Munibe Monographs. Nature Series, 5

III JORNADAS PARA LA CONSERVACIÓN DE ANFIBIOS: SEGUIMIENTO DE POBLACIONES AMENAZADAS

Anfibioen Kontserbaziorako III. Jardunaldiak: populazio mehatxatuen jarraipena

III Conference for the conservation of amphibians: monitoring of threatened populations

Ion Garin-Barrio, Xabier Rubio, Carlos Cabido, Iñigo Rubio-López e Iñaki Romero-Iraola
Editores

aranzadi
ZIENTZIA ELKARTEA · SOCIEDAD DE CIENCIAS
SCIENCE SOCIETY · SOCIÉTÉ DE SCIENCES

Aurkezpena - Presentación.
Ion Garin-Barrio, Xabier Rubio, Carlos Cabido, Iñigo Rubio-López e Iñaki Romero-Iraola
Editoreak / Editores

El programa SARE anfibios: fortalezas y debilidades
Enrique Ayllón

Vigilancia epidemiológica y seguimiento poblacional de los anfibios ibéricos
Jaime Bosch, Albert Martínez-Silvestre, Barbora Thumsová

Monitorización de las comunidades de anfibios mediante *metabarcoding* de ADN ambiental
Amaia Caro, Ibai Ugarte-Zabaleta, Julen Vázquez-Sanz, Aitor Albaina, María José Madeira, Benjamín Juan Gómez-Moliner

Seguimiento de anfibios en Navarra mediante censos poblacionales
Alberto Gosá

Seguimiento de las poblaciones de tritones torrentícolas *Calotriton asper* y *Calotriton arnoldi.* Marco conceptual y casos prácticos
Albert Montori

Seguimiento de poblaciones de anfibios mediante la integración de historiales de captura y herramientas moleculares
Gregorio Sánchez-Montes, Íñigo Martínez-Solano

Ondorioak / Conclusiones

Munibe Monographs. Nature Series, 5

aranzadi

ZIENTZIA ELKARTEA · SOCIEDAD DE CIENCIAS
SCIENCE SOCIETY · SOCIÉTÉ DE SCIENCES

Edited by:
Sociedad de Ciencias Aranzadi
Aranzadi Zientzia Elkartea
Aranzadi Society of Sciences

Chief editor:
Dr. Juan Arizaga – Aranzadi Society of Sciences

Scientific committee:
Cesar Ayres (Asociación Herpetológica Española)
Humberto Rosa (Dirección General de Medio Ambiente. Unión Europea)
Guillermo Velo-Antón (Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos)
Albert Montori (Centre de Recerca i Educació Ambiental de Calafell)
Alberto Gosá (Aranzadi Society of Sciences, Department of Herpetology)

Editoral board:
Ion Garin-Barrio (Aranzadi Society of Science, Department of Herpetology)
Xabier Rubio (Aranzadi Society of Science, Department of Herpetology)
Carlos Cabido (Aranzadi Society of Science, Department of Herpetology
Iñigo Rubio-López (Aranzadi Society of Science, Department of Herpetology)
Iñaki Romero-Iraola (Aranzadi Society of Science, Department of Herpetology)

Redaction and exchange:
Sociedad de Ciencias ARANZADI Zientzia Elkartea
Aranzadi Zientzia Elkartea
Zorroagagaina, 11 • 20014 Donostia / San Sebastián
Tel. (00 34) 943 466142 • Fax (00 34) 943 455811
Redaction: munibecn@aranzadi.eus
Exchange: liburutegia@aranzadi.eus
www.aranzadi.eus

Illustration of the cover: Carlos Cabido
Layout: TamTam diseño, eventos & multimedia S.L.
Printed by: Etxaide Centro Digital S.L.

ISSN 2340-0463 (Munibe Monographs. Nature Series; 5)

III JORNADAS PARA LA CONSERVACIÓN DE ANFIBIOS: SEGUIMIENTO DE POBLACIONES AMENAZADAS

Anfibioen Kontserbaziorako III. Jardunaldiak: populazio mehatxatuen jarraipena

III Conference for the conservation of amphibians: monitoring of threatened populations

2023

Editores:
Ion Garin-Barrio, Xabier Rubio, Carlos Cabido, Iñigo Rubio-López e Iñaki Romero-Iraola

For bibliographic purposes, this book should be cited as follows:
Ion Garin-Barrio, Xabier Rubio, Carlos Cabido, Iñigo Rubio-López e Iñaki Romero-Iraola (Eds.), 2023. III Jornadas para la conservación de anfibios: seguimiento de poblaciones amenazadas. Munibe Monographs. Nature Series 5. Aranzadi Zientzia Elkartea-Sociedad de Ciencias Aranzadi. Donostia-San Sebastián.

