

Seguimiento de poblaciones de anfibios mediante la integración de historiales de captura y herramientas moleculares

Integrative monitoring of amphibian populations based on individual capture histories and molecular data

Gregorio Sánchez-Montes, Íñigo Martínez-Solano*

Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC. c/ José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid.

*Correspondence: inigomsolano@mncn.csic.es

RESUMEN

Planificar acciones de conservación para favorecer la persistencia de poblaciones de anfibios en ambientes cada vez más fragmentados y degradados requiere un conocimiento profundo de su biología. Sin embargo, el estado de conocimiento de las dinámicas poblacionales de la mayor parte de las especies ibéricas es escaso y fragmentario, y apenas existen estudios que puedan paliar estas carencias. En este trabajo se sintetizan los principales resultados de un programa de seguimiento a largo plazo de una comunidad de anfibios iniciado en 2009 en la sierra de Guadarrama (Madrid) y mantenido ininterrumpidamente hasta la actualidad. Este programa se basa en la integración de historiales de captura obtenidos mediante el marcaje con PIT-tags y datos moleculares. Los resultados muestran que cinco de las especies estudiadas (*Pleurodeles waltl* Michahelles, 1830, *Triturus marmoratus* (Latreille, 1800), *Alytes cisternasii* Boscá, 1879, *Pelobates cultripes* (Cuvier, 1829) y *Epidalea calamita* (Laurenti, 1768)) pueden alcanzar edades superiores a 10 años en el medio natural, mientras que otras dos (*Hyla molleri* Bedriaga, 1889 y *Pelophylax perezi* (López Seoane, 1885)) tienen una longevidad menor. Las estimaciones de abundancia muestran la existencia de poblaciones relativamente grandes y estables en la mayoría de especies, aunque *E. calamita* y *H. molleri* presentan amplias fluctuaciones interanuales y *P. perezi* sufrió un fuerte declive poblacional sostenido desde el inicio del estudio. Las estimaciones de tamaños efectivos poblacionales (N_e y N_g) son muy inferiores a los tamaños estimados de censo de las diferentes especies, que a su vez presentan valores moderados o altos (*E. calamita*) de diversidad genética. Se han registrado desplazamientos de individuos marcados entre puntos de reproducción alejados entre sí 700 metros para cinco de las especies de estudio (*P. waltl*, *E. calamita*, *P. cultripes*, *H. molleri* y *P. perezi*), destacando esta última especie por su alta movilidad. Los patrones de migración entre puntos de reproducción son asimétricos, con un sentido preferente que difiere entre especies. Se discuten las implicaciones de estos resultados para la conservación a largo plazo de comunidades de anfibios.

PALABRAS CLAVE: Anfibios, abundancia, conservación, demografía, dispersión.

ABSTRACT

Designing conservation actions to favor the persistence of amphibian populations in their increasingly fragmented and degraded habitats requires a deep understanding of their biology. However, our knowledge about population dynamics of most Iberian amphibians is scarce and incomplete, with a lack of studies providing relevant information. Here we summarize the main results of a long term amphibian monitoring program in Sierra de Guadarrama (Spain) carried out uninterruptedly since 2009. This program is based on the integration of capture histories from PIT-tagged individuals and molecular data. Our results show that five species (*Pleurodeles waltl* Michahelles, 1830, *Triturus marmoratus* (Latreille, 1800), *Alytes cisternasii* Boscá, 1879, *Pelobates cultripes* (Cuvier, 1829), and *Epidalea calamita* (Laurenti, 1768)) can live more than 10 years in the wild, whereas two (*Hyla molleri* Bedriaga, 1889 and *Pelophylax perezi* (López Seoane, 1885)) have shorter lifespans. Abundance estimates indicate populations of most species are relatively large and stable, albeit *E. calamita* and *H. molleri* show large interannual fluctuations and *P. perezi* suffered a strong, sustained population decline since the beginning of the study. Effective population size estimates (N_e and N_g) are much smaller than population census estimates of the different species, which show moderate or high (*E. calamita*) levels of genetic diversity. We recorded displacements of marked individuals between breeding sites located 700 m apart in five species (*P. waltl*, *E. calamita*, *P. cultripes*, *H. molleri*, and *P. perezi*), the latter exhibiting the highest mobility. Migration rates between breeding sites were asymmetric and differed among species in their preferred directionality. We discuss the implications of these results for the long-term conservation of amphibian communities.

KEY WORDS: Amphibians, abundance, conservation, demography, dispersal.

LABURPENA

Gero eta isolatuagoak eta andeatuagoak dauden inguruneetako anfibioen populazioen iraunkortasuna bermatuko duten kontserbazio-ekintzak planifikatzeko, beharrezkoa da haien biologiaren ezagutza sakona. Hala ere, espezie iberiar gehienek populazio-dinamiken ezagutza-egoera urria eta zatikatua da, eta ia ez dago hutsune horiek bete ditzakeen ikerketarik. Lan honetan, 2009an Guadarrama mendilerroan (Madrid) hasi eta gaur egun arte etenik gabe mantendu den anfibio-komunitate baten epe luzeako jarraipen-programaren emaitza nagusiak laburbiltzen dira. Programa hau PIT-tag markaketaren bidez bildutako erregistro-historialen eta datu molekularren integrazioan oinarritzen da. Emaitzek erakusten dutenez, aztertutako espezieetako bost (*Pleurodeles waltl* Michahelles, 1830, *Triturus marmoratus* (Latreille, 1800), *Alytes cisternasii* Boscá, 1879, *Pelobates cultripes* (Cuvier, 1829) eta *Epidalea calamita* (Laurenti, 1768)) ingurune naturalean 10 urtetik gorako adina

izan dezakete, eta beste bi (*Hyla molleri* Bedriaga, 1889 eta *Pelophylax perezi* (López Seoane, 1885)), berriz, bizitza-luzera laburragoa. Ugaritasun-estimazioek erakusten dute populazio handi eta egonkor samarrak daudela espezie gehienetan, nahiz eta *E. calamita* eta *H. molleri* espezieek urte arteko gorabehera handiak dituzten, eta *P. perezi* espezieak populazio-gainbehera handia jasan zuen azterketa hasi zenetik. Populazio-tamaina efektiboen estimazioak (N_b eta N_e) espezie desberdinen erroldako tamaina estimatuak baino askoz txikiagoak dira, baina, aldi berean, espezieek dibertsitate genetiko nahiko altua dute, batez ere *E. calamita*-k. Elkarrengandik 700 metrotara bananduriko ugalketa-puntuen arteko aleen arteko joan-etorria hauteman da bost espezieetan (*P. waltoni*, *E. calamita*, *P. cultripipes*, *H. molleri* eta *P. perezi*), *P. perezi* nabarmentzen delarik. Ugalketa-puntuen arteko migrazio-tasak asimetrikoak dira, hots, espezieek preferentzia desberdinak dituzte. Eraitza hauetan anfibioen komunitateak epe luzera kontserbatzeko dituzten ondorioak eztabaidatzen dira.

GAKO-HITZAK: Anfibioak, ugaritasuna, kontserbazioa, demografia, mugikortasuna.

INTRODUCCIÓN

Las poblaciones de anfibios están en declive en todo el mundo (Campbell Grant *et al.*, 2020) y muchas administraciones locales y regionales están desarrollando planes de gestión y acciones de conservación cuyo éxito depende de su buen ajuste a la biología y demografía de las especies a proteger (Brooks, 2020). Lamentablemente, sabemos poco de la biología y demografía de la mayor parte de especies de anfibios, incluidas las más comunes (Green *et al.*, 2020). Por ello, es necesario empezar por diseñar planes de seguimiento que nos aporten la información necesaria.

