento por repeticiones (K-W=10.25; $p=0.50$). La población estudiada muestra más del 80 % de lateralización cerebral. El porcentaje de individuos lateralizados izquierdos o derechos fue similar. El nivel cognitivo fue similar entre los fenotipos en la prueba de discriminación visual. En la prueba de aprendizaje inverso el fenotipo no lateralizado mostró mayor flexibilidad que los fenotipos lateralizados.

Palabras clave

Aprendizaje, fenotipos, latencia, pruebas cognitivas.

Abstract

Cerebral lateralization refers to the preferential analysis of specific types of information and processes in a specific cerebral hemisphere, believed to influence higher cognitive performance. The project aimed



to assess the effect of cerebral lateralization on the learning behaviour of *Poecilia reticulata*. Sixty individuals were categorized into three phenotypes: right-lateralized, left-lateralized, and non-lateralized. Eight right-lateralized, eight left-lateralized, and six non-lateralized individuals were selected for the visual discrimination and reverse learning cognitive test. Lateralized fish represented 88% of the population ($\chi^2=115.5$; $p<0.001$). No significant differences were found in the percentage of individuals orienting to the left or right ($\chi^2=1.28$; $p=0.25$). No significant differences were observed between treatments in the visual discrimination test (K-W=3.97; $p=0.13$). Significant differences were noted between repetitions (K-W=8.00; $p=0.04$). The treatment by repetitions interaction did not show significant differences (K-W=14.55; $p=0.20$). In the reverse learning test, phenotypes exhibited significant differences in entry latencies to the new environment (K-W=6.65; $p=0.03$). No significant differences were found in repetitions (K-W=0.99; $p=0.80$), nor the treatment by repetitions interaction (K-W=10.25; $p=0.50$). The studied population demonstrates over 80% cerebral lateralization. The percentage of left or right lateralized individuals was similar. Cognitive levels were comparable among phenotypes in the visual discrimination test. In the reverse learning test, the non-lateralized phenotype showed greater flexibility than the lateralized phenotype.

Keywords

Latency, learning, cognitive tests, phenotypes.

Introducción

La lateralización cerebral describe un procesamiento asimétrico de funciones cognitivas entre los dos hemisferios cerebrales y, con mayor frecuencia, se muestra abiertamente como un sesgo conductual, como la "dominancia". El sesgo conductual resultante se conoce como lateralidad (Berlinghieri et al. 2021).

La naturaleza generalizada de la lateralidad entre los taxones de vertebrados sugiere que se trata de una antigua innovación evolutiva y probablemente conduce al uso más eficiente del costoso tejido neural para obtener la máxima potencia de procesamiento (Magat & Brown, 2009).

La existencia de la variabilidad en las respuestas de comportamiento sugiere que la lateralidad podría ocurrir bajo la selección de equilibrio, en la que puede haber contextos en los que la lateralidad no proporciona un beneficio de aptitud o incluso puede ser costoso (Dadda et al. 2009). Muchas investigaciones se han enfocado en la comprensión de los costos y beneficios de la lateralización cerebral, con estudios de campo y de laboratorio que demuestran capacidades cognitivas mejores en individuos lateralizados (Dadda et al. 2009; Irving & Brown, 2013).



El hecho de que la lateralidad sea un rasgo conductual tan generalizado sugiere fuertemente que tiene ventajas de aptitud física, muchas de las cuales parecen estar relacionadas con la función cognitiva. Generalmente se cree que el desarrollo y evolución de la lateralización es un mecanismo ventajoso que mejora la capacidad cognitiva y la multitarea al permitir el procesamiento de múltiples estímulos externos (Brown, 2005).

Varios estudios (Ferrari et al., 2017; Roche et al., 2013; Roche et al., 2020) también informan un alto grado de variación individual en la fuerza de la lateralización en individuos medidos repetidamente en diferentes contextos, lo que sugiere que este rasgo puede ser más lábil de lo que se creía anteriormente. Debido a las metodologías simples que se pueden emplear para la evaluación de la lateralidad y el impacto de varios factores ecológicos y de estrés en la lateralidad, existe cada vez mayor interés en el uso de la lateralidad para evaluar el bienestar de los peces (Berlinghieri et al. 2021). Por tanto, se planteó como objetivo evaluar el efecto de la lateralización cerebral en el comportamiento de aprendizaje de *Poecilia reticulata*.

Materiales y Métodos

Sesenta peces *Poecilia reticulata* adultos fueron adquiridos en un proveedor local. Se estabularon en un tanque de 60 litros, con ambiente controlado (condiciones estándar). Se alimentaron hasta la saciedad dos veces al día, en la mañana con un pienso seco y en la tarde con un pienso húmedo de acuerdo con las especificaciones del fabricante tanto durante el periodo de aclimatación como durante la fase experimental.

Para la prueba de lateralización se realizó una adaptación a un aparato de prueba propuesto por Bisazza et al. (1997), utilizando un tanque (47cm de largo y 33cm de ancho) con una pista en el centro (10 cm de ancho y 30 cm de largo) que permitía a los peces observar una barrera en la parte final de la misma y elegir la dirección derecha o izquierda de salida (figura 1).

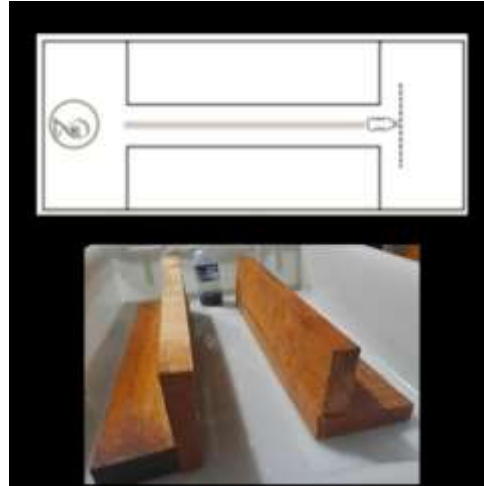


Figura 1.
Aparato para prueba de lateralización cerebral

Durante cada prueba, se empujaba suavemente a los peces con un par de redes de pesca en el punto de inicio de la pista. El pez se desplazó a lo largo de la pista hasta que se enfrentó a la barrera. Se registró la dirección derecha o izquierda de la respuesta de desvío en una serie de 10 ensayos consecutivos. La clasificación en no lateralizado, lateralizado izquierdo o derecho se realizó utilizando un índice en donde $(\text{derecho} - \text{izquierdo}) / (\text{derecho} + \text{izquierdo}) \times 100 = \text{índice de lateralidad}$ (Bisazza et al. 1997), en donde aquellos individuos con porcentajes positivos se desvían hacia la derecha fijando el objetivo con el ojo izquierdo y aquellos con valores negativos hacia la izquierda fijando el objetivo con el ojo derecho. La clasificación se verificó siguiendo la metodología propuesta por Amira et al. (2018) y Reddon et al. (2008). En el caso de la prueba de discriminación visual y aprendizaje inverso se eligieron ocho peces de los grupos lateralizados (derecho e izquierdo) y seis de los no lateralizados. Cada una de las pruebas se aplicó de forma individual por cuatro días seguido y ambas pruebas de forma consecutiva.

En la prueba de discriminación visual el tanque de prueba fue similar al empleado en la prueba de selección de fenotipos de lateralización cerebral. Se adaptó una barrera transparente que permitía al pez observar el nuevo ambiente, en cada uno de los lados de la barrera transparente se colocó una figura geométrica, al lado de una de las figuras geométricas se habilitó una puerta para permitir la entrada al nuevo ambiente (figura 2).

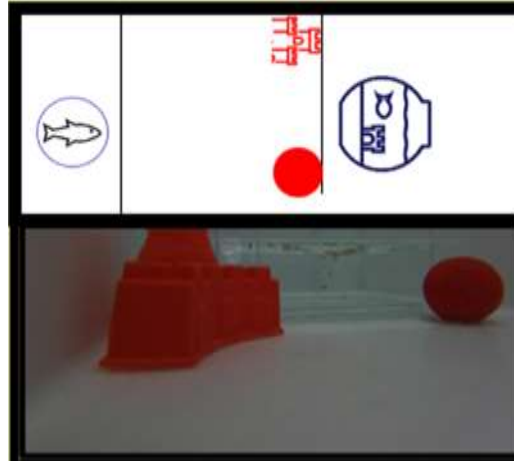


Figura 2.
Aparato para prueba de aprendizaje y aprendizaje inverso.

Esta prueba fue adaptada de Hirata et al. (2016), y consistió en colocar un pez en el extremo inicial del tanque y evaluar el tiempo en segundos (latencia) que demora en alcanzar el ambiente nuevo ubicado detrás de barrera transparente. En el caso del estudio se utilizó como estímulo un grupo de peces en una pecera plástica de siete litros la cual fue ubicada en el extremo del tanque detrás de la barrera trasparente (Versace et al. 2007). La prueba fue aplicada durante cuatro días consecutivos. En la prueba de aprendizaje inverso el aparato de prueba y la variable evaluada fueron similares a las descritas en la prueba de discriminación visual. El procedimiento se modificó realizando cambio de posición de las figuras geométricas y la puesta para ingresar al ambiente nuevo.

Los datos obtenidos se tabularon en una hoja de cálculo de Microsoft Excel® 2021. El análisis estadístico, se realizó con R 2.12 (R-Development-Core-Team 2021), Statistica versión 10 (StatSoftV10) y los gráficos mediante Graph Pad Prism V.8.0.0 (San Diego, CA, USA). La distribución porcentual de fenotipos de lateralización cerebral fue evaluada con la prueba de Chi Cuadrado. Los valores de latencia para ingresar en ambiente nuevo en la prueba de discriminación visual y aprendizaje inverso se les verificó la normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk, y posteriormente, la homocedasticidad de varianzas con la prueba de Levene. La variable mostró una distribución no normal y fue analizada utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y corregida con la prueba de Dunn's. Los resultados se expresan como media \pm EE (Error estándar). Se empleó un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Resultados

Prueba de lateralización

Los peces lateralizados (figura 3) representaron el 88 % de la población estudiada ($\chi_1^2=115.5$; $p<0.001$). El porcentaje de individuos que se orientó hacia la izquierda o derecha no mostraron diferencias significativas ($\chi_1^2=1.28$; $p=0.25$, figura 4). Existen diferencias significativas en la distribución porcentual de orientaciones hacia la izquierda o derecha en cada uno de los grupos lateralizados ($\chi_1^2=54.43$; $p<0.001$, figura 5).

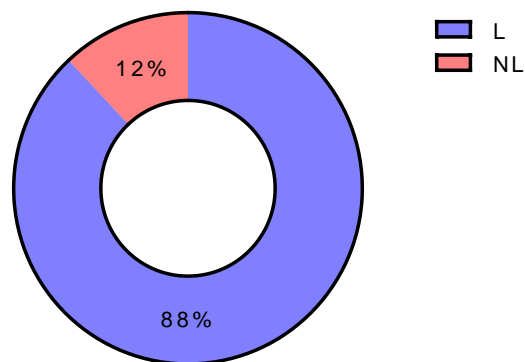


Figura 3.

Distribución porcentual de animales lateralizados (L) y no lateralizados (NL) en la población estudiada.

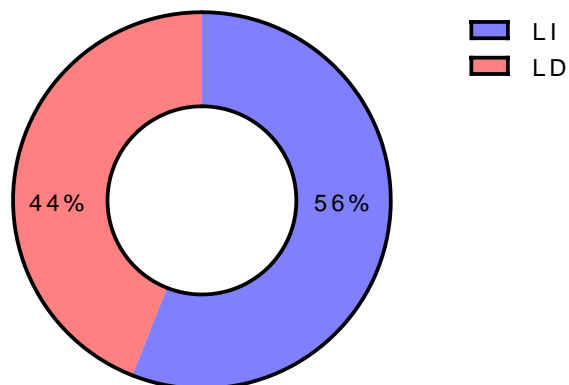


Figura 4.

Distribución porcentual de individuos lateralizados izquierdo (LI) y derecho (LD) del total de la población lateralizada.

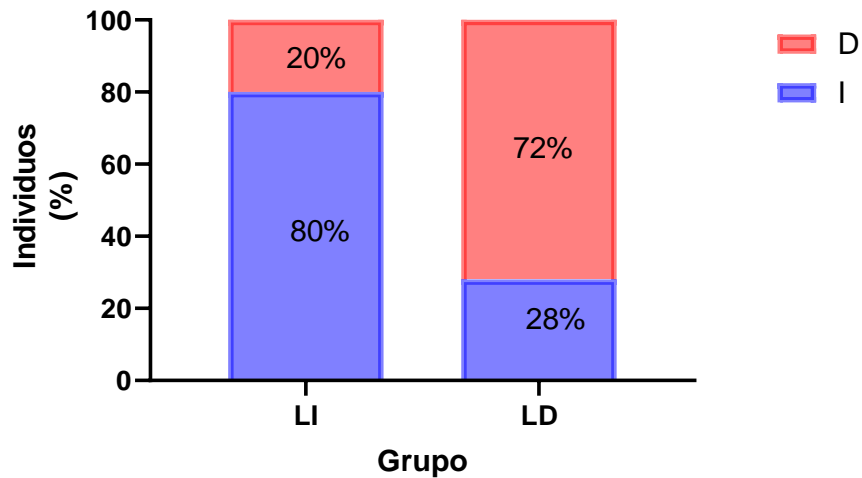


Figura 5.
Distribución porcentual de las orientaciones izquierda o derecha, tomadas por los individuos durante la prueba de lateralización de cada uno de los grupos lateralizados.

Prueba de discriminación visual de aprendizaje

La figura 6, muestra que existen diferencias significativas en las repeticiones en la prueba de discriminación visual ($K-W=6.65$; $p=0.03$). No se encontraron diferencias significativas en la prueba de discriminación visual entre los tratamientos ($K-W=3.97$; $p=0.13$). La interacción tratamiento por repeticiones no mostró diferencias significativas ($K-W=14.55$; $p=0.20$).

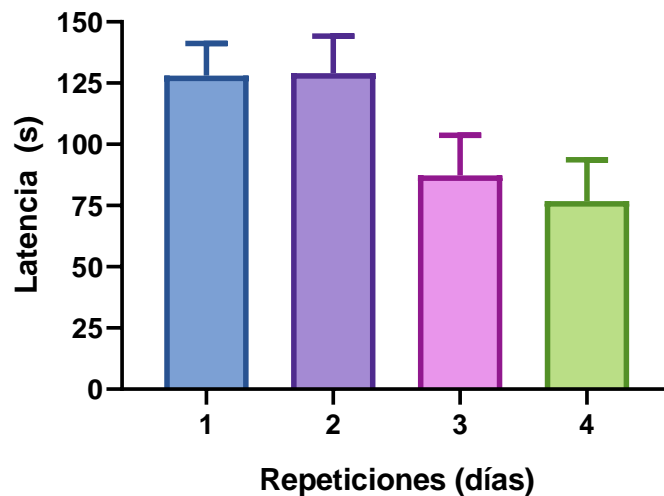


Figura 6.
Latencia en segundos (s) durante los cuatro días que se aplicó la prueba de aprendizaje visual.