ISBN 978-84-17713-93-5
D.L. D 01054-2023
ISSN 2340-0463 (Munibe Monographs. Nature Series; 5)

AURKEZPENA

Esan liteke, anfibioek biologiaren kontserbaziorako mugarri izan diren zenbait ezaugarri gordetzen dituztela. Duela hamarkada batzuetatik lehentasunezko arreta jaso dute bizidun hauek, izan ere, mundu mailan jasaten ari diren gain-beheraren ondorioz, ehundaka espezie eta populazio modu atzeraezinean galtzen ari dira.

Bere jarduera eremuaren baitan, Aranzadi Zientzia Elkarteko Herpetologia sailak 2002. urtean ekindako bidean, aditu eta gizarte-dibulgazioko kideak gonbidatu zituen anfibioen kontserbaziorako lehen jardunaldiak antolatuz. Lehen hitzordua Europako esparrura mugatu zen, nazioarteko ikertzaileen zerrenda nabaria erakarri zealrik. Bide beretik, 2010. urtean gauzatutako bigarren jardunaldiak ere Europako adituak bildu zituen. Kasu honetan espezie bakar baten kontserbazioan zentratu zen jarduna, apo lasterkarian (Epidalea calamita) hain zuzen, zeinaren hedapena EAE-ko kostaldeko populazio isolatu eta larriki mehatsatuetara mugatzen den.

Hamarkada bat beranduago, hirugarren jardunaldiak gauzatzeko beharra sortu zen. Honetan, bat-bateko osasun larrialdi batek bultzatuta (koronabirusaren pandemia egoera), aditu taldearen jatorria Iberiar Penintsulara mugatu zen. Zehazki, Madril, Katalunia, Euskal Herria eta Gaztela Mantxako aditual bildu ziren Donostian 2020ko urrian, Iberiar Penintsulako anfibioen inguruko ikerketa lanen laburpen bati bide emanez eta populazio mehatxatuen epe luzerako jarraipen prometan ikerketa emtodologia gisa baliatzen diren teknikak aztertuz. Hamaika hitzaldi eta bi mahai inguru aurkeztu ziren, non jarraipen prometan bilduriko emaitzak eta tekniken inguruko eztabaidak azaleratu baitziren, hala nola, populazio zenbaketen emaitzak, erantzun immunea eta azterketa genetikoa, izan populazioetan zein ingurune urtarretan, gaixotasun emergenteak ikertuz, plagiziden inpaktua edota animalia hauen kontserbazioan sare sozialen garrantzia. Sei hitzaldietako edukiak zabaldu eta artikulu zientifikoen bidez igorri dira, Munibe Monographs Nature Series argitalpenaren bostgarren alea osatuz eta autonomia erkidego desberdinetan gauzatzen ari diren ekintzen laburpen zorrotz eta eguneratu bat aditzera emanaz. Argitalpen monografikoaren jatorria izan ziren Jardunaldiak, Gipuzkoako Foru Aldundiaren dirulaguntzaren ondorioz gauzatu ahal izan ziren; aldiz inprimatze funtsak lortzeko, Aranzadi Zientzia Elkarteak, Eusko Jaurlaritzaren Agenda 2030 bonoak baliatu ditu, izan ere tirada mugatu bat argitaratzeko aukera eman digute eta.

ARGITARATZAILEAK

Ion Garin-Barrio, Xabier Rubio, Carlos Cabido, Iñigo Rubio-López eta Iñaki Romero-Iraola

PRESENTACIÓN

Puede decirse que los anfibios guardan en cierto modo uno de los hitos pioneros en la biología de la conservación, porque desde hace bastantes décadas vienen siendo objeto de una atención preferente que ha declarado su declive a escala mundial, traducido en la constatada pérdida irreversible de cientos de especies e innumerables poblaciones.

Dentro de su ámbito de actuación, el Departamento de Herpetología de la Sociedad de Ciencias Aranzadi inició en 2002 un proceso de acercamiento entre especialistas y de divulgación social que se tradujo en la celebración de unas primeras jornadas de conservación de anfibios, enfocadas al ámbito europeo, que atrajo a un notable elenco de investigadores internacionales. Las segundas jornadas, celebradas en 2010, convocaron igualmente a especialistas europeos, ésta vez centradas en la conservación de una especie —el sapo corredor— escasamente representada en la Comunidad Autónoma Vasca y fuertemente amenazada en sus poblaciones aisladas de la costa vasca.