Entre los parámetros más importantes para valorar la probabilidad de persistencia de una población de anfibios a largo plazo o la efectividad de las medidas dirigidas a mejorar su estado de conservación podemos considerar los siguientes: 1) el número de individuos que componen la población, 2) su edad de maduración y longevidad, que permiten caracterizar la estructura de edades de la población, 3) su fecundidad y éxito reproductor, que determinan la tasa de renovación de la población y su capacidad para mantener la diversidad genética, y 4) su capacidad de dispersión, que es clave para evaluar el grado de conectividad potencial entre núcleos reproductores (Guarino *et al.*, 2003; Morrison y Hero, 2003; Joly, 2019). Estos parámetros son difíciles de estimar en el campo y generalmente requieren el marcaje y seguimiento de los individuos a lo largo de múltiples temporadas de reproducción, bien con microchips o *transponders* (PIT-tags) o con métodos menos invasivos, como la foto-identificación (Cruickshank y Schmidt, 2017). En combinación con estas técnicas de marcaje, la aplicación de herramientas moleculares aporta información complementaria muy valiosa para comprender mejor la biología y dinámicas poblacionales de los anfibios, por ejemplo mediante la estimación de índices de diversidad y estructura genética o de tasas de migración y flujo genético entre puntos de reproducción (Beebee, 2005; McCartney-Melstad y Shaffer, 2015; Pabijan *et al.*, 2020). Es urgente diseñar protocolos de muestreo eficaces que permitan obtener los datos necesarios para estimar todos estos parámetros a lo largo del tiempo y de manera comparable entre distintas localidades y regiones, con el fin de caracterizar las fluctuaciones demográficas, tanto naturales como afectadas por actividades humanas, que muestran las distintas especies.

La península ibérica presenta una alta diversidad de anfibios, con una elevada proporción de especies endémi-

cas (Salvador y Martínez-Solano, 2021). Aunque la última actualización general de su estado de conservación data ya de 20 años atrás (Pleguezuelos *et al.*, 2002), los datos más recientes muestran tendencias a la baja en la mayor parte de especies (AHE, 2021). A las amenazas principales detectadas hace décadas, sobre todo la destrucción y alteración de hábitats acuáticos (Ferreira y Beja, 2013), se han sumado con fuerza otras cuyo impacto solo se intuía entonces, como la introducción de especies exóticas y la aparición de nuevas enfermedades infecciosas (ranavirrosis y quitridiomycosis) (Price *et al.*, 2014; Mota-Ferreira y Beja, 2020; Bosch *et al.*, 2021; Thumsová *et al.*, 2021). Esta situación hace necesaria la adopción de medidas para la conservación a largo plazo de este rico patrimonio biológico. Sin embargo, nuestro conocimiento acerca de la biología y dinámicas poblacionales de la mayor parte de las especies ibéricas es escaso y fragmentario, y apenas existen programas de seguimiento a largo plazo que puedan paliar estos importantes vacíos de conocimiento.

En este trabajo se resumen algunos de los principales resultados de un programa de seguimiento de estas características. Se trata de un estudio iniciado en 2009 y desarrollado ininterrumpidamente hasta la actualidad, en el que se ha monitorizado una comunidad de anfibios de la sierra de Guadarrama, en el norte de la Comunidad de Madrid (Sánchez-Montes y Martínez-Solano, 2011; Sánchez-Montes *et al.*, 2017a; Capellà-Marzo *et al.*, 2020; Fernández de Larrea *et al.*, 2021). Para ello, se han marcado individuos de diferentes especies con PIT-tags y se han genotipado representantes de diferentes cohortes a lo largo de los años utilizando marcadores moleculares (microsatélites), con el objetivo de obtener estimaciones de cuatro parámetros demográficos clave: 1) longevidad máxima de cada especie en el medio natural, 2) tamaños poblacionales (número de adultos y tamaños efectivos, que corresponden al censo de individuos adultos y a la fracción reproductora de los mismos, respectivamente), 3) diversidad genética, y 4) estructura genética y tasas de dispersión. Los resultados aportan valiosa información acerca de la biología y dinámicas poblacionales de diferentes especies, que puede ser aplicada en programas de conservación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área y especies de estudio

El área de estudio se localiza entre los municipios de Valdemanco y La Cabrera, en el norte de la Comunidad

de Madrid, en la vertiente sur de la sierra de Guadarrama (Fig. 1). Durante el periodo de estudio se han muestreado de forma intensiva dos humedales que constituyen los principales puntos de reproducción para la comunidad de anfibios de la zona y que distan 700 metros entre sí: la Gravera y la Laguna de Valdemanco. Se trata de sistemas acuáticos temporales, de hidroperiodo variable, que suelen llenarse de agua con las lluvias invernales y secarse completamente en verano (ver detalles en Sánchez-Montes y Martínez-Solano, 2011; Sánchez-Montes *et al.*, 2017a; Capellà-Marzo *et al.*, 2020; Fernández de Larrea *et al.*, 2021).

Las especies de anfibios que se reproducen en el área de estudio son (Fig. 2): gallipato (*Pleurodeles waltl* Michahelles, 1830), tritón jaspeado (*Triturus marmoratus* (Latreille, 1800)), sapo partero ibérico (*Alytes cisternasii* Bos-

cá, 1879), sapo de espuelas (*Pelobates cultripes* (Cuvier, 1829)), sapo corredor (*Epidalea calamita* (Laurenti, 1768)), ranita de San Antonio ibérica (*Hyla molleri* Bedriaga, 1889) y rana verde común (*Pelophylax perezi* (López Seoane, 1885)). Ocasionalmente se han localizado además individuos aislados de otras dos especies, el sapillo pintojo ibérico (*Discoglossus galganoi* Capula, Nascetti, Lanza, Bullini y Crespo, 1985) y el sapo común ibérico (*Bufo spinosus* Daudin, 1803), que no presentan poblaciones reproductoras estables en las dos lagunas estudiadas.

Procedimiento de muestreo

El protocolo de campo ha sido descrito en detalle en Sánchez-Montes *et al.* (2017a), Gutiérrez-Rodríguez *et al.*