Prueba de aprendizaje inverso

En la prueba de aprendizaje inverso los fenotipos (figura 7) mostraron diferencias significativas en las latencias de entrada al nuevo ambiente ($K-W=6.65$; $p=0.03$). No se encontraron diferencias significativas en las repeticiones ($K-W=0.99$; $p=0.80$), ni en la interacción tratamiento por repeticiones ($K-W=10.25$; $p=0.50$).

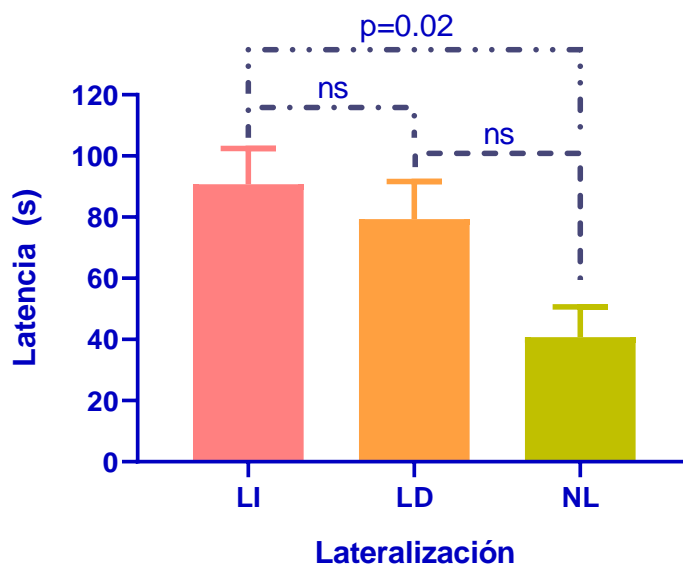


Figura 7.

Latencia en segundos en la prueba de aprendizaje inverso entre individuos lateralizados izquierdos (LI) lateralizados derechos (LD) y no lateralizados (NL). Valores de $p<0.05$ son significativos.

Discusión

Los resultados de estudio muestran que un 88% de la población estudiada presentaba lateralización, lo cual no es sorprendente si tomamos en cuenta que la lateralización cerebral permite ventajas competitivas en entornos que muestran desafíos ambientales. Estos resultados pueden estar en línea



con lo propuesto por (Dadda & Bisazza, 2006) indicando que los peces lateralizados pueden realizar un seguimiento del depredador con un ojo y procesar esta información en el hemisferio opuesto, lo que permite el procesamiento de otras tareas, como la formación de bancos o la búsqueda de alimento, con el hemisferio restante.

Los individuos no lateralizados, en comparación, tienden a cambiar entre tareas y usan ambos ojos. En ese mismo contexto se indicó que en *Poecilia reticulata* la lateralización aumenta las habilidades de los individuos para la formación de grupos (Gatto et al. 2019). En la prueba de cognición de discriminación visual no observamos diferencias entre los grupos lateralizados y no lateralizados, sin embargo, observamos una reducción gradual de la latencia para ingresar en un ambiente nuevo que puede estar asociada a un proceso de habituación (Murphy & Arkins, 2007). En este sentido se ha demostrado que los factores estresantes repetidos desensibilizan a los peces y moderan las respuestas neuroendocrinas a factores estresantes similares lo que comúnmente se conoce como habituación (Staven et al. 2019). La habituación, medida como respuestas neuroendocrinas desensibilizadas, por ejemplo, reducción de la secreción de cortisol durante interacciones depredadoras repetidas, se ha demostrado previamente en especies modelo de pez cebra *Danio rerio* Hamilton, 1822 (Barcellos et al. 2010).

Respecto a las pruebas de aprendizaje inverso detectó variabilidad en la capacidad cognitiva entre los grupos lateralizados izquierdo y los no lateralizados. Los peces no lateralizados mostraron menor latencia en ingresar al ambiente nuevo que los peces lateralizados izquierdo. Al realizar la inversión de la puerta para ingresar al ambiente nuevo, ésta quedaba en el lado opuesto al ojo mayormente utilizado por los peces lateralizados izquierdo lo cual podría explicar la mayor latencia en este grupo. Otra posible explicación es que nosotros utilizamos como estímulo otros peces y de acuerdo con un modelo propuesto por (Bisazza et al. 1997), según el cual los peces poecílicos tienden a usar el ojo derecho durante la fijación de estímulos biológicamente relevantes, como una hembra o un depredador, en nuestro estudio la ubicación de la entrada en la prueba de aprendizaje inverso afectaría aquellos peces que dependen más del ojo izquierdo.

La menor latencia para ingresar a un ambiente nuevo en los peces no lateralizado puede deberse a que cuando existe incremento en los niveles de miedo la información es procesada por un solo hemisferio



(Brown & Bibost, 2014), en nuestro caso al invertir la entrada al nuevo ambiente incremento los niveles de estrés de los animales lo que pudo darles ventajas a los peces no lateralizados. En este contexto (Dadda et al. 2009), reportaron que en una especie de pez individuos no lateralizados superan a los individuos lateralizados tanto en la elección de cardúmenes bilaterales que los individuos lateralizados.

Conclusión

Los resultados indican que la lateralización cerebral tiene un efecto en el aprendizaje, los peces lateralizados izquierdos mostraron mayor latencia para entrar en un ambiente nuevo en la prueba de reversión, sugiriendo una menor capacidad de memoria espacial para evaluar el nuevo entorno lo cual apoya resultados de previos estudios.

Referencias

- Amira, A. G., Gareth, P. P., Jashim, U., Eloise, R., Harriet, D., & Clive, J. C. P. (2018). A forced lateralisation test for dairy cows and its relation to their behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*, 207, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2018.06.008>
- Barcellos, L. J. G., Ritter, F., Kreutz, L. C., & Cericato, L. (2010). Can zebrafish *Danio rerio* learn about predation risk? The effect of a previous experience on the cortisol response in subsequent encounters with a predator. *Journal of Fish Biology*, 76(4), 1032–1038. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02542.x>
- Berlinghieri, F., Panizzon, P., Penry-Williams, I. L., & Brown, C. (2021). Laterality and fish welfare - A review. *Applied Animal Behaviour Science*, 236, 105239. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2021.105239>
- Bisazza, A., Pignatti, R., & Vallortigara, G. (1997). Laterality in detour behaviour: Interspecific variation in poeciliid fish. *Animal Behaviour*, 54(5), 1273–1281. <https://doi.org/10.1006/anbe.1997.0522>
- Brown, C. (2005). Cerebral lateralisation, “social constraints”, and coordinated anti-predator responses. *Behavioral and Brain Sciences*, 28(4), 591–592. <https://doi.org/10.1017/S0140525X05240104>
- Brown, C., & Bibost, A. L. (2014). Laterality is linked to personality in the black-lined rainbowfish, *Melanotaenia nigrans*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 68(6), 999–1005. <https://doi.org/10.1007/s00265-014-1712-0>
- Dadda, M., & Bisazza, A. (2006). Does brain asymmetry allow efficient performance of simultaneous tasks? *Animal Behaviour*, 72(3), 523–529. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2005.10.019>
- Dadda, M., Zandonà, E., Agrillo, C., & Bisazza, A. (2009). The costs of hemispheric specialization in a fish.



- Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1677), 4399–4407.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1406>
- Ferrari, M. C. O., McCormick, M. I., Mitchell, M. D., Allan, B. J. M., Gonçalves, E. J., & Chivers, D. P. (2017). Daily variation in behavioural lateralization is linked to predation stress in a coral reef fish. *Animal Behaviour*, 133, 189–193. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2017.09.020>
- Gatto, E., Agrillo, C., Brown, C., & Dadda, M. (2019). Individual differences in numerical skills are influenced by brain lateralization in guppies (*Poecilia reticulata*). *Intelligence*, 74(April), 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.intell.2019.04.004>
- Hirata, M., Tomita, C., & Yamada, K. (2016). Use of a maze test to assess spatial learning and memory in cattle: Can cattle traverse a complex maze?. *Applied Animal Behaviour Science*, 180, 18-25.
- Irving, E., & Brown, C. (2013). Examining the link between personality and laterality in a feral guppy *poecilia reticulata* population. *Journal of Fish Biology*, 83(2), 311–325. <https://doi.org/10.1111/jfb.12165>
- Magat, M., & Brown, C. (2009). Laterality enhances cognition in Australian parrots. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 276(1676), 4155-4162.
- Murphy, J., & Arkins, S. (2007). Equine learning behaviour. *Behavioural Processes*, 76(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2006.06.009>
- Reddon, A. R., Hurd, P. L., Reddon, A. R., & Hurd, P. L. (2008). Aggression , sex and individual differences in cerebral lateralization in a cichlid fish Aggression , sex and individual differences in cerebral lateralization in a cichlid fish, 338–340. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0206>
- Roche, D. G., Binning, S. A., Strong, L. E., Davies, J. N., & Jennions, M. D. (2013). Increased behavioural lateralization in parasitized coral reef fish. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 67(8), 1339–1344. <https://doi.org/10.1007/s00265-013-1562-1>
- Roche, D. G., Amcoff, M., Morgan, R., Sundin, J., Andreassen, A. H., Finnøen, M. H., Lawrence, M. J., Henderson, E., Norin, T., Speers-Roesch, B., Brown, C., Clark, T. D., Bshary, R., Leung, B., Jutfelt, F., & Binning, S. A. (2020). Behavioural lateralization in a detour test is not repeatable in fishes. *Animal Behaviour*, 167, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2020.06.025>
- Staven, F. R., Nordeide, J. T., Imsland, A. K., Andersen, P., Iversen, N. S., & Kristensen, T. (2019). Is habituation measurable in lumpfish *Cyclopterus lumpus* when used as cleaner fish in atlantic salmon *salmo salar* aquaculture? *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00227>
- Versace, E., Morgante, M., Pulina, G., & Vallortigara, G. (2007). Behavioural lateralization in sheep (*Ovis aries*). *Behavioural Brain Research*, 184(1), 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.06.016>



The biometry of *Cardisoma crassum* (Brachyura: Gecarcinidae) from two folkloric festivals in Veraguas, Panama

La biometría de *Cardisoma crassum* (Brachyura: Gecarcinidae) de dos festivales folclóricos en Veraguas, Panamá

Roberto Carlos Lombardo González^{1,2}

<https://orcid.org/0000-0002-0279-8621>

¹Universidad de Panamá. Centro Regional Universitario de Veraguas. Centro de Capacitación, Investigación y Monitoreo de la Biodiversidad (CCIMBIO).

²Sistema Nacional de Investigación de la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SNI-SENACYT)
Autor correspondiente: roberto.lombardo@up.ac.pa

Enviado el: 30 de noviembre de 2023 Aceptado el: 2 de enero de 2024

<https://doi.org/10.59722/rcvn.v1i2.705>

Abstract

This study explores the biometry of *Cardisoma crassum* individuals presented in two folkloric festivals within the Montijo Gulf in 2022 and 2023. Crabs in the Rio de Jesús (RJ) festival from 2022 exhibited a male biased sex ratio, contrasting Montijo's (MO) even sex ratio in 2023. Carapace widths were similar between festivals (RJ, 65.59 ± 6.56 mm; MO: 64.29 ± 5.92 mm). Sex-based size variations were consistent within years but not between years. Localities showed significant size and sex ratio differences, while transportation distance to the festival venues did not correlate with crab size. Additionally, a comparison between current data and previous studies from 2014–2015, 2021 and 2022, highlighted size differences among sites might not be related to yearly increasing crab demand; instead, site-specific extraction pressure may be an underlying factor. Festivals consumed approximately 198 crab bundles in Rio de Jesús in 2022 ($\approx 2,376$ individuals) and an estimated 207 bundles in Montijo in 2023 ($\approx 2,484$ individuals). This study unveils complex dynamics in *C. crassum* populations at the local level, encompassing sex ratios, size variations, and economic dimensions within festival contexts. Understanding these multifaceted dynamics is crucial for effectively managing these coastal crab populations in the future.

Keywords

Blue crab, cephalothorax, fishery, Montijo, Rio de Jesús.

Resumen

Este estudio analiza la biometría de *Cardisoma crassum* en dos festivales folclóricos del Golfo de Montijo en 2022 y 2023. En el festival de Río de Jesús (RJ) de 2022, los cangrejos mostraron una marcada tasa de sexos parcializada hacia los machos, a diferencia de Montijo (MO) en 2023, donde la proporción entre sexos fue equilibrada. El ancho del caparazón fue similar (RJ: 65.59 ± 6.56 mm; MO: 64.29 ± 5.92 mm) entre festivales. Las variaciones de talla según el sexo fueron consistentes dentro de cada año, pero no entre años. Se observaron diferencias en talla y proporción de sexos entre localidades, mientras que la



distancia de transporte hasta los festivales no estuvo asociada a variación en tallas. La comparación entre datos actuales y 2014-2015, 2021 y 2022, resaltó que diferencias de talla entre sitios podrían no estar relacionadas con un aumento anual en la demanda de cangrejos; en cambio, la presión de extracción específica por sitio podría ser un factor importante. Se consumieron aproximadamente 2,376 cangrejos en Río de Jesús durante 2022 y unos 2,484 en Montijo en 2023. Este estudio revela dinámicas complejas en las poblaciones de *C. crassum* a nivel local, abordando proporciones de sexos, variaciones en talla y aspectos económicos de festivales. Comprender estas dinámicas será clave para gestionar estas poblaciones en el futuro.

Palabras clave

Cangrejo azul, cefalotórax, pesquería, Montijo, Río de Jesús.

Introduction

The Blue Crab, *Cardisoma crassum*, is an integral fishery resource and a prevalent resident of the mangrove ecosystems in the Panamanian Pacific (Lombardo & Rojas, 2022; Vega et al. 2018). Blue crabs are ecosystem engineers (McGaw et al. 2019) that play an essential role in the intricate balance of mangrove ecosystems, through activities such as turning over organic material (Lindquist et al. 2009; Robertson, 1986), and influencing soil chemistry through biological activity (Green, 2004b; Lindquist et al. 2009; Perger et al. 2013; Smith et al. 1991).