Una década después se suscitó la necesidad de desarrollar unas terceras jornadas, que por coincidir con un momento especialmente grave desde la perspectiva sanitaria (la pandemia de coronavirus), quedó restringida al ámbito nacional. En un momento tan difícil, un grupo de especialistas ibéricos, procedentes de Madrid, Cataluña, País Vasco, Navarra y Castilla-La Mancha, se dieron cita en octubre de 2020, una vez más en Donostia-San Sebastián, para presentar un resumen de sus trabajos en la conservación de los anfibios ibéricos, bajo la perspectiva común de las metodologías que se están empleando para el seguimiento a largo plazo de sus poblaciones amenazadas. Se presentaron once ponencias, y se celebraron dos mesas redondas, en las que se expusieron las técnicas y resultados que se están obteniendo en el ámbito del seguimiento mediante censos poblacionales, respuesta inmune y análisis genéticos, tanto de poblaciones como en el medio acuático, investigación de enfermedades emergentes, impacto de plaguicidas y papel de las redes sociales en la conservación de la fauna. Seis de las ponencias, ampliadas y trasladadas a artículos científicos, constituyen este quinto número del ***Munibe Monographs. Nature Series*** que presentamos, en el que queda resumido un panorama riguroso y actualizado de las actividades que se están produciendo en este ámbito en diversas Comunidades Autónomas. Las Jornadas que fueron el germen del volumen monográfico que presentamos se realizó gracias a las ayudas de la Diputación Foral de Gipuzkoa; de cara a la impresión del mismo, la Sociedad de Ciencias Aranzadi ha contado con las ayudas de bonos Agenda 2030 del Gobierno Vasco, que han permitido publicar una tirada reducida de ejemplares.

LOS EDITORES

Ion Garin-Barrio, Xabier Rubio, Carlos Cabido, Iñigo Rubio-López e Iñaki Romero-Iraola

Aurkibidea - Índice - Index

El programa SARE anfibios: fortalezas y debilidades 11-15
Enrique Ayllón

Vigilancia epidemiológica y seguimiento poblacional de los anfibios ibéricos 17-30
Jaime Bosch, Albert Martínez-Silvestre, Barbora Thumsová

Monitorización de las comunidades de anfibios mediante *metabarcoding* de ADN ambiental 31-47
Amaia Caro, Ibai Ugarte-Zabaleta, Julen Vázquez-Sanz, Aitor Albaina, María José Madeira, Benjamín Juan Gómez-Moliner

Seguimiento de anfibios en Navarra mediante censos poblacionales 49-59
Alberto Gosá

Seguimiento de las poblaciones de tritones torrentícolas *Calotriton asper* y *Calotriton arnoldi.* Marco conceptual y casos prácticos 61-82
Albert Montori

Seguimiento de poblaciones de anfibios mediante la integración de historiales de captura y herramientas moleculares 83-93
Gregorio Sánchez-Montes, Íñigo Martínez-Solano

Ondorioak / Conclusiones 95-98

Munibe Monographs. Nature Series • 5 (2023) • 11-15 • Donostia-San Sebastián • ISSN 2340-0463 - eISSN 2340-3055

El programa SARE anfibios: fortalezas y debilidades

The SARE Amphibian Programme: Strengths and Weaknesses

Enrique Ayllón[1]
[1] Asociación Herpetológica Española. José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid.
Correspondencia: enrique.ayllon@herpetologica.org

RESUMEN

En este trabajo se repasa la evolución del programa de Seguimiento de anfibios y reptiles de España (SARE) en el grupo de los anfibios, y se expone las posibles fortalezas y debilidades asociadas a la utilización de una metodología enfocada a la ciencia ciudadana, y más en detalle la ejecución de los muestreos, su calidad y la de los datos obtenidos con ellos.

PALABRAS CLAVE: Anfibios, seguimiento, tendencias poblacionales, programa de seguimiento.

ABSTRACT

This paper reviews the evolution of the Spanish Amphibian and Reptile Monitoring Program (SARE) in the amphibian group, and exposes the posible strengths and weaknesses associated with the use of a methodology focused on citizen science, detailing the execution of the samples, their quality and that of the data obtained with them.

KEY WORDS: Amphibians, monitoring, population trends, monitoring program.

LABURPENA

Lan honetan, Espainiako Anfibioen eta Narrastien Jarraipen programak (SARE) anfibioengan izan duen bilakaera berrikusten da. Horrez gain, herritarren zientziara bideratutako metodologiaren indarguneak zein ahultasunak azpimarratzen dira, eta, modu zehatzago batean, laginketak, horien kalitatea eta haiekin lortutako datuak aztertzen dira.

GAKO-HITZAK: Anfibioak, jarraipena, populazioen joerak, jarraipen programa.