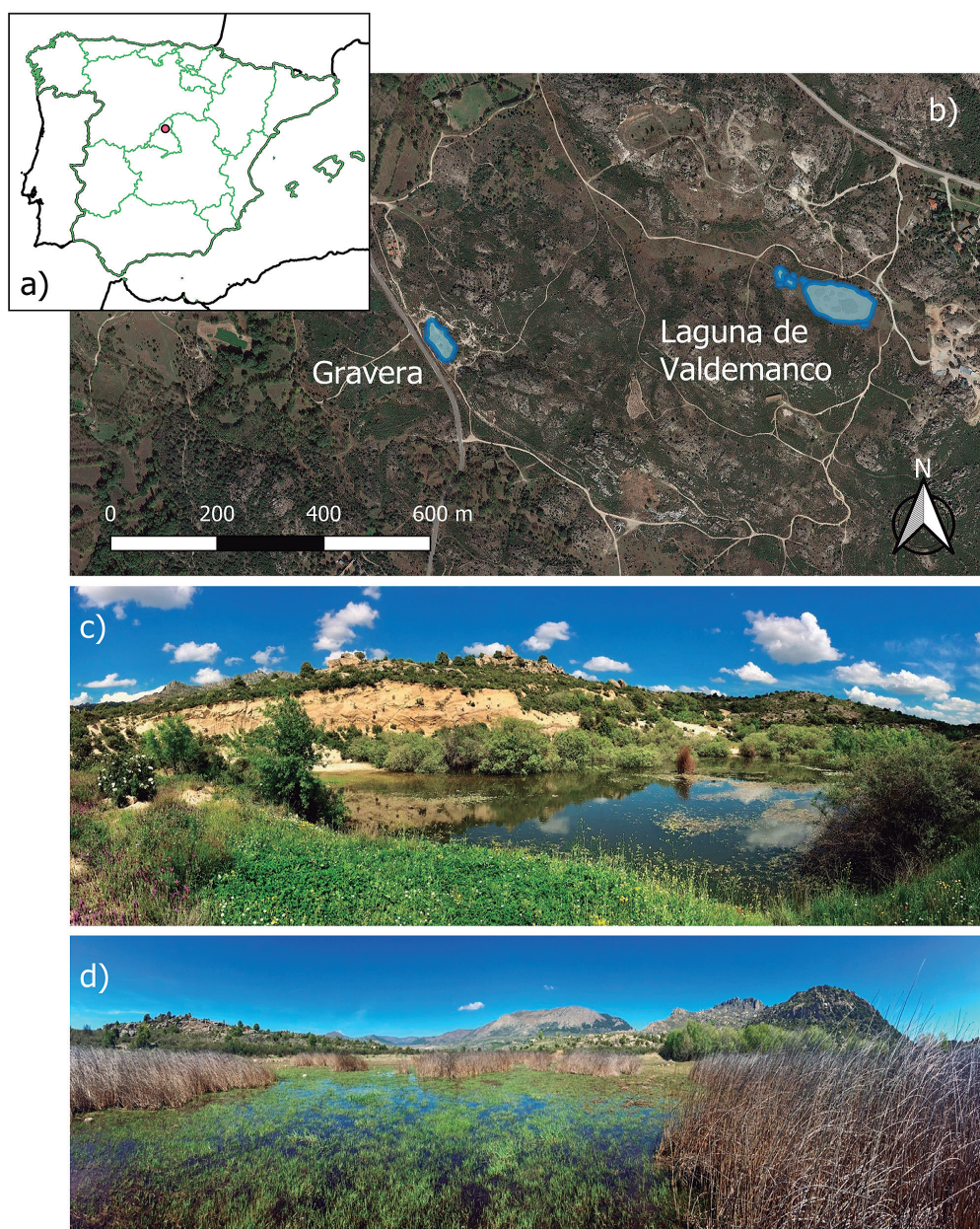


Fig. 1. - a) Localización del área de estudio al norte de la Comunidad de Madrid. b) Imagen de satélite en la que se marcan los dos principales humedales de estudio: la Gravera (fotografiada en detalle en c) y la Laguna de Valdemanco (fotografía d).



Fig. 2. - Anfibios presentes en el área de estudio. De izquierda a derecha y de arriba abajo: *Pleurodeles waltl*, *Triturus marmoratus*, *Alytes cisternasii*, *Pelobates cultripes*, *Epidalea calamita*, *Hyla molleri*, *Pelophylax perezi* y *Bufo spinosus*.

(2017), Capellà-Marzo *et al.* (2020) y Fernández de Larrea *et al.* (2021). Brevemente, durante el periodo de actividad de las diferentes especies se llevaron a cabo muestreos nocturnos en los que se trató de localizar y capturar a todos los individuos presentes en el área de estudio. Los muestreos se centraron principalmente en los dos puntos de reproducción citados (la Laguna de Valdemanco y la Gravera), aunque también se muestrearon otros puntos de reproducción menores (piscinas abandonadas, abrevaderos, canteras) y los caminos que atraviesan el área de estudio. Se registró el lugar de captura de cada individuo y se tomaron datos biométricos (longitud hocico-cloaca, longitud total, masa corporal). Posteriormente se les implantó un PIT-tag con un código alfanumérico único para su identificación (Fig. 3) y se tomó una pequeña muestra de tejido para realizar análisis moleculares. Todos los ejemplares fueron liberados en el mismo lugar de captura al finalizar su procesamiento.

Análisis de historiales de captura

Para cada individuo marcado se elaboraron historiales de captura, indicando aquellas fechas en las que fue observado (1) o no (0) a lo largo del programa de seguimiento. A partir de estos historiales se extrajo información acerca de los desplazamientos realizados por individuos capturados en localizaciones múltiples (Sánchez-Montes y Martínez-Solano, 2011; Gutiérrez-Rodríguez *et al.*, 2017; Sánchez-Montes *et al.*, 2018; Capellà-Marzo *et al.*, 2020;

Fernández de Larrea *et al.*, 2021), y su longevidad (estimada indirectamente a partir del tiempo máximo transcurrido entre capturas). Además, se estimó el número de machos y hembras adultos de las diferentes especies (N_a) en sucesivas temporadas de reproducción aplicando análisis de captura-recaptura con el programa MARK (White y Burnham, 1999) (ver detalles en Sánchez-Montes *et al.*, 2017a; Gutiérrez-Rodríguez *et al.*, 2017; Capellà-Marzo *et al.*, 2020 y Fernández de Larrea *et al.*, 2021).

Análisis moleculares

La muestra de tejido tomada a cada individuo marcado se utilizó para extraer su ADN genómico y posteriormente genotiparlo mediante marcadores específicos de tipo microsatélite (Gutiérrez-Rodríguez y Martínez-Solano, 2013; Gutiérrez-Rodríguez *et al.*, 2014; Sánchez-Montes *et al.*, 2016, 2017b). A partir de los perfiles genéticos obtenidos (genotipos) se estimaron diferentes parámetros, como el número efectivo de reproductores (N_b , Waples y Antao, 2014), el tamaño efectivo de la población (N_e , Wang *et al.*, 2016), así como diferentes índices de diversidad genética, como la riqueza alélica media (Gutiérrez-Rodríguez *et al.*, 2017; Sánchez-Montes *et al.*, 2017a; Capellà-Marzo *et al.*, 2020; Fernández de Larrea *et al.*, 2021). Además, se estimaron índices de diferenciación genética (F_{ST} , G_{ST}) y tasas de migración entre puntos de reproducción (Capellà-Marzo *et al.*, 2020; Fernández de Larrea *et al.*, 2021).



Fig. 3. - Procesamiento de un individuo de *Pelophylax perezi* en el campo. Se muestra el material empleado para el registro de variables biométricas (regla y báscula), la implantación de PIT-tags (aguja y microchips, detalle abajo), la lectura de los PIT-tags (detalle de la lectura del código de un individuo de *Alytes cisternasii*, esquina inferior izquierda) y la toma de muestras de tejido (tubos con etanol absoluto etiquetados, alcohol para desinfección del material).

RESULTADOS

A lo largo del estudio se han registrado individuos marcados de cuatro especies (*P. waltl*, *A. cisternasii*, *E. calamita* y *P. cultripes*) con intervalos máximos entre capturas superiores a 10 años (Tabla 1). Teniendo en cuenta que casi todos los individuos marcados al principio del estudio fueron adultos, y sumando por tanto la edad estimada de maduración, se obtuvieron estimaciones mínimas de longevidad en el medio natural superiores a los 12 años para estas cuatro especies (Tabla 1). La longevidad estimada para las hembras de *T. marmoratus* superó los 10 años. Por su parte, *P. perezi* y, sobre todo, *H. molleri*, presentaron una longevidad menor que el resto de especies y son, por tanto, las de ciclo de vida más corto dentro de la comunidad de anfibios de estudio.