This species is captured mainly for subsistence in coastal communities (Hendrickx, 1995) through manual methods and artisanal fishing gear (Vázquez-López & Ramírez-Pérez, 2015; Vega et al. 2018). However, the fishery of *C. crassum* remains unregulated, leading to uncertainty about its population status. Despite its socioeconomic value for coastal communities (Lombardo & Cedeño, 2023), only three field studies on *C. crassum* from Panama have been published. Vega et al. (2018) described the artisanal fishery of the blue crab, Lombardo & Rojas (2022) reported the first occurrence of burrow fidelity in *C. crassum*, while Lombardo & Cedeño (2023) demonstrated size-based segregation; all reports originated from the Montijo Gulf.

Within the gulf, two folkloric festivals occur in October and November: the "Festival del Cangrejo y el Marisco Montijano" in Montijo and the "Festival Mi Ranchito" in Río de Jesús. These festivals celebrate the blue crab as a cultural and local gastronomic icon, emphasizing its significance as a fishery resource alongside its cultural value (figure 1A-B). Although these events potentially spike the demand for *C. crassum*, there exists no formal or continuous record detailing the number of crabs sacrificed, their sizes,



or places of origin. The sole published report by Vega et al. (2018) estimates the utilization of approximately 4,800 crabs during 2014 and 2015 in Montijo.

Negative impacts associated with tourism and gastronomic festivals have been documented in other brachyurans and anomurans, like the blue crab *Callinectes sapidus* (Paolisso, 2007) and the coconut crab *Birgus latro* (Liu & Lu, 2014), suggesting potential risks for *C. crassum*. Therefore, understanding the impact of extraction on *C. crassum* is crucial, as crustacean populations subject to non-industrialized extraction methods can still face overexploitation (João et al. 2022; Lima et al. 2021). Thus, further insight into the potential impact of episodic demand surges for *C. crassum* is essential for effective future fishery management and conservation (Boenish et al. 2022; Heppell et al. 2005).

Given the typically extended lifespans and delayed reproduction of most gecarcinids (Hartnoll, 1988, 2001; Vogt, 2019), it's plausible that *C. crassum* is also a slow-growing, long-lived species (Vogt, 2012, 2019) potentially reproducing later in life (Beverton, 1987; Charnov, 1993; Charnov & Berrigan, 1990). This is relevant because intense extraction practices could significantly accelerate population declines in species exhibiting such life history strategies (Beverton, 1987; Heppell et al. 2005; Vogt, 2012). Hence, the potential combination of a slow growth rate and extended lifespan in *C. crassum* raises concerns about its susceptibility to rapid population declines during yearly demand spikes, such as those occurring during the aforementioned festivals. The current study aims to enhance our understanding of crab biometrics observed during the Montijo and Rio de Jesús festivals. Additionally, it seeks to explore potential trends by comparing records from previous studies in the Montijo Gulf alongside 2022–2023 observations.

Materials and Methods

Study site

According to the “Instituto Nacional de Estadística y Censo” (INEC), in 2023 the total population of Montijo was 6,784 inhabitants, while Rio de Jesús totaled 4,822 residents (INEC, 2023). The Montijo and Rio de Jesús counties extend into the Montijo Gulf, which is also a RAMSAR site of international ecological significance, spanning an area of 808 km² (RAMSAR, 2023). The area between both counties



is irrigated by the San Pablo and San Pedro River watersheds (figure 1C). According to Köppen's classification, the climate within the Montijo Gulf is defined as humid-tropical (Beck et al. 2018). This region is notably characterized by an annual precipitation exceeding 2,500 mm, coupled with temperatures fluctuating between 24.8 and 35.9 °C (Vega et al. 2021).

Sampling protocol

The initial sampling campaign took place in Rio de Jesús in November 2022, while the subsequent sampling occurred in Montijo, October 2023. Unfortunately, the November 2023 edition of the “Mi Ranchito” festival in Rio de Jesús was canceled due to nationwide protests against metallic mining, preventing the collection of data. The sampling process commenced with simple interviews aimed at familiarizing the participants with the study's objectives. These inquiries were directed toward crucial information, such as the estimated number of acquired crabs, their cost, and their origins. In Rio de Jesús, data collection spanned the three-day festival period, from November 18th–20th, 2022. Conversely, in Montijo, data was gathered earlier, from October 20th–22nd, 2023, to circumvent roadblocks and protests against mining, which were anticipated during the actual festival dates a week later.

Biometrics and analysis

Initially, the sex of captive crabs was determined by the shape of the abdomen (Hendrickx, 1995), and the reproductive state of the females (ovigerous or not) was recorded, as well as, the carapace width-length. A Vernier digital caliper (0.1 mm) was used to measure the width (CW) and length (CL) of the carapace. To avoid resampling, the crabs were temporarily marked with white chalk on the carapace. Chi-square tests were used to compare the proportion of sexes. Variances between groups were tested with Bonnett's or an F-test, depending on normality (Anderson & Darling, 1952). Differences in biometrics between sexes from the same site were explored using the student's t-test, while ANOVA was used to test for differences between males and females (four groups) from Rio de Jesús and Montijo. The CW and CL of the crabs were compared between sites, sex, and years. Site comparisons specifically emphasized exploring within-sample variations rather than attempting to draw population-level inferences. This cautious approach considers the uncertainty surrounding whether the samples accurately represent the population's status. The biometry of crabs from sites further away from the festival venues might be less influenced by extraction; thus, regression was applied to assess the

relationship between crab size and site of origin distance to the festival venues. To determine such distance, the ruler tool in Google Earth Pro was utilized in its path mode (Google, 2022). This involved tracing the trails, streets and main roads from the crabs' site of origin to their corresponding festival venue, calculating the total kilometers traveled.

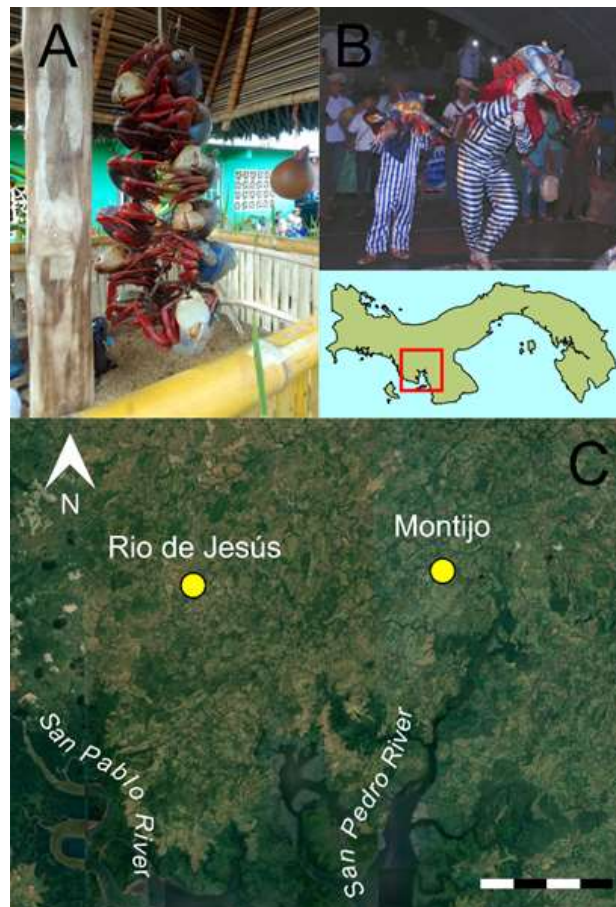


Figure 1. Highlights of folkloric festivals and the study site location. **A.** Traditional crab bundle showcased at the 'Mi Ranchito' festival in Rio de Jesús, November 2022. **B.** Folkloric blue crab dance, Rio de Jesús, November 2014. **C.** Sampling sites at Montijo (17 N 494372.00 m E 883306.00 m N) and Rio de Jesús (17 N 482446.00 m E 882649.00 m N). Scale bar = 20 km (Google, 2022).

To estimate the quantity of crabs arriving to the festivals, as well as to project market prices and profits, informal surveys were conducted among food stand owners and festival organizers. Traditionally, crabs are bundled in groups of 12 (figure 1A). This count served as a reference point to approximate the total

number of crabs and calculate profits per festival. This was achieved by multiplying the reported number of bundles and minimum price provided by food stand owners and festival organizers.

Results

Biometry from Rio de Jesús and Montijo festivals

In 2022, a total of 78 *C. crassum* individuals were measured in Rio de Jesús (49♂, 29♀) with a significantly skewed sex ratio towards males (1.7:1, $\chi^2 = 5.13$, $P = 0.024$). The average CW and standard deviation from Rio de Jesús in 2022 were 65.59 ± 6.56 mm, with a minimum and maximum of 53.13 to 83.42 mm, respectively; the average CL was 54.0 ± 5.48 mm, ranging 44.80–68.93 mm.

In 2023, a total of 116 crabs were measured in Montijo (67♂, 49♀), where no significant difference was found in the sex ratio (1.4:1, $\chi^2 = 2.79$, $P = 0.095$). Subsequently, the average crab CW from Montijo in 2023 was 64.29 ± 5.92 mm (51.58–77.89 mm), while the CL averaged 51.77 ± 6.07 mm (36.64–66.46). In Montijo, specifically from La Caleta, a female carrying eggs measuring 59.32 mm CW was recorded.

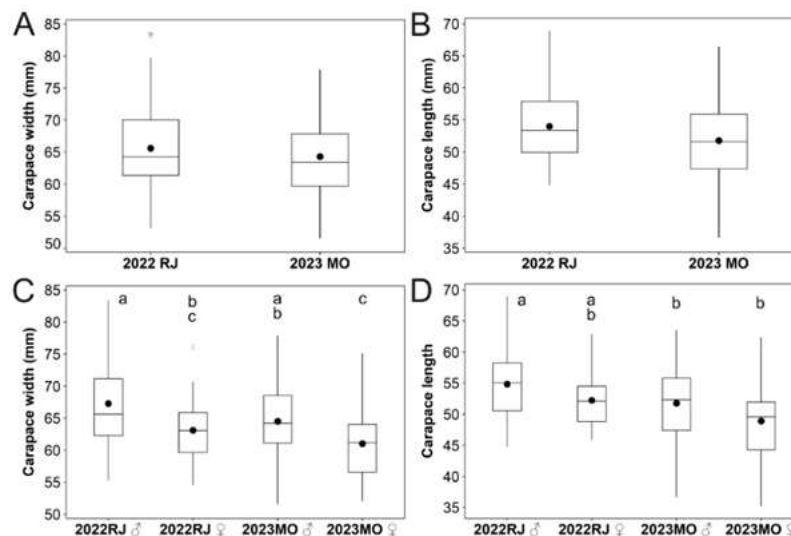


Figure 2.

Cardisoma crassum carapace width and length comparisons between years and the sexes during “Mi Ranchito” (Rio de Jesús = RJ) and “Festival del Cangrejo y el Marisco Montijano” (Montijo = MO) festivals, Veraguas, Panama. Different superscript letters between means show significant differences.

Contrast between festivals

There was no difference in CW between crabs from Rio de Jesús and Montijo festivals (CW, $t = 1.44$, d.f. = 192, $P = 0.151$); however, the crabs from Rio de Jesús (2022) were larger in CL (2.23 mm difference) than those from Montijo (2023) (CL, $t = 2.61$, d.f. = 192, $P = 0.010$; figure 2A-B). There was variation between the sexes in CW from Rio de Jesús and Montijo (ANOVA, $F_{(1,3)} = 7.54$, $P < 0.001$), where males were larger than the females within years; however, there was no difference between males, nor females across 2022 to 2023 (figure 2C). For CL a different variation pattern emerged (ANOVA, $F_{(1,3)} = 7.02$, $P < 0.001$), where Rio de Jesús males from 2022 were larger than Montijo 2023 males and females. Nonetheless, pairwise comparison indicated no difference between the sexes within years from the same site (figure 2D).



Figure 3. Sites of origin of *Cardisoma crassum* crabs that arrived at the “Mi Ranchito” (Rio de Jesús, purple) and “Festival del Cangrejo y el Marisco Montijano” (Montijo, yellow) festivals in the Montijo Gulf, Veraguas, Panama. The red square represents the origin (Ponuga) of data from 2021 by (Lombardo & Rojas, 2022). Scale = 10 km (Google, 2022).

Contrasts between sites of origin

The crabs available in the Rio de Jesús festival came from two different sites: Hicaco (46 %) and Las Huacas (54 %). The sample from the Montijo festival contained crabs from three sites: Soná (34 %), La Caleta (40 %) and Puerto Vidal (26 %) (figure 3); see table 1 for a CW-CL summary.

At the local level the sex ratio was significantly skewed towards male crabs only in the Hicaco site, where the largest male was also captured; the smallest individual, a male, came from Soná. Size differences



between the sexes, at the local level, were only detected in crab CW in Las Huacas and Puerto Vidal (table 1).

When male crab CW was compared according to their site of origin, a significant difference was found (ANOVA, $F_{(4,111)} = 8.26$, $P < 0.001$); however the pairwise (Tukey) comparisons showed that crabs arriving in Montijo from Soná were smaller, indicating that they were the primary contributor to this observed difference (table 2).

Table 1.

Statistical summary of the carapace width (CW) and length (CL) by site of origin and sexes in *Cardisoma crassum* from two folkloric festivals in 2022 and 2023 from the Montijo Gulf, Veraguas, Panama. Hicaco (HI), Las Huacas (HU), Soná (SO), La Caleta (CA), Puerto Vidal (VI). SD is the standard deviation and asterisk represents significance ($\alpha = 0.05$).