GESTACIÓN DEL SARE

A principios del siglo XXI el mayor problema para detectar el declive de especies y poblaciones de anfibios y reptiles en el territorio español era el de no poseer series históricas de datos en las que se pudieran detectar los cambios en su distribución y/o abundancia. Mientras que en diversos países europeos y en América del Norte existían registros históricos (Houlahan *et al.*, 2000), a veces de más de un siglo, en España no contábamos más que con observaciones relativamente recientes y de carácter puntual, repartidas por toda la geografía. Ante la falta de este tipo de datos y como continuación al trabajo de inventariado, distribución y análisis de la herpetofauna española realizada con la edición del Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España (Pleguezuelos *et al.*, 2002), surgió la necesidad de diseñar varios protocolos y un programa de trabajo para disponer, a largo plazo, de series temporales que mostraran las tendencias de nuestra herpetofauna. En el año 2006, con el impulso de la Dirección General de Biodiversidad del entonces Ministerio de Medio Ambiente del Gobierno de España, se ejecutó el Proyecto "Diseño y aplicación del sistema de seguimiento de la biodiversidad española". En este marco, la Asociación Herpetológica Española (AHE) diseñó los protocolos de seguimiento básicos para la creación del programa SARE (Seguimiento de los Anfibios y Reptiles Españoles), que nació en el año 2008 con la vocación de contar con series temporales que permitieran detectar las tendencias a largo plazo de los herpetos en España (Ayllón y Gómez-Calmaestra, 2015).

Ante el gran reto de intentar cubrir la totalidad del territorio nacional con sus especies presentes, la AHE decidió desarrollar un proyecto con la misma filosofía que otros existentes en España para grupos faunísticos, basados en ciencia ciudadana. Nuestros principales modelos a seguir fueron los programas de seguimiento para aves, desarrollados por la Sociedad Española de Ornitología (http://www.seguimientodeaves.org/), y la red de seguimiento de mariposas diurnas "Butterfly Monitoring Scheme" (BMS) en Cataluña (http://www.catalanbms.org/). Pero las mariposas y las aves son grupos faunísticos que mueven gran cantidad de aficionados y su atractivo popular facilita el desarrollo de este tipo de proyectos. Por ello se planteó desde el inicio si éstos pueden funcionar con animales menos populares, como los anfibios y reptiles. Desde el programa SARE prestamos atención a programas de seguimiento a largo plazo de anfibios y reptiles con voluntariado, que se

https://doi.org/10.21630/mmns.2023.5.01

(cc) BY-NC-ND

llevan realizando con éxito en Europa desde hace tiempo, como el desarrollado por la RAVON Foundation en Holanda (denominado "Monitoring Network of Reptile, Amphibian & Fish Conservation"), o el desarrollado por "Amphibian and Reptiles Conservation" (ARC) en colaboración con "Amphibian and Reptile Groups of de UK-Volunteers working for the conservation of amphibians and reptiles" (ARG UK) en el Reino Unido, y denominado "The National Amphibian and Reptile Recording Scheme" (NARRS). Estas experiencias, tanto los programas de seguimiento en España de otros grupos faunísticos con voluntarios como otros similares en países europeos, nos hicieron pensar que un proyecto de esta envergadura se podía afrontar con éxito. El apoyo económico ofrecido entre 2008 y 2010 por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente del Gobierno de España también fue crucial para facilitar la puesta en marcha del programa.

METODOLOGÍA

Las diferencias ecológicas y de detección entre anfibios y reptiles obligaron al diseño de dos metodologías de muestreo claramente diferenciadas en el programa SARE. Para anfibios, en cada cuadrícula elegida por el voluntario se muestreó, al menos, un punto de observación (masas de agua en sentido amplio; Fig. 1) por cada hábitat diferente existente en la cuadrícula, siendo tres el número mínimo de puntos seleccionados. Se realizaron, al menos, dos muestreos al año dentro del período reproductor de la mayoría de las especies presentes en la cuadrícula. Los distintos puntos de muestreo se podían conectar mediante transectos, a pie o en coche, si pudieran ser además propicios para la observación de anfibios (Bosch y Carabias, 2014). Para ampliar la información sobre los protocolos de censo (Fig. 2) y el proyecto en general se puede consultar: https://herpetologica.es/category/programas/programa-sare/ (AHE, 2009). Igualmente, en este enlace se encuentran los protocolos y metodologías correspondientes a los reptiles.

Desde el propio proyecto, también fuimos conscientes de que el seguimiento de especies, tanto de anfibios como de reptiles, con rango de distribución reducido o con presencia en hábitats o ambientes reproductores más exclusivos o hasta únicos para ellas, sería infravalorado en los resultados, por lo que planteamos realizar censos monográficos complementarios, para valorar la situación actual de cada especie objeto de estudio y diseñar los correspondientes planes de seguimiento.