Las estimaciones de abundancia disponibles hasta el momento (para cinco de las siete especies que se reproducen en el área de estudio) indican que la Laguna de Valdemanco presenta poblaciones relativamente abundantes de *P. waltl*, con alrededor de 300 individuos de cada sexo y *P. cultripes*, con cerca de 150 individuos de cada sexo. *Epidalea calamita*, con una sex-ratio muy sesgada hacia los machos, y *H. molleri*, para la que solo se han podido obtener estimaciones para los machos, mostraron fuertes fluctuaciones en su abundancia a lo largo de los años (Fig. 4). Las estimaciones de *P. perezi* en la Laguna de Valdemanco revelan un fuerte declive poblacional sostenido desde el principio del estudio, aunque con indicios

que apuntan a una posible recuperación en el año 2019. El declive de esta especie también ha sido patente (aunque menos acusado) en la Gravera, que a su vez presenta una población relevante de *P. waltl*, con un censo total superior a los 300 adultos (Fig. 4).

Especie	Sexo	Tmax (años)	Madur (años)	Long (años)
<i>Pleurodeles waltl</i>	Macho	12,08	1,5	13,58
	Hembra	11,78*	1,5	13,28
<i>Triturus marmoratus</i>	Macho	3,08	4,17	7,25
	Hembra	7,42	4,4	11,82
<i>Alytes cisternasii</i>	Macho	10,64	2	12,64
	Hembra	7,16	2	9,16
<i>Epidalea calamita</i>	Macho	10,18	3	13,18
	Hembra	9,90	4	13,90
<i>Pelobates cultripes</i>	Macho	9,88	3	12,88
	Hembra	10,95	3	13,95
<i>Hyla molleri</i>	Macho	3,12	1	4,12
	Hembra	3,14	2	5,14
<i>Pelophylax perezi</i>	Macho	4,11	2	6,11
	Hembra	6,11	3	9,11

Tabla 1. - Tiempo máximo registrado entre capturas de un mismo individuo (Tmax), para machos y hembras de cada especie de estudio. Se indica también la edad media de madurez sexual según Trochet *et al.*, (2014) (Madur) y la estimación mínima de longevidad (Long = Tmax+Madur). *: Fue marcada como juvenil inmaduro, con una longitud hocico-cloaca = 56 mm y una longitud total = 109 mm.

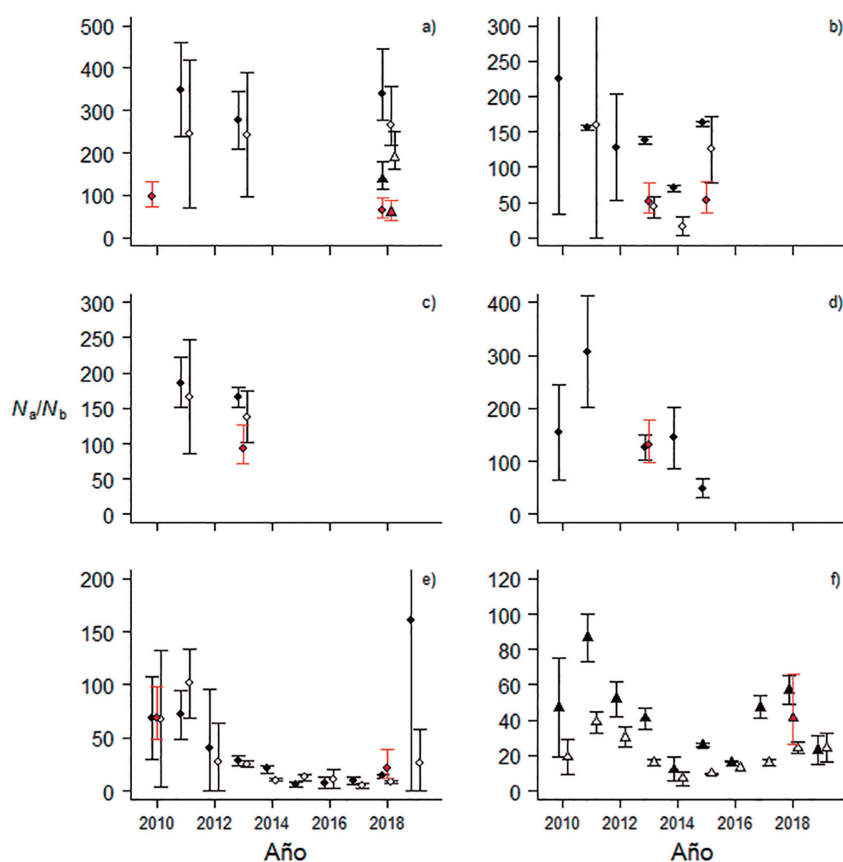


Fig. 4. - Estimaciones de abundancia (número de adultos de cada sexo, N_a ; machos: símbolos negros, hembras: símbolos blancos) y número efectivo de reproductores (N_b , símbolos rojos; las estimaciones de *P. waltl* en 2018 corresponden al tamaño efectivo poblacional, N_e) para las poblaciones de la Laguna de Valdemanco (círculos) y la Gravera (triángulos) a lo largo del periodo de estudio. Las barras de error de cada estimación representan el intervalo de confianza al 95% (algunos límites superiores sobrepasan la escala del gráfico). a) *Pleurodeles waltl*, b) *Epidalea calamita*, c) *Pelobates cultripes*, d) *Hyla molleri*, e) *Pelophylax perezi* (Laguna de Valdemanco), f) *P. perezi* (Gravera).

Los tamaños efectivos, medidos como N_b o N_e , son muy inferiores al tamaño estimado de censo o abundancia (N_a), con valores cercanos a la mitad de N_a o muy por debajo, según la especie (Fig. 4). En aquellas especies para las que se dispone de más de una estimación de N_b (o N_e) a lo largo del estudio, este parámetro parece relativamente estable en el tiempo, con la excepción de *P. perezi* en la Laguna de Valdemanco, que presentó un fuerte descenso de N_b entre 2010 y 2018. Las poblaciones de *P. waltl* y *P. perezi* de la Gravera, pese a presentar en general abundancias inferiores a la Laguna de Valdemanco, mostraron estimaciones de N_b (o N_e) similares (*P. waltl*) o incluso superiores (*P. perezi*).

Solo se dispone de estimaciones puntuales de diversidad genética para algunas de las poblaciones de estudio. Casi todas presentan valores de riqueza alélica media (es decir, calculada a partir de todos los marcadores utilizados para genotipar cada especie, respectivamente) entre 5 y 10 (Fig. 5). *Pleurodeles waltl* y *P. cultripipes* presentaron las estimaciones de riqueza alélica más bajas entre las especies de estudio. Por su parte, *E. calamita* presentó una diversidad genética muy superior al resto de las especies. La población de *P. waltl* de la Laguna de Valdemanco mostró valores similares entre 2010 y 2018, mientras que la riqueza alélica de la población de *P. perezi* disminuyó durante el mismo periodo (Fig. 5).