Year	UTM coordinates	Variable	N	Mean \pm SD	Min-Max	Sex ratio	Contrast
2022	17 N 477532.89 m E 844499.88 m N	CW HI ♂	25	69.15 \pm 8.12	55.26 - 83.42	2.3:1 $\chi^2 = 5.44$ P = 0.020*	t = 1.83 d.f. = 34 P = 0.076
		CW HI ♀	11	64.15 \pm 5.91	54.56 - 76.09		t = 1.33 d.f. = 34 P = 0.193
		CL HI ♂	25	56.63 \pm 6.61	45.63 - 68.93		
		CL HI ♀	11	53.67 \pm 4.89	47.46 - 62.91		
	17 N 484204.51 m E 871138.31 m N	CW HU ♂	24	65.34 \pm 4.00	59.90 - 74.35	1.3:1 $\chi^2 = 0.86$ P = 0.355	t = 2.19 d.f. = 40 P = 0.034*
		CW HU ♀	18	62.46 \pm 4.47	55.13 - 70.71		t = 1.30 d.f. = 40 P = 0.201
		CL HU ♂	24	52.96 \pm 3.98	44.80 - 58.25		
		CL HU ♀	18	51.37 \pm 3.79	45.87 - 58.11		
17 N 468271.70 m E 880734.99 m N	CW SO ♂	20	60.28 \pm 4.63	51.58 - 67.85	1:1 $\chi^2 = 0.00$ P = 1.00	t = 1.71 d.f. = 38 P = 0.095	
	CW SO ♀	20	57.74 \pm 4.76	52.07 - 68.03		t = 1.32 d.f. = 38 P = 0.193	
	CL SO ♂	20	48.86 \pm 5.64	41.65 - 64.44			
	CL SO ♀	20	46.40 \pm 6.11	35.28 - 59.28			
2023	17 N 490841.05 m E 875650.74 m N	CW CA ♂	28	66.42 \pm 5.19	56.84 - 75.41	1.6:1 $\chi^2 = 2.17$ P = 0.140	t = 1.18 d.f. = 44 P = 0.246
		CW CA ♀	18	64.59 \pm 5.07	59.26 - 75.15		t = 1.27 d.f. = 44 P = 0.212
		CL CA ♂	28	53.11 \pm 5.90	36.64 - 61.40		
		CL CA ♀	18	50.90 \pm 5.60	41.93 - 62.40		
17 P 433749.28 m E 886554.80 m N	CW VI ♂	19	69.02 \pm 5.64	58.30 - 77.89	1.7:1 $\chi^2 = 2.13$ P = 0.144	t = 2.03 d.f. = 28 P = 0.052*	
	CW VI ♀	11	64.78 \pm 5.26	54.97 - 75.72		t = 0.57 d.f. = 28 P = 0.573	
	CL VI ♂	19	55.37 \pm 4.74	43.20 - 63.56			
	CL VI ♀	11	54.19 \pm 6.62	42.51 - 66.46			

Male CW from Hicaco, La Huaca, La Caleta and Puerto Vidal were not significantly different; the same pattern was detected in the females (ANOVA, $F_{(4,73)} = 6.14$, $P < 0.001$). Male CL showed significant



variation among sites of origin (ANOVA, $F_{(4,111)} = 6.21$, $P < 0.001$); however, such variation was only significant in two pairwise comparisons against Soná: Hicaco and Puerto Vidal. Both male and female CL from Soná were smaller than the rest of the sites. For female CL (ANOVA, $F_{(4,73)} = 5.14$, $P = 0.001$) only three pairwise comparisons resulted significant against Soná: Hicaco, Las Huacas and Puerto Vidal (table 2).

Crabs from Puerto Vidal were transported an estimated 124.7 Km to Montijo, while crabs from Hicaco were shipped an estimate of 88.6 Km to Rio de Jesús; however no significant relationship was found between distance and average crab size ($r^2 = 0.242$, $F_{(1,4)} = 0.96$, $P = 0.400$).

Table 2.

Analysis of variance summary of carapace width (CW) between sites of origin for *Cardisoma crassum* in two folkloric festivals including 2021 data (Lombardo & Rojas, 2022) from Ponuga. Hicaco (HI), Las Huacas (HU), Soná (SO), La Caleta (CA), Puerto Vidal (VI), Ponuga (PA). SD is the standard deviation and asterisk represents significance.

Year	CW	N	Mean ± SD	Contrast	Difference	Tukey ($\alpha = 0.05$)
2021	PA	164	62.69 ± 6.07	HI - PA	4.93	$t = 4.56$, $P < 0.001^*$
				HU - PA	1.17	$t = 1.15$, $P = 0.859$
				SO - PA	-3.58	$t = -3.42$, $P = 0.008^*$
				CA - PA	3.02	$t = 3.08$, $P = 0.025^*$
				VI - PA	4.78	$t = 4.10$, $P = 0.001^*$
2022	HI	36	67.62 ± 7.79	HU - HI	-3.76	$t = -2.82$, $P = 0.054^*$
				SO - HI	-8.52	$t = -6.27$, $P < 0.001^*$
				CA - HI	-1.91	$t = -1.46$, $P = 0.687$
				VI - HI	-0.15	$t = -0.10$, $P = 1.000$
				SO - HU	-4.75	$t = -3.64$, $P = 0.004^*$
2023	SO	39	59.10 ± 4.83	CA - HU	1.85	$t = 1.48$, $P = 0.680$
				VI - HU	3.61	$t = 2.57$, $P = 0.104$
				CA - SO	6.6	$t = 5.16$, $P < 0.001^*$
2023	CA	46	65.71 ± 5.17	VI - SO	8.37	$t = 5.86$, $P < 0.001^*$
				VI - CA	1.76	$t = 1.28$, $P = 0.797$



In either festival, around 18–20 food stands served the public, and according to the owners, each stand procures approximately 10 crab bundles, while the organizing committee also purchases ≈ 30 bundles; each containing 12 crabs. During 2022, in Rio de Jesús, an estimate 198 crab bundles were acquired for the festival, totaling $\approx 2,376$ individuals. Depending on the size of crabs in the bundle, the local prize varied widely from 8,10,14 up to 20 USD; thus, a precise estimate of profit was not possible. However, if a bundle cost ≈ 8 USD (minimum), then extractors/resellers were estimated to profit at least 1,584 USD. In 2023, it is estimated 207 crab bundles were consumed in the Montijo festival, totaling $\approx 2,484$ individuals; thus, by a similar price metric, extractors and/or resellers made at least 1,656 USD in profit.

Discussion

The earliest published record (Vega et al. 2018) of crab statistics from the Montijo Gulf festivals dates back to 2014–2015. Inconsistency of records resulted in an unfortunate eight-year gap (2015–2023) in data on the number and biometry of crabs captured for the festivals, and in general within the gulf. According to festival organizers, from 2007 to 2013, the number of crabs used each year in Montijo varied at around 2,400. In 2014, organizers reported to Vega et al. (2018) the acquisition of approximately 3,000 crabs, while in 2015, organizers bought roughly 1,800 individuals. Comparatively, total crab estimates in the festival editions hint at a steady demand with mild variability throughout the years. Considering that the Rio de Jesús ($\approx 2,376$ ind. In 2022) and Montijo ($\approx 2,484$ ind. In 2023) festivals occur in a year, the populations of *C. crassum* in the gulf might face an approximate annual loss of 4,860 crabs due to fishing mortality related to the festivals. At present, the correlation between the annual demand for crab and its impact on the population of *C. crassum* remains uncertain. However, it's conceivable that the extraction process could affect this species, leading to potential consequences such as diminished size structure, altered sex ratios, and reduced fecundity (Beverton, 1987; Pauly & Froese, 2014; Sato & Goshima, 2006). Similar effects resulting from extraction have been reported in other land crab species, such as *Birgus latro* (Sato & Yoseda, 2010) and *Ucides cordatus* (Diele et al., 2005), suggesting a possibility of similar repercussions for *C. crassum*.



If the effect of festival demand is substantial, then the size of crabs is expected to decrease as extraction is biased towards larger sizes; usually males (Govender et al. 2008; Hartnoll et al. 2006).

Hypothetically, impacted populations would suffer size structure shifts, where homogeneity in size between the sexes is expected. In the Montijo Gulf, typical carapace width difference between the sexes has been observed at the regional level, where males were larger than females (Lombardo & Cedeño, 2023; Lombardo & Rojas, 2022; Vega et al. 2018). Interestingly, such shift towards homogeneity in size structure was not observed in the present study; there was variation in carapace width between the sexes during 2022 in Rio de Jesús and 2023 in Montijo, with males being consistently larger than females. Thus, large size extraction effects are still below critical significance.

Furthermore, there were no discernible differences among males or females across 2022 and 2023, and in general, no significant reduction in carapace width was noted between the crabs from the festivals in 2022 and 2023. These results are in contrast to the expected effect of a hypothetical high crab demand; however, the results must be interpreted with caution, as it is difficult to rule out demand from festivals, mainly because the samples might not be representative of each site considered. However, when compiling the data between years, a decrease in crab size (2021-2023) was not detected. Larger average carapace width from 2014-2015 (Vega et al. 2018) and 2021 (Lombardo & Rojas, 2022) might be expected as well, but they do not square evenly with large crabs from 2022-2023. In this case, the crabs from 2021 (Ponuga) were significantly smaller than those from 2022-2023 (see Table 2). This local discrepancy through time implies the size structure of *C. crassum* might not be influenced by an increasing year-to-year extraction pressure. Alternatively, a future direction for research into this topic would assess the concentrated, site-specific extraction impact, which could have a significant effect in shaping the size structure of *C. crassum*, as shown in the carapace width comparisons by site. Determining correlates of accessibility, habitat degradation, land use and *C. crassum* size structure might yield interesting results in the future.

Crabs in the Rio de Jesús festival (2022) exhibited a male skewed sex ratio, while the sex ratio in Montijo (2023) was even. The sex ratio of *C. crassum* within the Montijo Gulf has been reported to be male biased in 2014 and 2015 (Vega et al., 2018), even in 2021 (Lombardo & Rojas, 2022), and male biased in 2022 (Lombardo & Cedeño, 2023). Normally, the sex ratio in brachyuran species tends to skew towards males



(Wenner, 1972). Variation in size and sex ratios may be explained by extraction effects, unequal growth due to divergent reproductive strategies between the sexes, variable maximum sizes, and lifespan (Diele et al. 2005; Ewers-Saucedo, 2019; Wenner, 1972). Female skewed sex ratios are often interpreted as another sign of extraction impact or habitat degradation (Pardo et al. 2017; Quiñones-Llópiz et al. 2021). In the region, sex ratios seem to vary between sites, but also seem to be independent of the year, suggesting possible differences in the sampling effort or extraction activity associated to particular sites; nonetheless, it is worth noting that to our knowledge, no study in Panama has reported a female biased sex ratio for *C. crassum*. This suggests, perhaps at the local level, populations might retain functional recovery capacity (Ewers-Saucedo, 2019; Wenner, 1972).

Among the crabs already present at the festival venues, we observed a gravid female, while the rest fell within the carapace width range (47.11–70.90 mm) documented for egg-carrying female crabs in Vega et al. (2018), Lombardo & Rojas (2022), and Lombardo & Cedeño (2023). A similar range was reported in Mexico (Vargas-Téllez & Vázquez-López, 2016) for ovigerous *C. crassum* females, between 46.40 and 71.48 mm, with an average of 59.7 ± 6.2 mm. These ranges for maturity are relevant because in *C. crassum* the carapace width is correlated with fecundity (Vargas-Téllez & Vázquez-López, 2016). Although more work remains to be done to confirm the age and size at first maturity, the maximum and average sizes in the present study suggest that a proportion of the females arriving at the festivals might be early breeding females. This has important implications concerning crab demand, in which fishing mortality has been shown to reduce individual size and consequently female reproductive potential (Hines et al., 2003; Hjelset, 2014; Jivoff, 2003).

It is unknown how long does it take for *C. crassum* to reach the minimum size for first maturity (46.40–47.11 mm? CW). Nevertheless, considering the life history of gecarcinids, high extraction pressure at the local level could have severe impacts as this group of land crabs is slow growing and long lived, reproducing later in life. For example, *Gecarcinus lateralis* and *Gecarcinus quadratus*, have expected lifespans of 10 years; *Cardisoma armatum*, is reported to live for 12 years (Rademacher & Mengedoht, 2011); *Gecarcinus ruricola*, has a lifetime of 15 years (Hartnoll et al. 2006); *Cardisoma guanhumí* (Wolcott, 1988) and *Gecarcoidea natalis*, (Green, 2004a; Linton & Greenaway, 1997; Wolcott, 1988) have estimated lifespans of 20 years (Vogt, 2012, 2019). This suggests there might be a risk for the recovery



potential of overfished *C. crassum* stocks if extraction remains unregulated (Ewers-Saucedo, 2019; Hines et al. 2003; Jivoff, 2003; Sato & Goshima, 2006).

Conclusions

- *Cardisoma crassum* holds significant importance as a fishery resource for coastal communities as demonstrated by the generation of profits for extractors and resellers throughout the years. It is also a celebrated figure in folkloric festivals highlighting its cultural value.
- Differences in crab size might be better explained by extraction effort associated with particular sites, not yearly increases in crab demand.
- No significant reduction in crab size was detected between festival years, contrary to the expected effects of high crab demand.
- Despite variations in sex ratios across different sites in the Montijo Gulf, the consistency in the absence of a female-biased ratio throughout multiple years suggests a level of resilience within the local populations.
- The observed crab carapace widths at festivals indicate potential prior maturity for all females, with indications of early breeding females. This raises concerns about fishing mortality affecting both individual size and future female reproductive potential.

Acknowledgments

We are grateful to Luz Maria Batista for her cooperation in meeting the food stand owners as well as Enrique Garrido, Nelly Reyes and José Batista for access to their crabs in Montijo. We also thank the owners of the restaurant El Gabriel in Rio de Jesús for access to their crabs.



References

- Anderson, T. W., & Darling, D. A. (1952). Asymptotic theory of certain “goodness of fit” criteria based on stochastic processes. *Annals of Mathematical Statistics*, 23(2), 193–212.
<https://doi.org/10.1214/AOMS/1177729437>
- Beck, H. E., Zimmermann, N. E., McVicar, T. R., Vergopolan, N., Berg, A., & Wood, E. F. (2018). Present and future köppen-geiger climate classification maps at 1-km resolution. *Scientific Data*, 5.
<https://doi.org/10.1038/sdata.2018.214>
- Beverton, R. J. H. (1987). Longevity in fish: Some ecological and evolutionary considerations. In A. D. Woodhead & K. H. Thompson (Eds.), *Evolution of Longevity in Animals*. Springer.
https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1939-9_12
- Boenish, R., Kritzer, J. P., Kleisner, K., Steneck, R. S., Werner, K. M., Zhu, W., Schram, F., Rader, D., Cheung, W., Ingles, J., Tian, Y., & Mimikakis, J. (2022). The global rise of crustacean fisheries. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 20(2), 102–110. <https://doi.org/10.1002/FEE.2431>
- Charnov, E. L. (1993). *Life history invariants: Some explorations of symmetry in evolutionary ecology* (1st ed.). Oxford University Press.
- Charnov, E. L., & Berrigan, D. (1990). Dimensionless numbers and life history evolution: Age of maturity versus the adult lifespan. *Evolutionary Ecology*, 4(3), 273–275.
<https://doi.org/10.1007/BF02214335/METRICS>
- Diele, K., Koch, V., & Saint-Paul, U. (2005). Population structure, catch composition and CPUE of the artisanally harvested mangrove crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae) in the Caeté estuary, North Brazil: Indications for overfishing? *Aquatic Living Resources*, 18(2), 169–178.
- Ewers-Saucedo, C. (2019). Evaluating reasons for biased sex ratios in Crustacea. *Invertebrate Reproduction & Development*, 63(3), 222–230. <https://doi.org/10.1080/07924259.2019.1588792>
- Google. (2022). *Google Earth Pro* (7.3.6.9345 (64-bit)). Google.
- Govender, Y., Sabat, A. M., & Cuevas, E. (2008). Effects of land-use/land-cover changes on land crab, *Cardisoma guanhumii*, abundance in Puerto Rico. *Journal of Tropical Ecology*, 24(4), 417–423.
<https://doi.org/10.1017/S0266467408005130>
- Green, P. T. (2004a). Burrow dynamics of the red land crab *Gecarcoidea natalis* (Brachyura, Gecarcinidae) in rain forest on Christmas Island (Indian Ocean). *Journal of Crustacean Biology*, 24(2), 340–349.
- Green, P. T. (2004b). Field observations of moulting and moult increment in the Red Land Crab, *Gecarcoidea natalis* (Brachyura, Gecarcinidae), on Christmas Island (Indian Ocean). *Crustaceana*, 77(1), 125–128.
<https://doi.org/10.1163/156854004323037937>
- Hartnoll, R. G. (1988). Growth and Molting. In W. Burggren & B. McMahon (Eds.), *Biology of the Land Crabs* (pp. 186–210). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511753428.007>
- Hartnoll, R. G. (2001). Growth in Crustacea - Twenty years on. *Hydrobiologia*, 449(1), 111–122.
<https://doi.org/10.1023/A:1017597104367/METRICS>
- Hartnoll, R. G., Baine, M. S. P., Grandas, Y., James, J., & Atkin, H. (2006). Population Biology of the Black Land Crab, *Gecarcinus ruricola*, in the San Andres Archipelago, Western Caribbean. *Journal of Crustacean Biology*, 26(3), 316–325. <https://doi.org/10.1651/C-2640.1>