En este sentido, se elaboró una primera monografía sobre la lagartija de Valverde (*Algyroides marchi* Valverde, 1958; Carretero *et al*., 2010) y una segunda sobre el sapo partero bético (*Alytes dickhilleni* Arntzen & García-París, 1995; Bosch y González-Miras, 2012). El monográfico del sapo partero bético analizó de forma general a la especie (historia natural y amenazas para su conservación), valo-

Fig. 1. - Tipo de estación de muestreo frecuentemente utilizada en el programa SARE. Navaluenga (Ávila).

Fig. 2. - Muestreo avanzado de anfibios en una charca del programa SARE. Picos de Europa (Cantabria).

ró su situación general por provincias y su distribución, y llevó a cabo un análisis espacial, analizando su susceptibilidad a la quitridiomicosis y recopilando las iniciativas seguidas para su conservación, y una actualización de su categoría de conservación (IUCN, 2001). La información recopilada en los muestreos se analizó mediante el programa RAMAS Red List v.2 (2001 Applied Biomathematics), resultando categorizada la especie 'En Peligro' (EN) (EN-VU). En este trabajo se diseñó una metodología específica de muestreo, validándose el método y analizándose sus resultados, lo que facilitó la elección de tres ubicaciones en cada una de las seis provincias con presencia de la especie, para que sirvieran de estaciones de censo en un seguimiento a largo plazo de la misma, que nunca llegó a ejecutarse, principalmente por falta de recursos económicos, aunque el diseño permanece vigente como para ser puesto en marcha. No se desarrollaron más trabajos de esta índole, tanto para anfibios como para reptiles, aun cuando existen especies claramente candidatas a estos seguimientos específicos, tales como *Chioglossa lusitanica* Bocage, 1864, *Rana iberica* Boulenger, 1879, *Calotriton asper* (Dugès, 1852) o *Rana dalmatina* Bonaparte, 1840. Especies también candidatas a estos seguimientos, pero que ya son seguidas de forma exhaustiva por las administraciones públicas, como *Calotriton arnoldi* Carranza & Amat, 2005, *Alytes muletensis* (Sanchiz & Adrover, 1977)

o *Rana pyrenaica* Serra.Cobo, 1993, fueron descartadas porque no tenía sentido duplicar trabajo y esfuerzos.

Para el análisis de tendencias poblacionales se ha utilizado el programa informático TRIM ("Trends and Indices for Monitoring Data"; Statistics Netherlands), a partir de modelos lineales, para sintetizar de manera sencilla la evolución de las especies a lo largo de un período de tiempo relativamente corto. TRIM está específicamente diseñado para solventar los problemas más frecuentes en este tipo de análisis, como son la ausencia de datos cuando los muestreos no se han realizado en algunas estaciones o en algunos años, así como la autocorrelación temporal de las abundancias observadas en cada localidad. La pendiente de la recta modelizada se puede interpretar en términos biológicos como el porcentaje de variación anual (o tasa instantánea de cambio: positivo en el caso de un aumento de efectivos, negativo en caso de declive). TRIM clasifica las tendencias obtenidas en distintas categorías: aumento fuerte (aumento significativo superior al 5% anual, que implica doblar la abundancia en sólo 15 años), aumento moderado (aumento significativo, pero inferior al 5% anual), estable (no hay aumento o descenso significativo y las tasas de cambio son menores del 5% anual), incierta (no hay aumento o descenso significativo, pero sin certeza de que las tasas de cambio sean menores del 5% anual), declive moderado (descenso significativo, pero no superior al 5% anual), y declive acusado (descenso significativo superior al 5% anual) (Bosch y Carabias, 2014).

.

ESTADO ACTUAL DEL ANÁLISIS

El único bloque de años analizados hasta el momento corresponde al período 2008-2013, con un total de 136 voluntarios participantes en los muestreos, habiéndose llegado a contabilizar un total de 208 cuadrículas UTM de 10x10 km con datos de seguimiento. En total se han obtenido datos de 957 estaciones de muestreo.

De las seis especies para las que fue posible estimar tendencias (Fig. 3), sólo una presentó una tendencia positiva (*Pelodytes punctatus* (Daudin, 1802), incremento moderado), tres de ellas (*Epidalea calamita* (Laurenti, 1768), *Bufo spinosus* Daudin, 1803 y *Pleurodeles walt* MIchahelles, 1830) no presentaron un aumento o descenso significativo (tendencia estable), y dos especies presentaron tendencias negativas (*Pelophylax perezi* (López Seoane, 1885) y *Salamandra salamandra* (Linnaeus, 1758)), declive moderado (Bosch y Carabias, 2014).