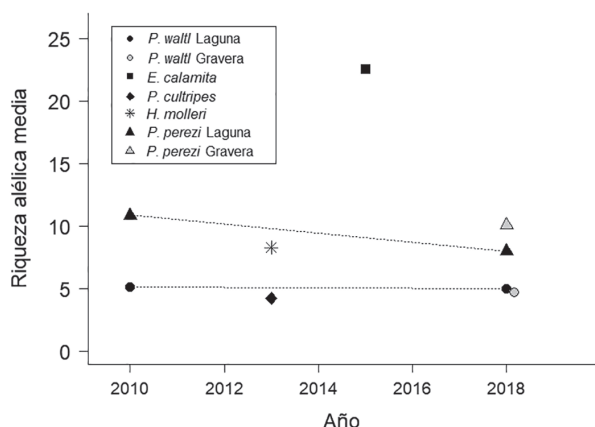


Fig. 5. - Estimaciones de diversidad genética (medida como riqueza alélica media) en las poblaciones de estudio.

Se han confirmado desplazamientos de individuos marcados entre la Laguna de Valdemanco y la Gravera (distantes 700 metros) para cinco de las especies de estudio: *P. waltl*, *E. calamita*, *P. cultripipes*, *H. molleri* y *P. perezi* (Fig. 6). La especie que presentó mayor movilidad fue *P. perezi*, con un elevado número de desplazamientos entre los dos puntos de reproducción principales, así como también hacia otros puntos de reproducción secundarios, como piscinas abandonadas y abrevaderos (Fig. 6e). La mayoría de los desplazamientos registrados para *P. waltl* y *H. molleri* se circunscribieron a la Laguna de Valdemanco y la Gravera, mientras que cierto número de individuos de *E. calamita* y *P. cultripipes* fueron también registrados desplazándose a áreas terrestres circundantes (Fig. 6).

Las estimaciones disponibles de diferenciación genética y tasas de migración por generación (TMG) muestran una amplia pero asimétrica conectividad entre las poblaciones de la Laguna de Valdemanco y la Gravera, tanto en *P. waltl* ($F_{ST} = 0,009$; $TMG_{Laguna-Gravera} = 31,8\%$ $TMG_{Gravera-Laguna} = 5,2\%$, Fernández de Larrea *et al.*, 2021) como en *P. perezi* ($G_{ST} = 0,082$; $TMG_{Laguna-Gravera} = 16,2\%$ $TMG_{Gravera-Laguna} = 29,9\%$, Capellà-Marzo *et al.*, 2020).

DISCUSIÓN

Mantener durante 12 años un estudio demográfico basado en el marcaje y seguimiento de individuos de varias especies de anfibios requiere un esfuerzo considerable de tiempo y recursos materiales y personales, pero aporta estimaciones precisas de parámetros clave para entender sus poco conocidas dinámicas poblacionales.

Algunas de las preguntas más básicas sobre la biología de cualquier especie se refieren a su longevidad: ¿cuánto vive una rana? En el caso de los anfibios, incluso en las especies más comunes, esta pregunta sigue sin respuesta clara. Primero, por ser una pregunta ambigua. ¿Qué queremos saber, cuánto puede llegar a vivir? ¿O cuánto suelen llegar a vivir los individuos habitualmente? ¿Nos referimos a condiciones de cautividad o en su medio natural? Segundo, porque existen pocos datos que permitan intentar resolver alguna de estas cuestiones. Los resultados obtenidos hasta el momento en este programa de seguimiento certifican que al menos cuatro de las especies de estudio (*P. waltl*, *A. cisternasii*, *P. cultripipes* y *E. calamita*) presentan individuos que llegan a superar los 10 años de vida en su medio natural. Dado que la gran mayoría de los individuos se marcan como adultos maduros sexualmente (con algunas excepciones de marcaje de juveniles inmaduros que, en cualquier caso, tienen al menos cerca de un año de edad, ver Tabla 1), las estimas de longevidad de estas cuatro especies en su medio natural superan los 12 años, incluso aunque se consideren edades de maduración más tempranas (dos años de edad) que las documentadas en Trochet *et al.* (2014) (ver Tabla 1). Estos registros superan ampliamente la longevidad máxima documentada en su medio natural hasta la fecha para *A. cisternasii* (6 años, Márquez *et al.*, 1997) y *P. waltl* (10 años, Díaz-Paniagua *et al.*, 2005). También superan ligeramente la longevidad máxima documentada para *P. cultripipes* (12 años, Talavera, 1990) y para poblaciones ibéricas de *E. calamita* (12 años, Oromí *et al.*, 2012). Actualmente se siguen registrando recapturas de individuos de estas cuatro especies marcados al inicio del programa de seguimiento, por lo que es posible que algunas estimaciones de longevidad sigan aumentando.

Las estimaciones de longevidad de *T. marmoratus* apuntan a que esta especie puede también superar los 10 años de edad en la población de estudio, al menos en el caso de las hembras, aunque la edad de maduración sexual obtenida de la bibliografía puede resultar una sobrestimación (Tabla 1). Sin embargo, se han documentado longevidades incluso superiores (hasta 14-15 años) en poblaciones francesas y portuguesas (Caetano *et al.*, 1985;