- Hendrickx, M. E. (1995). Cangrejos. In *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca: Pacífico Centro-Oriental*. (1st ed., Vol. 1, pp. 581–636). FAO. 646.
- Heppell, S. S., Heppell, S. A., Read, A. J., & Crowder, L. B. (2005). Effects of fishing on long-lived marine organisms. In E. A. Norse & L. B. Crowder (Eds.), *Marine conservation biology: The science of maintaining the sea's biodiversity* (pp. 211–231). Island Press.
- Hines, A. H., Jivoff, P. R., Bushmann, P. J., Van Montfrans, J., Reed, S. A., Wolcott, D. L., & Wolcott, T. G. (2003). Evidence for sperm limitation in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Bulletin of Marine Science*, 72(2), 287–310.
- Hjelset, A. M. (2014). Fishery-induced changes in Norwegian red king crab (*Paralithodes camtschaticus*) reproductive potential. *ICES Journal of Marine Science*, 71(2), 365–373.
<https://doi.org/10.1093/ICESJMS/FST126>
- INEC. (2023, October 9). *Contraloría General de la República de Panamá - Instituto Nacional de Estadística y Censo*. Resultados Finales Básicos XII Censo Nacional de Población y VIII de Vivienda 2023.
https://www.inec.gob.pa/publicaciones/Default2.aspID_CATEGORIA=19&ID_SUBCATEGORIA=71
- Jivoff, P. (2003). A review of male mating success in the blue crab, *Callinectes sapidus*, in reference to the potential for fisheries-induced sperm limitation. *Bulletin of Marine Science*, 72(2), 273–286.
- João, M. C. A., Duarte, R. C., da Silva, L. S. B., Freire, A. S., & Pinheiro, M. A. A. (2022). Sexual maturity of an endemic insular land crab: Priority information toward the conservation of, *Johngarthia lagostoma*. *The Biological Bulletin*, 243(1), 14–27. <https://doi.org/10.1086/720581>
- Lima, M. C., Pereira, C. A. M., Araújo, M. S. L. C., Rodrigues, G. G., & Nicacio, G. (2021). Seasonal variation in biometric parameters in a population of the endangered blue land crab (*Cardisoma guanhumi*): Indicators for assessment and management. *Regional Studies in Marine Science*, 45, 101804.
<https://doi.org/10.1016/J.RSMA.2021.101804>
- Lindquist, E. S., Krauss, K. W., Green, P. T., O'Dowd, D. J., Sherman, P. M., & Smith, T. J. (2009). Land crabs as key drivers in tropical coastal forest recruitment. *Biological Reviews*, 84(2), 203–223.
- Linton, S. M., & Greenaway, P. (1997). Urate deposits in the gecarcinid land crab *Gecarcoidea natalis* are synthesised de novo from Excess dietary nitrogen. *Journal of Experimental Biology*, 200(17), 2347–2354. <https://doi.org/10.1242/JEB.200.17.2347>
- Liu, T. M., & Lu, D. J. (2014). The cultural and ecological impacts of aboriginal tourism: A case study on Taiwan's Tao tribe. *SpringerPlus*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-347/METRICS>
- Lombardo, R. C., & Cedeño, L. M. (2023). Segregation by size in the mouthless crab *Cardisoma crassum* (Brachyura: Gecarcinidae) from Ponuga, Veraguas, Panama. *Revista Ciencias Marinas y Costeras*, 15(1), 27–44. <https://doi.org/10.15359/revmar.15-1.2>
- Lombardo, R. C., & Rojas, M. (2022). Burrow fidelity in the blue crab, *Cardisoma crassum* Smith, 1870 (Brachyura: Gecarcinidae) from the Ponuga River, Veraguas, Panama. *Nauplius*, 30, e2022033.
<https://doi.org/10.1590/2358-2936e2022033>
- McGaw, I. J., Van Leeuwen, T. E., Trehern, R. H., & Bates, A. E. (2019). Changes in precipitation may alter food preference in an ecosystem engineer, the black land crab, *Gecarcinus ruricola*. *PeerJ*, 2019(5), 1–28. <https://doi.org/10.7717/peerj.6818>



- Paolisso, M. (2007). Taste the traditions: Crabs, crab cakes, and the Chesapeake Bay blue crab fishery. *American Anthropologist*, 109(4), 654–665. <https://doi.org/10.1525/AA.2007.109.4.654>
- Pardo, L. M., Riveros, M. P., Fuentes, J. P., Pinochet, R., Cárdenas, C., & Sainte-Marie, B. (2017). High fishing intensity reduces females' sperm reserve and brood fecundity in a eubranchyuran crab subject to sex- and size-biased harvest. *ICES Journal of Marine Science*, 74(9), 2459–2469. <https://doi.org/10.1093/ICESJMS/FSX077>
- Pauly, D., & Froese, R. (2014). Fisheries Management. In *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.A0003252.PUB3>
- Perger, R., Cortés, J., & Pacheco, C. (2013). Closing a distributional gap of over 3000 km and encountering an invisible barrier: New presence/absence data for *Johngarthia planata* Stimpson, 1860 (Decapoda, Brachyura, Gecarcinidae) for Central America and biogeographic notes on East Pacific Gecarcinidae. *Crustaceana*, 86(3), 268–277. <https://doi.org/10.1163/15685403-00003172>
- Quiñones-Llópiz, J.-D., Rodríguez-Fourquet, C., Luppi, T., Farias, N.-E., Quiñones-Llópiz, J.-D., Rodríguez-Fourquet, C., Luppi, T., & Farias, N.-E. (2021). Size distribution and sex ratio between populations of the artisanal harvested land crab *Cardisoma guanhumí* (Decapoda: Gecarcinidae), with the estimation of relative growth and size at sexual maturity in Puerto Rico. *Revista de Biología Tropical*, 69(3), 989–1003. <https://doi.org/10.15517/RBT.V69I3.45570>
- Rademacher, M., & Mengedoh, O. (2011). *Krabben-Fibel* (U. Wesollek-Rottmann, Ed.; 1st ed., Vol. 1). Dähne Verlag.
- RAMSAR. (2023). *The List of Wetlands of International Importance*. Ramsar List. <https://www.ramsar.org/document/list-wetlands-international-importance-ramsar-list>
- Robertson, A. I. (1986). Leaf-burying crabs: Their influence on energy flow and export from mixed mangrove forests (*Rhizophora* spp.) in northeastern Australia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 102(2–3), 237–248. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(86\)90179-6](https://doi.org/10.1016/0022-0981(86)90179-6)
- Sato, T., & Goshima, S. (2006). Impacts of male-only fishing and sperm limitation in manipulated populations of an unfished crab, *Hapalogaster dentata*. *Marine Ecology Progress Series*, 313, 193–204. <https://doi.org/10.3354/MEPS313193>
- Sato, T., & Yoseda, K. (2010). Influence of size- and sex-biased harvesting on reproduction of the coconut crab *Birgus latro*. *Marine Ecology Progress Series*, 402, 171–178. <https://doi.org/10.3354/MEPS08369>
- Smith, T. J., Boto, K. G., Frusher, S. D., & Giddins, R. L. (1991). Keystone species and mangrove forest dynamics: the influence of burrowing by crabs on soil nutrient status and forest productivity. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 33(5), 419–432. [https://doi.org/10.1016/0272-7714\(91\)90081-L](https://doi.org/10.1016/0272-7714(91)90081-L)
- Vargas-Téllez, I., & Vázquez-López, H. (2016). Fecundity of *Cardisoma crassum* Smith, 1870 in an estuary of the Mexican Pacific. *Biología, Ciencia y Tecnología*, 9(35), 632–641.
- Vázquez-López, H., & Ramírez-Pérez, T. (2015). Aspects of growth in the terrestrial crab *Cardisoma crassum* Smith, 1870 (Crustacea: Brachyura: Gecarcinidae) from El Salado estuary, Puerto Vallarta, Jalisco, México. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 65(2), 82–99.
- Vega, A. J., Mena, C., & Robles, Y. (2018). Pesca artesanal *Cardisoma crassum* (Cangrejo) y *Ucides occidentalis* (Mangote) en el sector nororiental del Golfo de Montijo, Pacífico de Panamá. 20, 5–22.



- Vega, A. J., Robles, Y., Alvarado, O., & Cedeño, C. (2021). Estructura de tallas, distribución y abundancia de *Anadara tuberculosa* (Bivalvia: Arcidae) en dos sistemas de manglar del Pacífico de Panamá. *Revista de Biología Tropical*, 69(2), 422–433. <https://doi.org/10.15517/RBT.V69I2.43934>
- Vogt, G. (2012). Ageing and longevity in the Decapoda (Crustacea): A review. *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*, 251(1), 1–25. <https://doi.org/10.1016/J.JCZ.2011.05.003>
- Vogt, G. (2019). A compilation of longevity data in decapod crustaceans. *Nauplius*, 27(e2019011). <https://doi.org/10.1590/2358-2936e2019011>
- Wenner, A. M. (1972). Sex ratio as a function of size in marine Crustacea. *The American Naturalist*, 106(949), 321–350.
- Wolcott, T. G. (1988). Ecology. In W. Burggren & B. McMahon (Eds.), *Biology of the Land Crabs* (pp. 55–95). Cambridge University Press. <https://doi.org/doi:10.1017/CBO9780511753428.004>



White-nosed Coati (*Nasua narica*) a predator of the Yellow-headed Caecilian (*Oscaecilia ochrocephala*) in Panama

Coatí de nariz blanca (*Nasua narica*), un depredador de la cecilia de cabeza amarilla (*Oscaecilia ochrocephala*) en Panamá

Rogemif Fuentes¹

<https://orcid.org/0000-0002-4389-2665>

¹Fundación Los Naturalistas, P.O. Box 0426-01459, David, Chiriquí, Panamá
Corresponding author: rogemifdaniel@gmail.com

Enviado el 19 de agosto de 2023. Aceptado el 12 de octubre de 2023.

<https://doi.org/10.59722/rcvn.v1i2.706>

Abstract

We report a rare event of predation by the White-nosed Coati (*Nasua narica*) on the Yellow-headed Cecilia (*Oscaecilia ochrocephala*), during the wildlife monitoring, rescue and relocation process of the “Cerro Cucaracha” project within the Canal de Panama, through direct observation and photographic recording, this predator-prey relationship has been scarcely documented in Panama, with which we make a valuable contribution to the knowledge of this ecological interaction; considering that to expand this type of records it is necessary to increase the observation time in the field or implement sampling methodologies such as camera trap stations.

Keywords

Amphibian, behavior, diet, mammal, predation.

Resumen

Reportamos un raro evento de depredación de Coatí de nariz blanca (*Nasua narica*) sobre la Cecilia cabeza amarilla (*Oscaecilia ochrocephala*), durante el proceso de monitoreo, rescate y reubicación de vida silvestre del proyecto “Cerro Cucaracha” dentro de la cuenca del Canal de Panamá, a través de observación directa y registro fotográfico, esta relación depredador-presa ha sido escasamente documentada en Panamá, con lo cual hacemos un aporte valioso al conocimiento de esta interacción ecológica; considerando que para ampliar este tipo de registros es necesario aumentar el tiempo de observación en campo o implementando metodologías de muestreo como estaciones de cámaras trampa.

Palabras clave

Anfibio, comportamiento, depredación, dieta, mamífero.



Introduction

The relationships between different species play a fundamental role in ecology, evolution, and natural history, therefore, it is essential to carry out precise documentation of these interactions to adequately understand the functioning of ecosystems, in particular, predator-prey dynamics that establishes a critical line for the transfer of nutrients and energy, thus contributing to the functionality and stability of said ecosystems (Bissattini et al. 2020; Zipkin et al. 2020; Eversole, 2022).

Background on the predator

Nasua narica (Linnaeus, 1766) the white-nosed coati is a medium-sized mammal belonging to the Procyonidae family (Torres-Valencia, 2023), has a social structure of adult females living in groups and solitary adult males (Gompper, 1997). Its distribution extends from the southern United States through Colombia, Ecuador, and Peru, west of the Andes (Aranda Sánchez, 2012; Salcedo-Rivera et al. 2022). White-nosed coatis are omnivorous, their diet consists mainly of fruits and invertebrates, but they also consume vertebrates, reptiles, and birds. (Kaufman, 1962; Valenzuela, 1998; Álvarez et al. 2013). They socialize in many areas where they coexist near human settlements, invading human garbage dumps (Marotta, 2017).

Background on the prey

The Gymnophiona order includes species with diverse habitats uses, types of reproduction, and morphological, physiological, and ethological aspects, they represent about 4 % of known living species of amphibians, they are mainly fossorial, they have about 150 described species distributed throughout Southeast Asia and American and African the tropics (Jared et al. 1999). In Panama, the order has eleven species that represent 4.7 % of the country's amphibians and two only families Caecilidae and Dermophidae, which include seven (3.04 %) and four (1.72 %) species respectively (Frost, 2023).

Oscacilia ochrocephala (Taylor, 1968) are medium-sized caecilians (total length up to 617mm), the eyes are structurally reduced and covered by bone and skin, the tentacles are below and slightly in front of the nostrils, the coloration in life is light gray dorsally, the sides and belly greyish white, ring grooves dark grey, head pale yellow to pinkish, lighter on sides of the head. (Nieto-Román & Wake, 2012). It is distributed from central Panama to northern Colombia (Köhler, 2011; Fernández-Roldán et al., 2022). *O.*

ochrocephala individuals have been found on the surface after dawn and dusk rain in Gamboa, Panama, and up to 10 meters underground in urban areas of Panama City (Köhler, 2011).