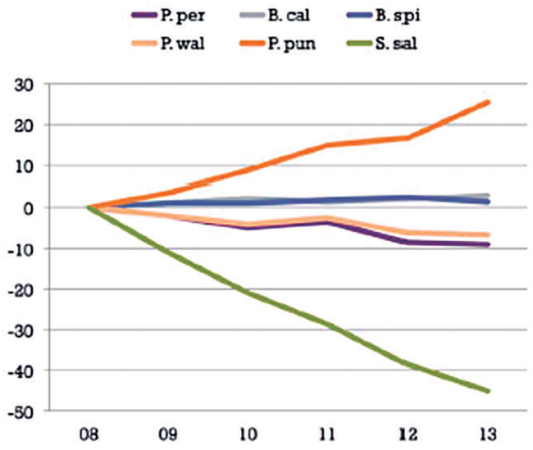

Fig. 3. - Tendencias poblacionales de las seis especies de anfibios con resultados obtenidos a través del Proyecto SARE (Fuente: Bosch y Carabias, 2014).

No se obtuvo resultados de seguimiento (sin ninguna estación de muestreo) para *Chioglossa lusitanica, Calotriton asper, Rana dalmatina* y *Bufotes balearicus* (Boettger, 1870), además de las tres especies antes mencionadas con seguimiento institucional (*Calotriton arnoldi, Alytes muletensis* y *Rana pyrenaica*), lo que deja clara constancia de que son necesarios los seguimientos específicos para ciertas especies de distribución restringida o hábitats singulares, así como para especies insulares, tal como demuestra la inexistencia de datos para el sapo balear.

Después de 2014 se siguió con el proyecto SARE, pero sin ningún tipo de soporte económico, lo que ha supuesto una merma considerable en los datos aportados por los colaboradores. Precisamente por esas fechas (2013) el Gobierno de Navarra introdujo el programa SARE en su territorio, siendo la guardería medioambiental la encargada de realizar los muestreos, que siguen realizándose hasta la actualidad (Gosá, 2020).

VALORACIÓN DEL PROGRAMA SARE

La puesta en marcha de un programa de seguimiento de anfibios en el País Vasco, por invitación a la AHE de la Sociedad de Ciencias Aranzadi, nos ha hecho recapacitar sobre las fortalezas y debilidades del proyecto SARE en los muestreos y su ejecución, así como en la toma de datos y su análisis después de doce años de funcionamiento, para que sirva de experiencia en el diseño del programa a desarrollar en ese territorio. Por esta razón se valora a continuación los que se pueden considerar como puntos fuertes y débiles del proyecto, lo que nos podría facilitar la mejora de los resultados futuros a obtener, contribuyendo a la reflexión sobre proyectos semejantes que se estén iniciando actualmente.

Fortalezas

- Muestreos: La elección de dos tipos de muestreos, uno básico y otro avanzado, ha permitido una mayor participación y adaptar los muestreos a la formación y experiencia de los voluntarios, así como mantener condiciones biosanitarias favorables en cada caso.

  El muestreo básico es de sencilla ejecución y poco exigente en tiempo y en conocimientos. La no manipulación de ejemplares permite disminuir al mínimo el potencial efecto de las enfermedades emergentes. Es el adecuado para ser aplicado como ciencia ciudadana, porque la manipulación de material biológico requiere disponer de los pertinentes permisos, siendo en este caso el objetivo la realización de censos visuales de anfibios en estado adulto.

Por el contrario, el muestreo avanzado es más complejo y el manejo se realiza por personal con formación, para evitar la aparición de enfermedades emergentes. Los datos son más exactos y de mayor calidad, pero el tiempo de dedicación es más elevado y normalmente el objetivo del censo es el estado larvario, que requiere la captura y, habitualmente, la manipulación de los ejemplares.

- Ejecución de los muestreos: En este punto valoramos el grado de cobertura que podemos alcanzar, al nivel de número de estaciones de muestreo.

  Con los voluntarios de ciencia ciudadana y muestreo básico se alcanza gran cobertura de puntos de seguimiento y el coste económico es muy bajo. Los datos son más groseros pero su volumen es mayor. Cuando faltan recursos económicos, es el mejor sistema para mantener los muestreos en el tiempo, siempre que haya un coordinador del proyecto atento a los voluntarios y capaz de generar un *feedback* con ellos.

  Con los "profesionales" la cobertura alcanzada es menor, pero se aumenta la calidad de los datos. Con el personal funcionario (técnicos y agentes forestales) se pierde algo de calidad en los datos, pero se asegura cierta cobertura y una continuidad de los seguimientos a largo plazo, con independencia de los recursos económicos obtenidos.

- Datos: Este sistema de ciencia ciudadana permite la obtención de gran volumen de datos, gran cobertura de hábitats diferentes y de un amplio espectro de especies. Por ser datos groseros o de menor calidad el análisis es más sencillo, pero, al perseguirse el conocimiento de la tendencia poblacional de las poblaciones, puede resultar muy beneficioso ya que el análisis no requiere un gran conocimiento estadístico.