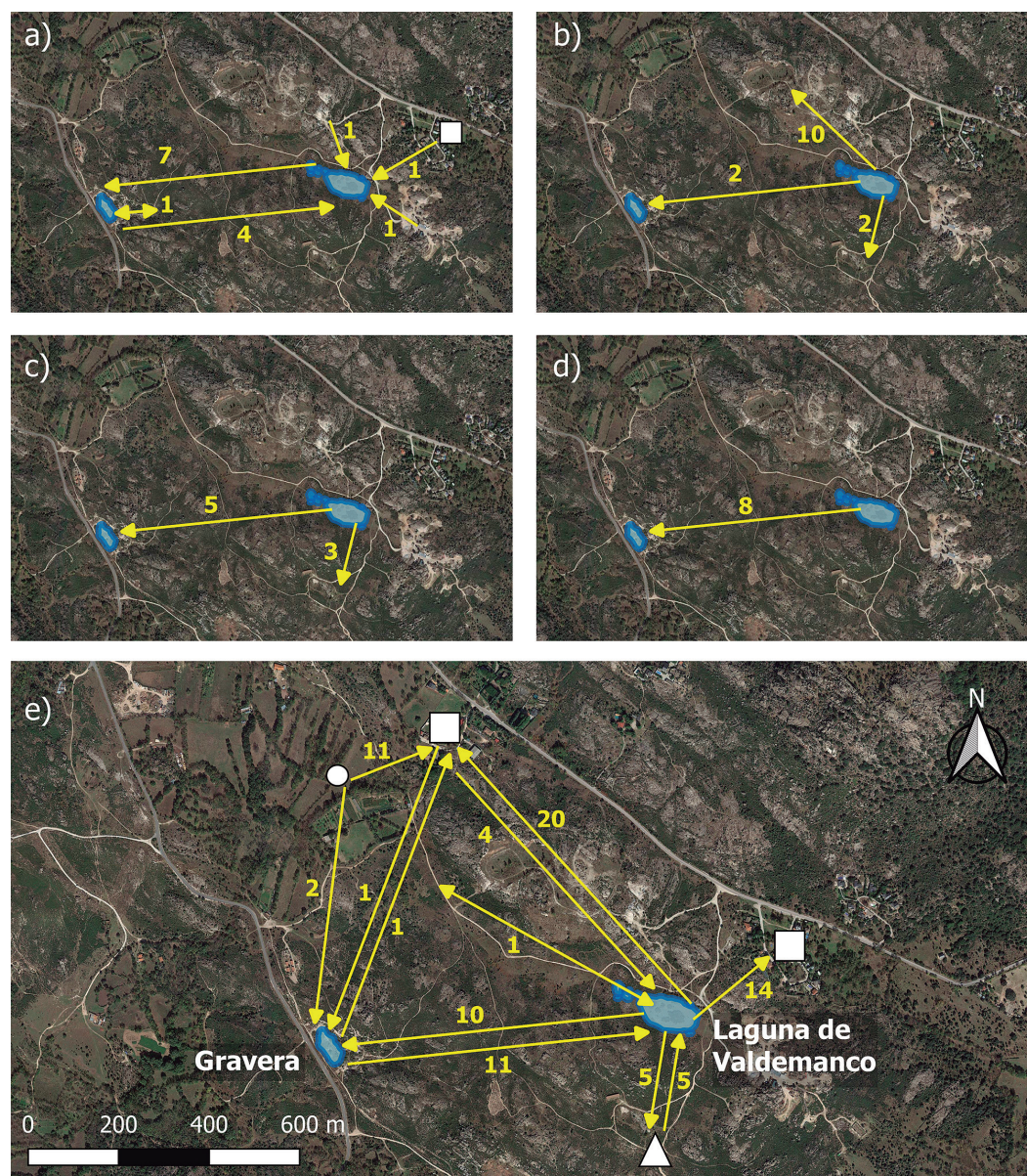


Fig. 6. - Número de desplazamientos (algunos individuos han realizado más de un desplazamiento) observados para cada especie a través de los diferentes puntos muestreados en el área de estudio. Se indica la localización de los dos puntos de reproducción principales del área de estudio (Laguna de Valdemanco y Gravera). El resto de localizaciones de individuos corresponden a puntos de reproducción secundarios (triángulo: abrevadero; cuadrados: piscinas abandonadas; círculo: arroyo) o áreas terrestres (sin símbolos). Las flechas bidireccionales indican desplazamientos de ida y vuelta realizados por un mismo individuo. a) *Pleurodeles waltl*, b) *Epidalea calamita*, c) *Pelobates cultripes*, d) *Hyla molleri*, e) *Pelophylax perezi*.

Francillon-Vieillot *et al.*, 1990). Por su parte, *H. molleri* apenas supera los 4-5 años de edad, lo que representa la primera estimación de longevidad para la especie y pone de manifiesto que se trata de una rana de ciclo de vida corto. Tampoco *P. perezi* parece alcanzar los 10 años de edad en el medio natural, aunque nuestros registros de longevidad (Tabla 1) superan ampliamente los documentados hasta la fecha para la especie, tanto en machos (5 años, Docampo y Milagrosa-Vega, 1991; Patón *et al.*, 1991) como, sobre todo, en hembras (6 años, Patón *et al.*, 1991; Esteban *et al.*, 1996). Todos los datos previos de longevidad en las siete especies corresponden a estimaciones indirectas basadas en esqueletocronología, una técnica consistente en el recuento de líneas anuales de crecimiento depositadas en los huesos de los individuos y que resulta especialmente compleja en ejemplares longevos, ya que los anillos de crecimiento son cada vez más estrechos y se acumulan en

los bordes exteriores del hueso (Sinsch, 2015). Los registros directos obtenidos gracias al marcaje y seguimiento de individuos han permitido, por tanto, certificar y, en varios casos, aumentar las estimaciones disponibles de longevidad para estas especies.

También son muy escasos los estudios que aportan estimaciones de tamaños poblacionales en anfibios, y más aún los que documentan su variación a lo largo del tiempo. Por este motivo, resulta complicado poner en contexto nuestras estimaciones de abundancia, que además corresponden todavía a series temporales demasiado cortas como para caracterizar adecuadamente las dinámicas demográficas de estas especies. Sin embargo, se ha podido estimar con una precisión creciente a lo largo de los años el número de machos de la población de *H. molleri* de la Laguna de Valdemanco y el número de individuos de ambos sexos de las poblaciones de *E. calamita*, *P. cultri-*

pes, *P. waltl* y *P. perezi*. Las dos últimas especies cuentan también con poblaciones reproductoras importantes en la Gravera (Fig. 4).

Los resultados son especialmente llamativos en el caso de *P. perezi*, cuya población ha experimentado un marcado cuello de botella entre 2013 y 2018, tanto en la Gravera como, especialmente, en la Laguna de Valdemanco. Las consecuencias de este fuerte declive demográfico han quedado de manifiesto en la reducción del número efectivo de reproductores (Fig. 4) y de la riqueza alélica de la población de la Laguna de Valdemanco (Fig. 5), lo que confirma el efecto genético del cuello de botella que se ha registrado en tiempo real durante el periodo de estudio. La recuperación de la población, que parece iniciarse a partir de 2018, se fundamenta en la inmigración gracias a la gran capacidad de dispersión de la especie, según evidencian los registros de desplazamientos de individuos marcados durante este estudio, que son también los primeros documentados para la especie (Fig. 6e elaborada a partir de Capellà-Marzo *et al.*, 2020). También resulta esencial el papel de los núcleos de reproducción cercanos (<1 km de distancia) y con frecuencia no protegidos, como la Gravera, para la recuperación de poblaciones de biotopos protegidos como la Laguna de Valdemanco (Capellà-Marzo *et al.*, 2020). Es necesario continuar el seguimiento durante los próximos años para certificar hasta qué punto la población llega a recuperarse totalmente de un cuello de botella como el registrado para *P. perezi*, pero en cualquier caso queda claro el papel clave que juegan los puntos de reproducción secundarios, muchos de ellos de origen artificial (como piscinas abandonadas, abrevaderos o la propia Gravera, originada por extracción de áridos) para la persistencia de poblaciones de esta especie.

Del resto de especies con estimaciones demográficas en este proyecto de seguimiento, *E. calamita* es la más estudiada históricamente a lo largo de su amplia área de distribución, aunque los datos sobre tamaños poblacionales son igualmente escasos. En la península ibérica es una especie abundante, aunque existen poblaciones relictas y aisladas en la franja norte (Garin-Barrio *et al.*, 2007). La población de *E. calamita* de la Laguna de Valdemanco es relativamente abundante, aunque las estimaciones muestran cierta fluctuación en el tiempo, y una razón de sexos operativa (es decir, basada en datos de la temporada reproductora) consistentemente sesgada hacia los machos (Fig. 4). El número total de adultos fluctúa en torno a los 200 individuos, similar al número de individuos marcados en estudios de poblaciones en Alemania (Sinsch, 1992; Sinsch y Seidel, 1995) y a las estimaciones indirectas obtenidas a partir de conteos de puestas de huevos en poblaciones británicas, donde la especie ha sufrido fuertes declives (Beebee, 2009). El número efectivo de reproductores (N_b) de la Laguna de Valdemanco, sin embargo, supera ampliamente al de todas las poblaciones británicas estudiadas por Beebee (2009), y la diversidad genética de la población de Valdemanco es elevada, de acuerdo con el papel de la península ibérica como refugio de la especie durante las glaciaciones del Pleistoceno (Beebee y Rowe, 2000).