Despite extensive studies on the feeding of *N. narica*, through feces or direct observations, the predator-prey relationship with amphibians of the caecilians group has not been evident within the occasional vertebrate diet of the species. This manuscript seeks to contribute to knowledge about the diet of *N. narica* in the wild.

Materials and Methods

Study area

The observation was made in the Panama Canal basin in the eastern Pacific, close to Cerro Cucaracha and Culebra Cut, specifically at the coordinates 9° 2'52.29"N, 79°38'32.30"W, in a forest fragment secondary delimited on one side by an electrical transmission line and on the other by an internal road of the Panama Canal Authority (figure 1).



Figure 1.
Location of the predation event.

Sampling and data collection

Within the work area during the workday from 8:00 a.m. to 4:00 p.m., wildlife rescue and relocation monitoring were carried out routinely using the generalized search methodology for direct observation of fauna, following a car circuit of approximately 6.5 km. The predation event was documented using a semi-professional Canon Powershot SX 540HS digital camera, obtaining eight 180dpi images in JPG format, with f/5.6, ISO-500, 76mm focal length and 4.97 aperture, and a 21-second video in MP4 format.

Results and Discussion

We report a predation event of the Yellow-headed Caecilian (*O. ochrocephala*) by an adult male of White-nosed Coati (*N. narica*) on October 25, 2022, at 13:40 h during a wildlife rescue and relocation monitoring tour after a heavy rain, while observing a group of white-nosed coatis in their routine foraging activities, we noticed an adult male individual eating what we initially thought was a snake, which caught our attention immediately. When we took the photographs, we realized that it was not a snake, but an adult Cecilia with a yellow head of approximately 45 cm (figure 2), once the photographs were taken, we recorded a video to demonstrate the behavior, through which we could notice while the White-nosed Coati chewed the Yellow-headed Caecilian that was still keeping its head, this helped us confirm the species.



Figure 2.
White-nosed Coati (*Nasua narica*) preying on a Yellow-headed Caecilian (*Oscaecilia ochrocephala*)



The White-nosed Coati (*N. narica*) has a very varied diet that mainly includes some invertebrates, fruits, and occasionally some vertebrates (Gompper, 1996; Ferreira et al., 2013; Hirsch and Gompper, 2017), however, previous studies suggest that There are few records of vertebrate predation by *Nasua narica* (Gompper, 1996), coinciding with Russell (1982) who reported only rare predation of mice and lizards. Valenzuela (1998) for his part reports that 14.88% of the fecal samples obtained from his study population represent vertebrates, however, when breaking it down, he only mentions birds, mammals and reptiles, like the rest of the studies, do not consider within the diet amphibians, possibly due to the anatomy and physiology of these animals, when passing through the digestive tract of a White-nosed Coati they are completely digested without leaving tangible evidence in the feces (J. Ortega, personal communication, 21 de Agosto de 2023).

Smythe (1970a) postulated that solitary adult males are more likely to hunt vertebrates than females or group members and that vertebrate hunting is more common in the dry season when fruit availability is low, in our report the event of Predation, however, was by a solitary adult male that was close to a group and in the rainy season, after a heavy rain.

Due to the described and widely known feeding habits of *N. narica*, predation on individual caecilians could be more common than expected. However, this is only the second documented record of predation on the Yellow-headed Caecilian (*O. ochrocephala*), the first outside the island of Barro Colorado in Panama where John Kaufmann in 1962 in his doctoral thesis (Unpublished document) carried out the first report.

Acknowledgment

To Josue Ortega for providing valuable literature, for elaborated the map and comments for this document. To the Panama Canal Authority (ACP) and the company RETRANEQ, for authorizing us to use this data for this scientific contribution.



References

- Álvarez, T. A. A., Sarabia, M. S., & Rosales, M. D. L. L. M. (2013). Alimentación del coatí *Nasua narica*, en la comunidad de las Ánimas, Municipio de Chapa de Mota, Estado de México, México. *Revista de Zoología*, (24), 16-26.
- Aranda Sánchez, J. M. 2012. Manual para el rastreo de mamíferos silvestres de México. México, D.F., Mexico: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio).
- Bissattini, A. M., Haubrock, P. J., Buono, V., Balzani, P., Borgianni, N. & Stellati, L. (2020). Trophic Structure of a pond community dominated by an invasive alien species: Insights from stomach content and stable isotope analyses. *Aquatic Conservation* 31: 948–963.
- Eversole, C. (2022). Predation by a White Banded Fishing Spider, *Dolomedes albineus* (Araneae: Pisauridae), on the Green Anole, *Anolis carolinensis* (Squamata: Dactyloidae), in southeastern Texas, USA. *Herpetology Notes*, 15, 821-822.
- Ferreira, G. A., Oliveira, E. N., Genaro, G., & Chaves, A. K. L. (2013). Diet of the coati *Nasua nasua* (Carnivora: Procyonidae) in an area of woodland inserted in an urban environment in Brazil.
- Frost, D.R. 2023. Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 6.1. American Museum of Natural History, New York. <https://amphibiansoftheworld.amnh.org> [Consulted in October 2023].
- Gompper, M. E. (1996). Sociality and asociality in white-nosed coatis (*Nasua narica*): foraging costs and benefits. *Behavioral ecology*, 7(3), 254-263.
- Gompper, M. E. (1997). Population ecology of the white-nosed coati (*Nasua narica*) on Barro Colorado Island, Panama. *Journal of Zoology*, 241(3), 441-455.
- Hirsch, B., & Gompper, M. (2017). Causes and consequences of coati sociality. Oxford University Press.
- Jared, C., Navas, C. A., & Toledo, R. C. (1999). An appreciation of the physiology and morphology of the Caecilians (Amphibia: Gymnophiona). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 123(4), 313-328.
- Kaufmann, J.H. (1962) Ecology and social behavior of the coati, *Nasua narica*, on Barro Colorado Island, Panama. *Univ Calif Publ Zool* 60:95–222.
- Köhler, G. 2011. Amphibians of Central America. Herpeton, Verlag Elke Köhler, Offenbach, Germany.
- Linnaeus, C. 1766. *Systema naturae per regna tria naturae secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Editio duodecima. Holmiae, Stockholm.
- Marotta, M. F. 2017. Conflicto entre los coatíes (*Nasua nasua*) y los turistas del Parque Nacional Iguazú, Misiones, Argentina: Evaluación de medidas de manejo tendientes reducirlo. Unpublished licentiate thesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Nieto-Román, S., & Wake, M. H. (2012). *Oscacilia ochrocephala*. *Catalogue of American Amphibians and Reptiles (CAAR)*.
- Roldán, J. D. F., Lynch, J. D., & Bocanumenth, D. (2022). Rediscovery of *Oscacilia ochrocephala* (Cope, 1866) (Amphibia: Gymnophiona: Caeciliidae) in Colombia, with comments on its variation and affinity to *O. polyzona* (Fischer, 1880). *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 5(3), 25-31.
- Russell, J. K. (1982). Timing of reproduction by coatis (*Nasua narica*) in relation to fluctuations in food resources.



- Smythe, N. (1970a). The adaptive value of the social organization of the coati (*Nasua narica*). *Journal of Mammalogy*, 51(4), 818-820.
- Taylor, E. H. (1968). *The caecilians of the world: a taxonomic review*. Lawrence: University of Kansas Press. 790 pp.
- Torres-Valencia, E., Cruz-Sáenz, D., Hernández-Juárez, E. E., Lazcano, D., Fucsko, L. A., & Wilson, L. D. (2023). Predation by the White-nosed Coati (*Nasua narica*) on the Western Spiny-tailed Iguana (*Ctenosaura pectinata*) in a Western Dry Forest in La Huerta, Chamela, Jalisco, Mexico. *Bulletin of the Chicago Herpetological Society* 58(8):131-134.
- Valenzuela, D. (1998). Natural history of the white-nosed coati, *Nasua narica*, in a tropical dry forest of western Mexico. *Revista Mexicana de Mastozoología (Nueva época)*, 3(1), 26-44.
- Zipkin, E. F., DiRenzo, G. V., Ray, J. M., Rossman, S., & Lips, K. R. (2020). Tropical snake diversity collapses after widespread amphibian loss. *Science*, 367(6479), 814-816.



First record of *Oxyrhopus occipitalis* (Wied-Neuwied, 1824) in Central America
Primer registro de *Oxyrhopus occipitalis* (Wied-Neuwied, 1824) en América Central

Angel Romero-Marcucci¹

<https://orcid.org/0000-0002-7985-1734>

Macario González-Pinzón¹

<https://orcid.org/0000-0001-7747-6451>

Marcos Ponce²

<https://orcid.org/0000-0002-6850-178X>

Ángel Sosa-Bartuano³

<https://orcid.org/0000-0002-7179-4915>

¹Universidad Autónoma de Chiriquí, David, Panamá

²Museo Herpetológico de Chiriquí, David, Panamá

³Universidad de Panamá, Museo de Vertebrados, Ciudad de Panamá, Panamá

Autor correspondiente: asosa2983@gmail.com

Enviado el 26 de septiembre de 2023. Aceptado el 6 de Noviembre de 2023.

<https://doi.org/10.59722/rcvn.v1i2.707>

Abstract

The first record in Central America of the species *Oxyrhopus occipitalis* (Wied-Neuwied, 1824) (Serpentes, Dipsadidae) is presented, with a juvenile collected and photographic specimen, the latter obtained with citizen science information available on the Inaturalist platform. The two records were made in the Province of Darién, Serranía de Pirre, Republic of Panama. Pholidosis data was obtained, to compare and identify the specimen using a dichotomous key of snakes and the genus *Oxyrhopus* of Colombia. A complete count of head and body scales is presented, including a complete description of coloration. For the adult, a count and partial description of the cephalic scales is presented, including a partial description of the coloration of the head and the anterior portion of the body. With these records the number of species of the genus *Oxyrhopus* in Panama increases to two. The taxonomic status of this species has been controversial for many years and taxonomic changes can be expected in the future.

Keywords

Darien, Dipsadidae, Photograph specimen, Serranía de Pirre, Science Citizen.

Resumen

Se presenta el primer registro en Centroamérica de la especie *Oxyrhopus occipitalis* (Wied-Neuwied, 1824) (Serpentes, Dipsadidae), con un juvenil colectado y adulto fotografiado, este último obtenido con información de ciencia ciudadana disponible en la plataforma Inaturalist. Los dos registros fueron realizados en la Provincia de Darién, Serranía de Pirre, República de Panamá. Se obtuvo información de foliosis, para comparar e identificar el espécimen con las claves dicotómicas de las serpientes y del género *Oxyrhopus* de Colombia. Se presenta un conteo completo de las escamas de la cabeza y el cuerpo, incluida una descripción completa de la coloración. Para el adulto se presenta un conteo y descripción parcial de las escamas cefálicas, incluyendo una descripción parcial de la coloración de la cabeza y la porción anterior del cuerpo. Con estos registros aumenta a dos el número de especies del género



Oxyrhopus en Panamá. El estado taxonómico de esta especie ha sido controvertido durante muchos años y se puede esperar cambios taxonómicos en el futuro.

Palabras clave

Ciencia Ciudadana, Darién, Dipsadidae, espécimen fotográfico, Serranía de Pirre.

Introduction

The Yellow-headed Flame-Snake *Oxyrhopus occipitalis* is known from the humid forests of the Amazon region and adjacent foothills of the Andes in Brazil, Colombia, Venezuela, Guyana, French Guyana, Peru, Surinam and Ecuador (Lynch, 2009; MacCulloch et al. 2009; Wallach et al. 2014; Rojas-Morales et al. 2018; Quezada & Arteaga, 2020). The type locality of this species is Río Solimões or upper Amazon River, between the mouth of Río Negro and the Peruvian border, Amazonas State, North West of Brazil (Wallach et al. 2014). Bailey (1970) synonymized *O. occipitalis* with *O. formosus*, despite considering *O. formosus* as a species complex. Subsequently, *O. occipitalis* was revalidated by Hoge et al. (1972). Some species of *Oxyrhopus* resemble one another, and identification can be difficult. For example, *O. formosus* and *O. occipitalis* have long been confused (Natera Mumaw et al. 2015). Species identifications and relationships among species have traditionally been based on color patterns, although some scutellation characters have been used (Bailey, 1970). Actually, physical vouchers remain the main standard in biological research in terms of reproducibility and permanence (Ceríaco et al. 2016; Buckner et al. 2021), However, there are cases where there is no physical voucher due to circumstances such as is a protected species or too rare to obtain permits, does not exist, is difficult to collect, among other cases; photographs and molecular data can be useful (Buckner et al. 2021; Leipzig et al. 2021). Especially if there is more data associated, such as coordinates and date and time information (Leipzig et al. 2021). Photographs and molecular data are not a panacea, the addition of a physical voucher is always recommended (Buckner et al. 2021). In this work, we present the first record of *O. occipitalis* for Panama and Central America with two specimens (physical and photographic). We include scale count and description of coloration for both specimens.

Materials and Methods

The juvenile of *O. occipitalis* was observed, photographed and collected by Ángel Romero. This was deposited in Museo Herpetológico de Chiriquí (MHCH 5001; field tag AR-105). The morphological, morphometric measurements and scale count were obtained with AmScope stereoscope and caliper in millimeters (mm). Sex was determined by counting dark bands on the body and tail (Lynch, 2009). The coordinates and elevation were obtained with GPS Garmin. Liver tissue was obtained and preserved in 96 % ethanol for subsequent analysis. The adult of *O. occipitalis* was found by Macario González on iNaturalist <https://www.inaturalist.org/observations/19706875> and was sent to Digital Collection, University of Texas at Arlington (UTADC 9851; photo voucher). The scale count was obtained in the photograph. The date, time of observation, elevation and coordinates were obtained from the Inaturalist platform. The identification of family, genus and species was made with the dichotomous keys of Peters and Orejas-Miranda (1970), Lynch (2009) and Vásquez-Restrepo (2021). The elaboration of the map was made with the program QGIS v. 2017.

Results

The two observations were made in the Serranía de Pirre, Darien National Park, Province of Darien, Panama; the first specimen was found on 8 Oct 2015 in Cerro Pirre by Jonathan Newman (7.9275° N, -77.7025° W; WGS 84) at an altitude of 1400 m a.s.l., (figure 1) during the day without a specific time. The second record was made by Ángel Romero on May 24, 2023 in Cana (7.7837° N, -77.6992° W; WGS 84) at an altitude of 1130 m a.s.l., around 21:30 h (figure 1). Both snakes were observed in mature forest (figure 2).



Figure 1. Geographical distribution of *O. occipitalis* in Serranía de Pirre, Darien National Park, Panama. Red circle corresponds photographic voucher (UTADC 9851) record in 2015; Light green triangle corresponds the physical voucher (MHCH 5001) record in 2023.