Debilidades

- Muestreos: El muestreo básico es nocturno, y en voluntarios o naturalistas poco avezados en el mundo de los anfibios suele generar rechazo, ya que las condiciones meteorológicas en que se realiza pueden ser algo desagradables (noches de lluvia o de llovizna). El muestreo avanzado es más metódico y exige mayor tiempo de dedicación. Esto es una debilidad, ya que exige al profesional o funcionario un mayor tiempo de ejecución y, por ende, una mayor carga de trabajo.

- Ejecución de los muestreos: En relación con la ciencia ciudadana, en los voluntarios existe normalmente poco compromiso, porque se trata de seguimientos a largo plazo en el tiempo, que requieren continuidad, de manera que se producen frecuentes abandonos, que exigen la creación de mecanismos de motivación para la generación de esfuerzos a medio y largo plazo.

  En relación con los profesionales, los censos suponen a las administraciones un alto coste económico y baja cobertura. Normalmente, los anfibios y reptiles están en la parte más baja de la lista de prioridades para los gestores, y ante la escasez de recursos económicos están entre los primeros que se caen de sus proyectos.

  En cuanto al personal funcionario (técnicos y agentes forestales), básicamente no presenta debilidades, más allá de la predisposición a la realización del trabajo por parte de éstos, la necesidad de formación en muchos casos y la sobrecarga de trabajo que puede generar este tipo de tareas en ciertas épocas del año. También es un factor negativo que, en la mayoría de los casos, los agentes forestales tengan que realizar el muestreo básico, debido a que no trabajan de noche. Sin embargo, no ha sido éste el caso del SARE realizado por la guardería medioambiental de Navarra, que ha podido realizar los censos en horas nocturnas.

- Datos: Los datos del muestreo básico son más groseros, con poco detalle, lo que genera una información más limitada. Los del muestreo avanzado son muy interesantes, pero la cobertura suele ser baja y están principalmente dirigidos a especies de distribución restringida, para las que muchas veces se necesita información más detallada, capaz de detectar los posibles cambios.

BIBLIOGRAFÍA

Asociación Herpetológica Española (AHE), 2009. Metodología del sistema de seguimiento de anfibios. Versión 2 (abril 2009). 10pp. https://herpetologica.es/wp-content/uploads/2013/09/manual_sare_anfibios.pdf

Ayllón, E., Gómez-Calmaestra, R., 2014. Introducción al programa para el seguimiento a largo plazo de las poblaciones de anfibios y reptiles en el territorio español (Programa SARE). Bol. Asoc. Herpetol. Esp. 25(2), 3-11.

Bosch, J., Carabias, J., 2014. Primeros resultados del programa SARE en anfibios. Bol. Asoc. Herpetol. Esp. 25(2), 11-19.

Bosch, J., González-Miras, E., 2012. Seguimiento de *Alytes dickhilleni*. Informe final. Monografías SARE. Asociación Herpetológica Española – Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid, 88 pp.

Carretero, M.A., Ceacero, F., García-Muñoz, E., Sillero, N., Olmedo, M.I., Hernández-Sastre, P., Rubio, J.L., 2010. Seguimiento de *Algyroides marchi*. Informe final. Monografías SARE. Asociación Herpetológica Española – Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Madrid, 51 pp.

Gosá, A., 2020. Seguimiento de anfibios y reptiles para los programas SARE anfibios y SARE reptiles. Navarra, 2019. Gobierno de Navarra. Pamplona. Informe inédito, 62 pp.

Houlahan, J.E., Findlay, C.S., Schmidt, B.R., Meyer, A.H., Kuzmin, S.L., 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. Nature 404, 752-758.

IUCN, 2001. Categorías y Criterios de la Lista Roja de la UICN: Versión 3.1. Segunda edición. Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido: UICN. vi + 34pp. https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/RL-2001-001-2nd-Es.pdf

Pleguezuelos, J.M., Márquez, R., Lizana, M. (eds.), 2002. Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza - Asociación Herpetológica Española. Madrid.

Munibe Monographs. Nature Series • 5 (2023) • 17-30 • Donostia-San Sebastián • ISSN 2340-0463 - eISSN 2340-3055

Vigilancia epidemiológica y seguimiento poblacional de los anfibios ibéricos

Epidemiological surveillance and monitoring of Iberian amphibian populations

Jaime Bosch[1,2], Albert Martínez-Silvestre[3], Barbora Thumsová[4,5]

[1] IMIB Research Unit of Biodiversity (CSIC, UO, PA), Universidad de Oviedo. 33600 Mieres. España. Correspondencia: jaime.bosch@csic.es

[2] Centro de Investigación, Seguimiento y Evaluación, Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama, Cta. M-604, Km 27,6. Rascafría, España.