También *P. waltl*, *P. cultripres* y *H. molleri* cuentan con poblaciones relativamente abundantes en la zona de estudio (Fig. 4), aunque no existen estudios demográficos similares en otras localidades con las que poder comparar las estimaciones. El número de machos y hembras de *P. waltl* y *P. cultripres* parece mantenerse estable, pero es necesario continuar con el seguimiento para comprobar si se trata de una estabilidad real, ya que los datos de longevidad muestran que se trata de dos especies longevas, para las que las fluctuaciones demográficas pueden extenderse a lo largo de varios años. Además, ambas especies presentan las estimaciones de riqueza alélica más bajas de todas las especies estudiadas (Fig. 5), por lo que es necesario monitorizar el tamaño efectivo de sus poblaciones para detectar posibles cuellos de botella que puedan erosionar de manera grave su diversidad genética. En el caso de *H. molleri*, no se ha conseguido aún estimar el número de hembras de la población, ya que su comportamiento (pasan pocas noches en los puntos de reproducción) dificulta obtener recapturas suficientes para realizar análisis de captura-recaptura. Las estimaciones del número de machos son relativamente altas (Fig. 4); aunque no existen datos de abundancia en otras localidades con las que poder comparar, las estimaciones obtenidas en la Laguna de Valdemanco son superiores a los tamaños estimados de poblaciones de la especie congénérica *H. arborea* en Alemania y Suiza (Friedl y Klump, 1997; Pellet *et al.*, 2007).

Finalmente, las estimaciones de conectividad disponibles para *P. waltl* y *P. perezi* confirman que la Laguna de Valdemanco y la Gravera están conectadas por flujo genético y que se mantienen tasas de migración relativamente elevadas entre ellas. Mientras en el caso de *P. waltl* el flujo genético parece dirigirse principalmente desde la Laguna de Valdemanco hacia la Gravera, lo que se ha interpretado como una señal de la reciente colonización de la Gravera a partir de individuos procedentes de la Laguna (Fernández de Larrea *et al.*, 2021), en *P. perezi* es la Gravera la que ha proporcionado individuos emigrantes que han permitido iniciar de manera natural la recuperación de la población de la Laguna después del cuello de botella demográfico (Capellà-Marzo *et al.*, 2020). Los registros de desplazamientos de individuos marcados aportan una información fundamental para confirmar estas interpretaciones, ya que se han documentado desplazamientos de individuos entre ambos núcleos de reproducción, además de hacia otros puntos acuáticos y terrestres del área de estudio. *Pelophylax perezi* es la especie que presenta mayor movilidad, pero casi todas las especies muestran una alta capacidad de dispersión, lo que refuerza una vez más la importancia de mantener la conectividad entre núcleos reproductores para favorecer la persistencia y viabilidad de comunidades de anfibios.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto que las lagunas de conocimiento existentes acerca de las dinámicas poblacionales de los anfibios (como los tamaños de censo y efectivos de sus poblaciones, su

diversidad genética, sus estructuras de edad y la conectividad entre puntos de reproducción) pueden abordarse mediante el marcaje y seguimiento de individuos a lo largo del tiempo. Algunas características biológicas que son raramente atribuidas a los anfibios (como una elevada longevidad o una gran capacidad de dispersión) pueden tener una importancia mayor de la considerada hasta el momento a la hora de caracterizar sus dinámicas demográficas y diseñar medidas para favorecer la conectividad y persistencia de sus poblaciones. A pesar de la calidad de los datos que proporcionan los estudios basados en el marcaje y seguimiento de individuos, este tipo de programas son muy escasos y su continuidad representa, por tanto, una herramienta fundamental para hacer frente al declive global de los anfibios.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que han aportado su colaboración para el estudio y seguimiento de esta comunidad de anfibios, en especial a Jorge Gutiérrez, Carlos Caballero, Iñaki Fernández de Larrea, Gorka Ugarte, Daniel Jiménez, Samuel Sánchez, Berta Capellà, Helena Martínez, Rubén Plaza, María Durán, Pedro Montes, Adriana Carramolino, Miguel Peñalver, Esperanza Irazo, Garazi Rodríguez, José Agüera, Amaia Sabalza y Antonio Vilches. Los proyectos CGL2008-04271-C02-01-BOS, CGL2011-28300, CGL2017-83131-P y PID2020-116289GB-I00, aprobados en sucesivas convocatorias del Plan Nacional de I+D+i del Gobierno de España, han financiado los estudios sintetizados en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

AHE. 2021. SIARE: Servidor de Información de Anfibios y Reptiles de España. <https://siare.herpetologica.es/index.php?/bdh/distribucion>.

Beebee, T., 2005. Conservation genetics of amphibians. *Hereditas* 95, 423-427.

Beebee, T.J.C., 2009. A comparison of single-sample effective size estimators using empirical toad (*Bufo calamita*) population data: genetic compensation and population size-genetic diversity correlations. *Molecular Ecology* 18, 4790-4797.

Beebee, T.J.C., Rowe, G., 2000. Microsatellite analysis of natterjack toad *Bufo calamita* Laurenti populations: consequences of dispersal from a Pleistocene refugium. *Biological Journal of the Linnean Society* 69, 367-381.

Bosch, J., Martel, A., Sopniewski, J., Thumsová, B., Ayres, C., Scheele, B.C., Velo-Antón, G., Pasmans, F., 2021. *Batrachochytrium salamandrivorans* threat to the Iberian urodele hotspot. *Journal of Fungi* 7, 644.

Brooks, G.C., 2020. On the use of demographic models to inform amphibian conservation and management: a case study of the Reticulated Flatwoods Salamander. Ph. D. diss., Virginia Polytechnic Institute and State University.

Caetano, M.H., Castanet, J., Francillon, H., 1985. Détermination de l'âge de *Triturus marmoratus marmoratus* (Latreille, 1800) du Parc National de Peneda-Gerês (Portugal) par squelette-chronologie. *Amphibia-Reptilia* 6, 117-132.

Campbell Grant, E.H., Miller, D.A.W., Muths, E., 2020. A synthesis of evidence of drivers of amphibian declines. *Herpetologica* 76, 101-107.

Capellà-Marzo, B., Sánchez-Montes, G., Martínez-Solano, I., 2020. Contrasting demographic trends and asymmetric migration rates in a spatially structured amphibian population. *Integrative Zoology* 15, 482-497.

Cruikshank, S.S., Schmidt, B.R., 2017. Error rates and variation between observers are reduced with the use of photographic matching software for capture-recapture studies. *Amphibia-Reptilia* 38, 315-325.

Díaz-Paniagua, C., Gómez-Rodríguez, C., Portheault, A., de Vries, W., 2005. Los anfibios de Doñana. Naturaleza y parques nacionales. Serie técnica. Organismo Autónomo Parques Nacionales, Madrid. 181 pp.

Docampo, L., Milagrosa-Vega, M., 1991. Determinación de la edad en *Rana perezi* Seoane, 1885. Aplicación al crecimiento somático de poblaciones. Doñana, *Acta Vertebrata* 18, 21-38.

Esteban, M., García-París, M., Castanet, J., 1996. Use of bone histology in estimating the age of frogs (*Rana perezi*) from a warm temperate climate area. *Canadian Journal of Zoology* 74, 1914-1921.

Fernández de Larrea, I., Sánchez-Montes, G., Gutiérrez-Rodríguez, J., Martínez-Solano, I., 2021. Reconciling direct and indirect estimates of functional connectivity in a Mediterranean pond-breeding amphibian. *Conservation Genetics* 22, 455-463.

Ferreira, M., Beja, P., 2013. Mediterranean amphibians and the loss of temporary ponds: Are there alternative breeding habitats? *Biological Conservation* 165, 179-186.

Francillon-Vieillot, H., Arntzen, J.W., Geraudie, J., 1990. Age, growth and longevity of sympatric *Triturus cristatus*, *T. marmoratus* and their hybrids (Amphibia, Urodela). A skeletochronological comparison. *Journal of Herpetology* 24, 13-22.