Figure 2.
Aerial view of the mature forest, Cana, Darien National Park (Photo by Marcos Ponce).

Morphology and morphometry

The juvenile MHCH 5001 presents a total length of 217 mm and body length of 177 mm, tail 40 mm, 8 supralabial scales, 4 and 5 in contact with the orbit, 8 infralabial scales, loreal is longer than tall, 1 rostral scale, 2 internal scales, 2 prefrontal scales, 2 supraocular scales, 1 frontal, 2 parietal scales, nasal scale, 1 preocular scale, 2 postocular, 2 temporal scales. The morphometric measurements of the head were: 6.1 mm cephalic width, 7.8 mm cephalic length, 2.7 mm narine-eye distance, and 1.5 mm eye diameter.

The dorsal scales are smooth and arranged in 19-19-17 rows along the trunk; 202 ventral scales, 68 pairs of subcaudal scales and a single anal plate.

The count and arrangement of the head scales in the adult were as follows: 8 supralabials with 4 and 5 contacting the orbit, the infralabials are not visible in the photograph, the loreal is longer than tall, the preocular scale is in contact with the prefrontal scale and, the upper postocular scale is slightly larger than the lower one.

Color pattern

The juvenile presents in life a coloration on the head mostly white cream with a light brown spot that goes from the rostral scale to the beginning of the parietals, and mental and infralabial scales light gray

with white cream in the border (figure 3 A-B). Throughout the body presents 27 black rings and 19 black rings from the head to the cloaca. The body presents a combination of 6 cream rings to the 7 black rings, in the back half of the body, the coloration of the rings changes from cream to reddish-orange, intensifying its color until the end of the tail. The black rings are still maintained along the entire body and the ventral scales are cream-white (figure 4).

The adult includes the front half of the body with the head. The tip of the snout is yellow including supralabial and infralabial scales, the black color on the head starts from the posterior portion of the internasal scales, extending through the prefrontal, parietal scales and first four dorsal scales (figure 5). The anterior portion of the body is red with the tips of the scales black. The color of the belly is not visible and the eyes are orange bordered by a black line with black pupils (figure 5).

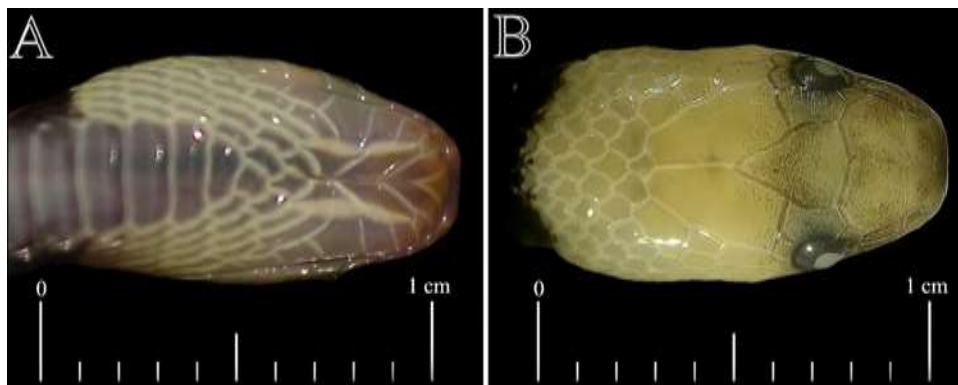


Figure 3.
Juvenile *Oxyrhopus occipitalis*. Head scales (A) ventral view in life, (B) dorsal view preserved (Photos by Angel Romero-Marcucci).



Figure 4.
Coloration in life of juvenile *Oxyrhopus occipitalis* (MHCH 5001) from the mature forest, Cana, Darien National Park, Panama (Photo by Marcos Ponce).



Figure 5.
Adult of *Oxyrhopus occipitalis* (UTADC 9851) in mature forest of Cerro Pirre, Darien National Park, Panama (Photo by Jonathan Newman).

The juvenile with three months preserved in 70 % ethanol, showed a head with a cream coloration a little darker between the rostral and frontal scales and a black eye with a white pupil (figure 6). The dorsal coloration of cream and black rings with some traces of reddish-orange in the last third of the body of the snake (figure 6).



Figure 6.
Preserved juvenile *Oxyrhopus occipitalis* MHCH5001 (Photo by Angel Romero-Marcucci).



The following characteristics allowed the identification at the species level of the juvenile: dorsal scale rows 19-19-17; dark body bands not encroaching onto ventral scutes, dark body bands present not forming triads and heads of juveniles yellow (Lynch, 2009). This does not have a yellow head in life, it is cream with a light brown snout. The adult was identified at the species level using the following characteristics of coloration: red body color pattern, yellow snout and the rest of the head black (Lynch, 2009).

Discussion

The color pattern is the same as that described by Lynch (2009) and MacCulloch et al. (2009) for *O. occipitalis* for youngs and adults from Colombian populations, characterized by having a yellow snout, black head and, body and tail red with banded black it is also considered that the collected specimen is female, because the hemipenes could not be everted at the time of its preservation and by the number of black rings it presents (Lynch, 2009). Quezada & Arteaga (2020) show photographs of specimens from the locality of Yuralpa in Ecuador, which are consistent in coloration for the juvenile and adult with those of this work. Colombian populations do not present confusion in color patterns like the populations of Brazil, Venezuela and Guyana (Lynch, 2009). The red dorsal coloration, dark head, and yellow snout form a combination unique to *O. occipitalis*, in Manaus (northern Brazil), according to Fraga et al. (2013). For *O. formosus*, the yellow color extends beyond the snout to include other parts of the head (Lynch, 2009). According to MacCulloch et al. (2009), in *O. formosus*, the body color pattern is yellow, orange, or red with black bands, and the snout color is yellow, orange or red. The proximity to the border with Colombia allows assigning the photographic specimen to *O. occipitalis*. The count and arrangement of the scales are consistent with that presented by Lynch (2009).

New country record extending their range by approximately 207 km to the west from the record in Paramillo, Department of Antioquia, Colombia (voucher number ICN 10453) (Lynch, 2009). With *Oxyrhopus petolarius* the number of species of this genus present in Panama increases to two (Ray, 2017), with a total of 153 species of snakes in Panama (Ray, 2017; Batista & Miranda, 2020; Arteaga & Batista, 2023; Ray et al. 2023). Natera Mumaw et al. (2015) and Rojas-Morales et al. (2018), mention that it is a species of nocturnal habits but it may have nocturnal and daytime activity. The type of habitat



is consistent with that described by Rojas-Morales et al. (2018), being a species with a preference for undisturbed habitats.

In terms of conservation in situ, its presence in the National System of Protected Areas is beneficial, as species with striking colors are susceptible killed (Johnson et al., 2015).

The status of these two names *Oxyrhopus occipitalis* (Wied-Neuwied, 1824) and *Oxyrhopus formosus* (Wied-Neuwied, 1820), currently is controversial (Natera Mumaw et al. 2015). This problem necessitates a range-wide approach that uses analysis of the color pattern of live individuals, pholidosis and hemipenial morphology of all available material, and DNA samples from as broad a range of populations in Darien National Park and South America as possible (Zaher & Prudente, 2003; Lynch, 2009; MacCulloch et al., 2009). While this species complex is resolved, we follow the criteria proposed by Lynch (2009) and MacCulloch et al. (2009) naming the species of this record as *O. occipitalis* until more evidence is available.

Conclusions

- Citizen science platforms are important because provide valuable information, as in this case, about a very rare species of snake from an area that is difficult to access.
- This record increases to two, the number of species of the genus *Oxyrhopus* in Panama.
- The taxonomic status of this species has been controversial for many years and taxonomic changes can be expected in the future. Tissue from a Panamanian specimen (MHCH 5001) is available for future comparative molecular analysis.
- This fortuitous observation of a species of snake that was not on previous herpetological lists for the Republic of Panama, is an indication that more studies are needed to deepen the knowledge of the biodiversity of the Darien National Park.

Acknowledgments

We thank Guillermo Fadul for guiding us on the use of information available on the Inaturalist platform, Fundación Yaguará Panamá and Ricardo Moreno for financing the fieldwork, Gregory Pandelis for providing the photo voucher number, Michelle Quiroz Espinoza for facilitating the use of the laboratory,



optical equipment and the catalog number of the Museo Herpetológico de Chiriquí and Jonathan Newman for permitting to use the photograph and the associated data.

References

- Arteaga, A., & Batista, A. (2023). A consolidated phylogeny of snail-eating snakes (Serpentes, Dipsadini), with the description of five new species from Colombia, Ecuador, and Panama. *ZooKeys*, 1143, 1.
- Bailey, J. R. (1970). *Oxyrhopus*. In: Peters, J. A. & Orejas-Miranda, B. (Eds.), *Catalogue of the Neotropical Squamata: Part 1, Snakes*. U.S. National Museum 297, Washington, p. 229-235.
- Batista, A., & Miranda, M. (2020). *Las Serpientes de Panamá. Venenosas y no venenosas más comunes*. Primera Edición. Fundación Los Naturalistas, SENACYT, Universidad Autónoma de Chiriquí. Panamá.
- Buckner, J. C., Sanders, R. C., Faircloth, B. C., & Chakrabarty, P. (2021). The critical importance of vouchers in genomics. *Elife*, 10, e68264.
- Ceríaco, L. M., Gutiérrez, E. E., Dubois, A. & Carr, M. (2016). Photography-based taxonomy is inadequate, unnecessary, and potentially harmful for biological sciences. *Zootaxa* 4196, 435–445. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4196.3.9>
- Fraga, R. D., Lima, A. P., Prudente, A. L. D. C., & Magnusson, W. E. (2013). *Guia de cobras da região de Manaus Amazônia Central*. Manaus: Editora Inpa.
- Hoge, A. R., Santos, N. P., Heitor, C., Lopes, L. A. & de Souza, I. M. (1972). Serpentes coletadas pelo projeto Rondon VII em Iauarete, Brasil. *Memorias do Instituto Butantan*, 36, 221-232.
- Johnson, J. D., Mata-Silva, V., & Wilson, L. D. (2015). A conservation reassessment of the Central American herpetofauna based on the EVS measure. *Amphibian & Reptile Conservation*, 9(2), 1-94.
- Leipzig, J., Bakis, Y., Wang, X., Elhamod, M., Diamond, K., Dahdul, W., Karpatne, A., Maga, M., Mabee, P. & Bart Jr., H.L., (2021). Biodiversity Image Quality Metadata Augments Convolutional Neural Network Classification of Fish Species. In: Garoufallou, E., Ovalle-Perandones, MA. (eds) Metadata and Semantic Research. MTSR 2020. *Communications in Computer and Information Science*, vol 1355. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-71903-6_1
- Lynch, J. D. (2009). Snakes of the genus *Oxyrhopus* (Colubridae: Squamata) in Colombia: taxonomy and geographic variation. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 49, 319-337. <https://doi.org/10.1590/S0031-10492009002500001>
- MacCulloch, R. D., Lathrop, A., Kok, P., Ernst, R. & Kalamandeen, M. (2009). The genus *Oxyrhopus* (Serpentes: Dipsadidae: Xenodontinae) in Guyana: Morphology, distributions and comments on taxonomy. *Papéis Avulsos de Zoologia* 49(36), 487-495. <https://doi.org/10.1590/S0031-10492009003600001>
- Natera Mumaw, M., Esqueda González, L. F., & Castelaín Fernández, M. (2015). Atlas serpientes de Venezuela: una visión actual de su diversidad. *Dimacofi Negocios Avanzados SA, Santiago*.
- Peters, J. A., & Orejas-Miranda, B. (1970). *Catalogue of the Neotropical Squamata: Snakes*. US Government Printing Office.



- Ray, J. M. (2017). *Snakes of Panama: A field guide to all species*. Team Snake Panama.
- Ray, J., Sánchez-Martínez, P., Batista, A., Mulcahy, D., Sheehy III, C., Smith, E. N., Pyron, R. A. & Arteaga, A. (2023). A new species of *Dipsas* (Serpentes, Dipsadidae) from central Panama. *Zookeys*, 1145, 131-167.
- Rojas-Morales, J. A., Marín-Martínez, M., & Zuluaga-Isaza, J. C. (2018). Aspectos taxonómicos y ecogeográficos de algunas serpientes (Reptilia: Colubridae) del área de influencia de la Central Hidroeléctrica Miel I, Caldas, Colombia. *Biota Colombiana*, 19(2), 73-91.
<https://doi.org/10.21068/c2018.v19n02a07>
- QGIS. (2017). *Las Palmas*. The Quantum GIS Project. <https://www.qgis.org/es/site/index.html>, (Accessed 24 March 2023).
- Quezada, A. & Arteaga, A. (2020) Yellow-headed Flame-Snake (*Oxyrhopus occipitalis*). In: Arteaga A, Bustamante L, Vieira J, Guayasamin JM (Eds). *Reptiles of Ecuador: Life in the middle of the world*. Available from: www.reptilesofecuador.com
- Vasquez-Restrepo, J. D. (2021). Key to snake families and genera in Colombia.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.13210.47044/4>
- Wallach, V., Williams, K. L., & Boundy, J. (2014). *Snakes of the world: a catalogue of living and extinct species*. CRC press.
- Wied-Neuwied, A.P.M. (1824). *Serpentum brasiliensium species novae*, ou histoire naturelle des espèces nouvelles de serpens. In: Jean de Spix, *Animalia nova sive species novae*, p. 1-75
- Zaher, H., & Prudente, A. L. C. (2003). Hemipenes of *Siphlophis* (Serpentes, Xenodontinae) and techniques of hemipenial preparation in snakes: a response to Dowling. *Herpetological review*, 34(4), 302-306.



The critically endangered Amphibians from the small Escudo de Veraguas Island Panama

Olmedo Santiago¹

<https://orcid.org/0009-0001-3065-2398>

Víctor Acosta-Chaves⁵

<https://orcid.org/0000-0002-6126-622X>

Astrid Lizondro²⁻³

<https://orcid.org/0000-0002-8781-6613>

Marcos Ponce⁴

<https://orcid.org/0000-0002-6850-178X>

Abel Batista²⁻³

<https://orcid.org/0000-0001-8053-3373>

¹Universidad de Panamá, Centro Regional Universitario de Bocas del Toro, Panamá

²Universidad Autónoma de Chiriquí, 0427 David, Chiriquí, Panamá

³Fundación Los Naturalistas, P.O. Box 0426-01459. David, Chiriquí, Panamá

⁴Bioconsultant, David, Chiriquí, Panamá

⁵Universidad de Costa Rica. Sede del Atlántico. Recinto Paraíso, Cartago, Costa Rica.

Corresponding author: abel.batista@unachi.ac.pa

Enviado el 5 de octubre de 2023. Aceptado el 29 de Noviembre de 2023.

<https://doi.org/10.59722/rcvn.v1i2.708>

Abstract

Escudo de Veraguas, a small island in Western Panama, is home to the maritime worm salamander *Oedipina maritima* and the Costa Rica Stream-welling Frog *Craugastor ranoides*, both species are in continuing decline in the extent and quality of their habitat. During three monitoring surveys of the island, 50 plots were installed, 25 in forest and 25 in swamps. The population was estimated at 88 ind./ha for *O. maritima* and 59 ind./ha for *C. ranoides*. As a conservation measure, we recommend long-term monitoring to guarantee the survival of these Critically Endangered species.

Keywords

Climate change, *Craugastor ranoides*, habitat degradation, *Oedipina maritima*

Resumen

Escudo de Veraguas es una pequeña isla en el oeste de Panamá, hogar de la salamandra lombriz marítima *Oedipina maritima* y la rana de los arroyos *Craugastor ranoides*, ambas especies están en continuo declive en la extensión y calidad de su hábitat. Durante tres estudios de monitoreo en la isla, se instalaron 50 parcelas, 25 en hábitat forestal y 25 en pantanos. La población se estimó en 88 ind./ha para *O. maritima* y 59 ind./ha para *C. ranoides*. Como medida de conservación, recomendamos realizar estudios de seguimiento a largo plazo para garantizar la supervivencia de estas especies en Peligro Crítico.

Palabras clave

Cambio climático, *Craugastor ranoides*, degradación del hábitat, *Oedipina maritima*

Introduction

Despite its small size (4 km²) in Escudo de Veraguas, there are 13 species of amphibians (Batista, 2015, unpublished data). The isolation of this land mass, about 3.5-1.8 million years ago (Coates et al. 2005) has led to the speciation of some species that until now are known to be endemic to the island. This is the case of the maritime worm salamander (*Oedipina maritima*), a critically endangered (CR) species of which there is only one record and very little is known about its biology (García-París & Wake, 2000; Zumbado-Ulate et al. 2011; IUCN SSC Amphibian Specialist Group 2020b). The island is also home to the CR Costa Rica Stream-dwelling Frog (*Craugastor ranoides*), a species for which about 80 % of its populations have disappeared (IUCN SSC Amphibian Specialist Group, 2020), with only one stable population in the Guanacaste Conservation Area of Costa Rica (Zumbado-Ulate et al. 2011). Currently, these species are under continuing decline in the extent and quality of their habitat (IUCN SSC Amphibian Specialist Group 2020a, b). This work aimed to estimate the population status and conservation of the *O. maritima* and *C. ranoides* in Isla Escudo de Veraguas, Panama.

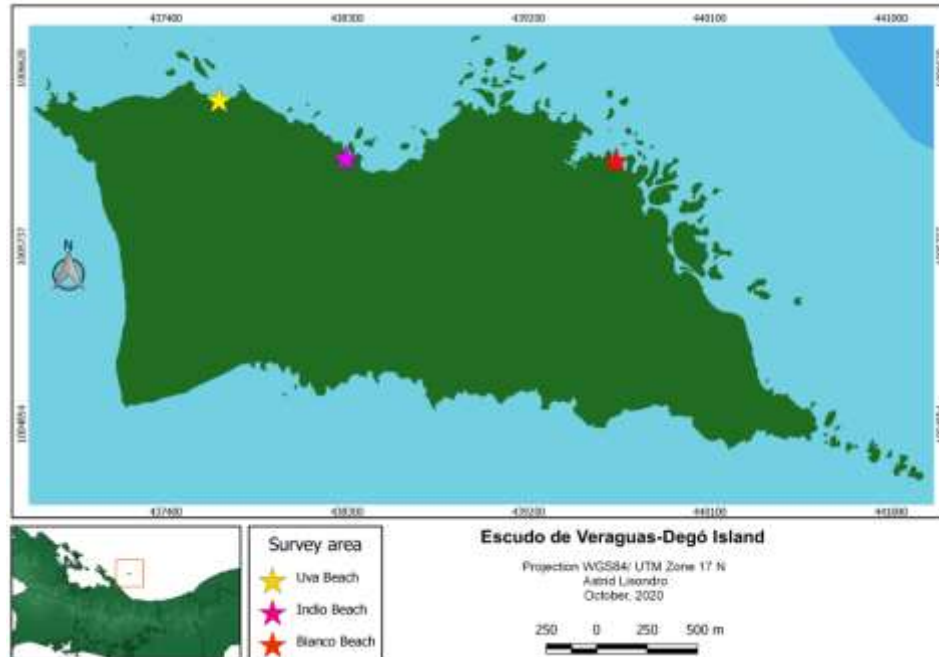


Figure 1.
Map of Escudo de Veraguas Island, showing the three surveyed areas.



Materials and Methods

Study site

Three surveys were conducted to Escudo de Veraguas Island (figure 1) Comarca Ngäbe Buglé, Panama (9.0984° N, 81.5564° W), on September, October 2019, and March 2020, visiting three different sites on each trip, to the beaches Uva, Indio and Bianco, at the North and Northeast part of the island, all with the same type of ecosystem, the lowland tropical forest (hereafter: forest; figure 2A) and the Freshwater swamp forest (hereafter: swamp, figure 2B). The sampling was carried out in two types of habitats: forest and swamp. The forest habitat is mainly composed of hilly areas, and large trees up to more than 20 m in height, from 100 to 200 m from the coastal zone. The swamp area consisted of flooded areas in contact with the coastal zone, mainly with the presence of ferns, mangroves and palm trees (*Cocos nucifera* and *Manicaria saccifera*).

Density and habitat occupancy

To evaluate the density of the species we set 50 plots of 8x8 m, located in each habitat, 25 in the swamp and 25 in the forest, each plot was revised once, by two to three persons walking in zigzag, turning logs, checking epiphytes and sites suitable to the presence of these animals (Heyer et al. 2001). The number of individuals and ecological data of the species was recorded. To estimate the relative density, the total of individuals found was divided by the total area among plots. We use the program PRESENCE 2.13.12 to estimate patch occupancy and the probability of detecting at least one individual in every plot on the three different surveys, using a single season occupancy model (Hines, 2006; MacKenzie et al. 2002).

Results and Discussion

Estimations of the populations showed a relative density of 88 ind./ha for *O. maritima* (figure 2C) and 59 ind./ha for *C. ranoides* (figure 2D). There were no differences in the number of individuals found in both habitats ($\chi^2=1.04$; $p>0.05$; table 1). The two types of habitat models, forest ($\psi(\text{forest.})$, $p(\cdot)$; 30%) and swamp ($\psi(\text{swamp}), p(\cdot)$, 35%) explain the 65% of the variation found in the habitat occupancy



analysis for *O. maritima* (table 2), while the individual detection model ($\psi(\cdot), p(\cdot)$; 42 %) with the swamp habitat model ($\psi(\text{swamp}), p(\cdot)$; 32%) explained the 74 % of the variation for the analysis for *C. ranoides* (table 3). The probabilities of occupancy for *O. maritima*, was 50% (SD: 0.0) in forest and 25% (SD: 0.17) in swamp. For *C. ranoides* the probabilities of occupancy, was 100% (SD: 0.0) in both types of habitats.

Table 1.
Detailed information of amphibians found on each type of habitat at Escudo de Veraguas Island, Comarca Ngäbe Blugé, Panama

Habitat	Trait	<i>Oedipina maritima</i>	<i>Craugastor ranoides</i>
Forest	Total indiv.	13	6
	plots with records	7	5
Swamp	Total indiv.	15	13
	plots with records	3	6
Overall	Total indiv.	28	19
	plots with records	10	11

Before this study, the *Oedipina maritima* was known from only eight adult specimens and two clutches of eggs, used for the description of the species (García-París & Wake 2000). We have been able to observe 28 individuals and seems that it could prefer a certain type of microhabitat. In a single plot, we found 13 individuals in the swamp habitat, close to the coastal line, in coconut palm grove and decomposing palm leaves. We also have found a concentration of specimens around coconut palm grove, in a more recent expedition (in August 2021) we found five individuals during a 10 minutes search in about 1 m².



Figure 2.

Surveyed habitat and the critically endangered species from Escudo de Veraguas Island. A) Forest; B) swamp; C) Maritime Worm Salamander (*Oedipina marítima*); D) Costa Rica Stream dwelling Frog (*Craugastor ranoides*).

Table 2.

Occupancy modeling for Maritime Worm Salamander (*Oedipina marítima*) in Escudo de Veraguas Island

Model	AIC	deltaAIC	AIC		
			C	wgtMode	Likelihood
			l	d	no.Par.
psi(.),p(.)	56.69	0.00	0.4212	1.0000	2
psi(swamp.),p(.)	57.23	0.54	0.3215	0.7634	2
psi(forest+swamp.),p(.)	58.40	1.71	0.1791	0.4253	3
psi(forest.),p(.)	60.06	3.37	0.0781	0.1854	2



Table 3.

Occupancy modeling for Costa Rica stream-dwelling frog (*Craugastor ranoides*) in Escudo de Veraguas Island

Model	AIC	deltaAIC	AIC		
			wgtMode	Likelihood	no.Par.
psi(swamp),p(.)	50.12	0.00	0.3474	1.0000	2
psi(forest.),p(.)	50.37	0.25	0.3066	0.8825	2
psi(forest+swamp),p(.)	51.46	1.34	0.1778	0.5117	3
psi(.),p(.)	51.57	1.45	0.1683	0.4843	2

Although *Craugastor ranoides* have been usually found along fast-flowing streams and usually sit on boulders (Zumbado-Ulate et al. 2011; Puschendorf et al. 2019), in Escudo de Veraguas Island, there are no fast-flowing streams, neither rocks, instead slow flowing streams or merely stagnant water areas. The frog was found also far from any water source in the forest plots. Although *C. ranoides* is a stream dwelling species, it has been reported also far from streams during rainy season (Zumbado-Ulate et al. 2011). However, the climate around the Escudo de Veraguas island is more humid than the North Pacific side of Costa Rica, without a marked season throughout the year. The habitat occupation was similar for both types of habitats during all the survey.

Very few populations of *C. ranoides* appears to be stable (Puschendorf et al. 2019) and it has declined in mostly all areas of its distribution, with last known records for populations at Península de Santa Elena, Costa Rica and Escudo de Veraguas Island in Panama (this study). Seems that these two populations could be refuges for the species. However, there is a need to corroborate its identity through molecular genetic analysis. Given that a genetic variation and haplotype differentiation, have been found within populations in Santa Elena region. There is evidence of a close phylogenetic relationship with the related species *C. evanesco* of the *C. punctariolus* species group from Panama, with samples of the Cerro Cacao (cloud forest), near to the Santa Elena dry forest (Puschendorf et al. 2019). Then, the inclusion of any other population of *C. ranoides* from the rest of its distribution in molecular analysis is determinant to establish effective conservation actions.

State of conservation

Unfortunately, one of the habitats with presence of both species is located, the swamp, is right in the transition between the flooded area and the beach, which is also the site of greatest public use on the



island. This area is used also by local fishermen who stay temporarily on the island (usually between August to October), they cut the leaves of the palms and trees for the construction of ranches, the excessive cutting of these leaves and trees every year, could significantly increase the entry of sunlight and have consequences in the biology and distribution of these amphibians.

There are urgent measures that must be taken to guarantee the conservation of the species that inhabit the island. In the first place, make an exhaustive and detailed evaluation of the diversity present in the area, also it is a priority to carry out molecular genetic studies to determine the relationship between the island species with those on the mainland. Because many amphibians have accelerated evolutionary rates, some of the already identified species may have unique genetic characteristics, which could lead to the recognition of new species for science. As a conservation measure, it is suggested to allocate the areas with the highest density of species, to areas with restricted access and thus guarantee the survival in the long term for these Critically Endangered species.

Acknowledgment

We thank to our local assistants Vitalio Santiago y Emerson Santiago from Tobobe, Mariano Palacios and Héctor Santiago from Río Caña, who share with us their knowledge about the island and support the field work. Special thanks to Alicia Ibañez, the leader of the project Biodiversity of Escudo, for her passion and encouraging us to continuing working on the island. The Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT) through the projects Escudo de Veraguas Biodiversity and Anfibios en la Unión de las Américas (Contrato por Mérito No. 104-2018-4-FID17-117) funded this work and the bachelor thesis of Olmedo Santiago and Astrid Lizondro, with the themes: the herpetofauna from Escudo de Veraguas Island, and thermoecology of the *C. ranoides* respectively. The Sistema Nacional de Investigación of the SENACYT founded Abel Batista.



References

- Coates, A. G. , McNeill, D. F, Aubry, M.P., Berggren, W. A. , Collins LS. (2005). An introduction to the geology of the Bocas del Toro Archipelago, Panama. *Caribbean Journal of Science* 41: 374–391.
- García-París, M., Wake, D. B. (2000). Molecular phylogenetic analysis of relationships of the tropical salamander genera *Oedipina* and *Nototriton*, with descriptions of a new genus and three new species. *Copeia* 2000: 42–70.
- Heyer, W. R., Donnelly, M. A., McDiarmid, R. W., Hayek, L. C., Foster, M. S. (2001). Medición y monitoreo de la diversidad biológica, métodos estandarizados para anfibios. Editorial Universitaria de la Patagonia, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Argentina.
- Hines, J. E. (2006). PRESENCE- Software to estimate patch occupancy and related parameters. USGS-PWRC. <http://www.mbr-pwrc.usgs.gov/software/presence.html>.
- IUCN SSC Amphibian Specialist Group. 2020a. *Oedipina maritima*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2020: e.T59317A54355296. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T59317A54355296.en>. Downloaded on 16 September 2021.
- IUCN SSC Amphibian Specialist Group. 2020b. *Craugastor ranoides*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2020: e.T56901A54351272. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-2.RLTS.T56901A54351272.en>. Downloaded on 15 September 2021.
- MacKenzie, D. I., Nichols, J. D., Lachman, G. B., Droege, S., Royle, J. A., Langtimm, C. A. (2002). Estimating site occupancy rates when de-tection probabilities are less than one. *Ecology* 83: 2248–2255.
- Puschendorf, R., Wallace, M., Chavarría, M. M., Crawford, A. J., Wynne, F., Knight, M., ... Price, S. J. (2019). Cryptic diversity and ranavirus infection of a critically endangered Neotropical frog before and after population collapse. *Animal Conservation* 22: 515–524.
- Zumbado-Ulate, H., Bolanos, F., Willink, B., Soley-Guardia, F. (2011). Population status and natural history notes on the critically endangered stream dwelling frog *Craugastor ranoides* (Craugastoridae) in a Costa Rican tropical dry forest. *Herpetological Conservation and Biology* 6: 455–464.