Friedl, T.W.P., Klump, G.M., 1997. Some aspects of population biology in the European treefrog, *Hyla arborea*. *Herpetologica* 53, 321-330.

Garin-Barrio, I., San Sebastián, O., Océn-Ratón, M., Rubio, X., 2007. Estado de conservación de las poblaciones de sapo corredor (*Bufo calamita*) de la costa vasca. *Munibe* 26, 292-301.

Green, D.M., Lannoo, M.J., Lesbarrères, D., Muths, E., 2020. Amphibian population declines: 30 years of progress in confronting a complex problem. *Herpetologica* 76, 97-100.

Guarino, F.M., Lunardi, S., Carlomagno, M., Mazzotti, S., 2003. A skeletochronological study of growth, longevity, and age at sexual maturity in a population of *Rana latastei* (Amphibia, Anura). *Journal of Biosciences* 28, 775-782.

Gutiérrez-Rodríguez, J., Martínez-Solano, I., 2013. Isolation and characterization of sixteen polymorphic microsatellite loci in the Western Spadefoot, *Pelobates cultripes* (Anura: Pelobatidae) via 454 pyrosequencing. *Conservation Genetics Resources* 5, 981-984.

Gutiérrez-Rodríguez, J., González, E.G., Martínez-Solano, I., 2014. Development and characterization of twelve new polymorphic microsatellite loci in the Iberian Ribbed newt, *Pleurodeles waltl* (Caudata: Salamandridae), with data on cross-amplification in *P. nebulosus*. *Amphibia-Reptilia* 35, 129-134.

Gutiérrez-Rodríguez, J., Sánchez-Montes, G., Martínez-Solano, I., 2017. Effective to census population size ratios in two Near Threatened Mediterranean amphibians: *Pleurodeles waltl* and *Pelobates cultripes*. *Conservation Genetics* 18, 1201-1211.

- Joly, P., 2019. Behavior in a changing landscape: Using movement ecology to inform the conservation of pond-breeding amphibians. *Frontiers in Ecology and Evolution* 7, 155.
- Márquez, R., Esteban, M., Castanet, J., 1997. Sexual size dimorphism and age in the midwife toads *Alytes obstetricans* and *A. cisternasii*. *Journal of Herpetology* 31, 52-59.
- McCartney-Melstad, E., Shaffer, H.B., 2015. Amphibian molecular ecology and how it has informed conservation. *Molecular Ecology* 24, 5084-5109.
- Morrison, C., Hero, J.-M., 2003. Geographic variation in life-history characteristics of amphibians: a review. *Journal of Animal Ecology* 72, 270-279.
- Mota-Ferreira, M., Beja, P., 2020. Combining geostatistical and biotic interaction modelling to predict amphibian refuges under crayfish invasion across dendritic stream networks. *Diversity and Distributions* 26, 699-714.
- Oromi, N., Sanuy, D., Sinsch, U., 2012. Altitudinal variation of demographic life-history traits does not mimic latitudinal variation in natterjack toads (*Bufo calamita*). *Zoology* 115, 30-37.
- Pabijan, M., Palomar, G., Antunes, B., Antol, W., Zieliński, P., Babik, W., 2020. Evolutionary principles guiding amphibian conservation. *Evolutionary Applications* 13, 857-878.
- Patón, D., Juarranz, A., Sequeros, E., Pérez-Campo, R., López-Torres, M., Barja de Quiroga, G., 1991. Seasonal age and sex structure of *Rana perezi* assessed by skeletochronology. *Journal of Herpetology* 25, 389-394.
- Pellet, J., Helfer, V., Yannic, G., 2007. Estimating population size in the European tree frog (*Hyla arborea*) using individual recognition and chorus counts. *Amphibia-Reptilia* 28, 287-294.
- Pleguezuelos, J.M., Márquez, R., Lizana, M., (Eds.), 2002. Atlas y libro rojo de los anfibios y reptiles de España. Dirección General de la Conservación de la Naturaleza-Asociación Herpetológica Española.
- Price, S.J., Garner, T.W.J., Nichols, R.A., Balloux, F., Ayres, C., Cabello de Alba, A.M., Bosch, J., 2014. Collapse of amphibian communities due to an introduced *Ranavirus*. *Current Biology* 24, 2586-2591.
- Salvador, A., Martínez Solano, I., (Eds.), 2021. Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Anfibios. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>
- Sánchez-Montes, G., Martínez-Solano, I., 2011. Population size, habitat use and movement patterns during the breeding season in a population of Perez's frog (*Pelophylax perezi*) in central Spain. *Basic and Applied Herpetology* 25, 81-96.
- Sánchez-Montes, G., Recuero, E., Gutiérrez-Rodríguez, J., Gomez-Mestre, I., Martínez-Solano, I., 2016. Species assignment in the *Pelophylax ridibundus* x *P. perezi* hybridogenetic complex based on 16 newly characterized microsatellite markers. *Herpetological Journal* 26, 99-108.
- Sánchez-Montes, G., Wang, J., Ariño, A.H., Vizmanos, J.L., Martínez-Solano, I., 2017a. Reliable effective number of breeders/adult census size ratios in seasonal-breeding species: opportunity for integrative demographic inferences based on capture-mark-recapture data and multilocus genotypes. *Ecology and Evolution* 7, 10301-10314.
- Sánchez-Montes, G., Ariño, A.H., Vizmanos, J.L., Wang, J., Martínez-Solano, I., 2017b. Effects of sample size and full sibs on genetic diversity characterization: a case study of three sympatric Iberian pond-breeding amphibians. *Journal of Heredity* 108, 535-543.
- Sánchez-Montes, G., Wang, J., Ariño, A.H., Martínez-Solano, I., 2018. Mountains as barriers to gene flow in amphibians: quantifying the differential effect of a major mountain ridge on the genetic structure of four sympatric amphibian species with different life history traits. *Journal of Biogeography* 45, 318-331.
- Sinsch, U., 1992. Structure and dynamic of a natterjack toad metapopulation (*Bufo calamita*). *Oecologia* 90, 489-499.
- Sinsch, U., 2015. Review: skeletochronological assessment of demographic life-history traits in amphibians. *Herpetological Journal* 25, 5-13.
- Sinsch, U., Seidel, G., 1995. Dynamics of local and temporal breeding assemblages in a *Bufo calamita* metapopulation. *Australian Journal of Ecology* 20, 351-361.
- Talavera, R.R., 1990. Evolución de Pelobátidos y Pelodítidos (Amphibia, Anura): morfología y desarrollo del sistema esquelético. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid. 282 pp.
- Thumsová, B., González-Miras, E., Faulkner, S.C., Bosch, J., 2021. Rapid spread of a virulent amphibian pathogen in nature. *Biological Invasions* 23, 3151-3160.
- Trochet, A., Moulherat, S., Calvez, O., Stevens, V., Clobert, J., Schmeller, D., 2014. A database of life-history traits of European amphibians. *Biodiversity Data Journal* 2, e4123.
- Wang, J., Santiago, E., Caballero, A., 2016. Prediction and estimation of effective population size. *Heredity* 117, 193-206.
- Waples, R.S., Antao, T., 2014. Intermittent breeding and constraints on litter size: consequences for effective population size per generation (N_e) and per reproductive cycle (N_b). *Evolution* 68, 1722-1734.
- White, G.C., Burnham, K.P., 1999. Program MARK: survival estimation from populations of marked animals. *Bird Study* 46, S120-S139.