[3] Centro de Recuperación de Anfibios y Reptiles de Cataluña (CRARC). 08783 Masquefa, Barcelona. España.

[4] Asociación Herpetológica Española. José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid. España.

[5] Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC. José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid. España.

RESUMEN

Los anfibios son los vertebrados más amenazados. Las enfermedades emergentes de los anfibios, como la quitridiomicosis y ranavirosis, constituyen una de sus amenazas más relevantes, causando mortalidades masivas, declives poblacionales y extinciones. Dada la preocupación internacional por la crisis de los anfibios, en las últimas décadas han surgido muchas iniciativas para el seguimiento de poblaciones. Desgraciadamente, muchas de estas iniciativas no resultan eficaces para determinar la emergencia de estas enfermedades ni para evaluar su impacto real en las poblaciones, dado que: no se centran en las especies, los estadios de desarrollo y las épocas del año adecuadas, y no incluyen la toma de datos de infección de manera regular. En el caso de las poblaciones con incidencia de patógenos conocida la situación no es mejor, dado que raramente se llevan a cabo programas de seguimiento a largo plazo una vez que los brotes de mortalidad han cesado. Por lo tanto, mientras que cada vez son más frecuentes los casos publicados de mortalidades masivas de anfibios asociados a las enfermedades emergentes, existe un vacío de conocimiento significativo sobre la incidencia real de estas enfermedades y de sus efectos a medio y largo plazo.

PALABRAS CLAVE: Enfermedades emergentes, quitridiomicosis, *Batrachochytrium dendrobatidis,* ranavirosis, *Ranavirus*, ADN ambiental, monitoreo de anfibios, estrategias de conservación.

ABSTRACT

Amphibians are the most threatened vertebrate group. The emerging diseases such as chytridiomycosis and ranavirosis are important amphibian threats, being responsible for mass mortality events, population declines and extinctions. Given the global scale of the amphibian crisis, numerous monitoring efforts have emerged in recent decades. Unfortunately, many of them are not effective in determining the emergence of diseases, nor in assessing their real impact on populations. This is partly because these efforts are not species-specific nor focused on appropriate developmental stage and/or time of year, but also due to the lack of a routine collection of infection data. In populations with known incidence of pathogens the situation is no better because long-term monitoring programs are rarely carried out once disease outbreaks have ceased. Therefore, while there is an increase in the report of disease-associated mass mortality events, we still face a significant lack of knowledge about the real incidence and impacts of these diseases in the medium and long term.

KEY WORDS: Emerging diseases, chytridiomycosis, *Batrachochytrium dendrobatidis*, ranavirosis, *Ranavirus*, environmental DNA, amphibian monitoring, conservation strategies.

LABURPENA

Anfibioak dira ornodun talde mehatxatuena. Anfibioen gaixotasun kutsakor emergenteak, hala nola kitridiomikosia eta ranabirosia, mehatxu garrantzitsuenetako bat dira, eta hilkortasun masiboak, populazioaren gainbehera eta iraungipenak eragiten dituzte. Anfibioen krisiaren inguruko nazioarteko kezka dela eta, azken hamarkadetan ekimen asko burutu dira populazioen jarraipena egiteko. Zoritxarrez, ekimen horietako asko ez dira eraginkorrak ez gaixotasun horien larrialdia zehazteko, ez populazioetan duten benetako eragina balioztatzeko ere. Izan ere, ez dira espezieetan, garapen-faseetan eta urteko garai egokietan oinarritzen, eta ez dute infekzio-daturik erregulartasunez hartzen. Patogenoen intzidentzia duten populazioen kasuan, egoera ez da hobea, hilkortasun-agerraldiak amaitu ondoren epe luzerako jarraipen-programak oso gutxitan egiten baitira. Beraz, gaixotasun kutsakor emergenteekin lotutako anfibioen hilkortasun masiboen kasu argitaratuak gero eta ugariagoak diren bitartean, gaixotasun horien eta haien epe ertain eta luzeko ondorioen benetako eraginari buruzko ezagutza-hutsune esanguratsu bat dago.

GAKO-HITZAK: Gaixotasun emergentea, kitridiomikosia, *Batrachochytrium dendrobatidis,* ranabirosia, *Ranavirus*, ingurumen DNA, anfibioen jarraipena, kontserbazio estrategia.

https://doi.org/10.21630/mmns.2023.5.02

(cc) BY-NC-ND

INTRODUCCIÓN

Las actividades humanas han provocado una crisis sin precedentes en la biodiversidad por la modificación del medio, la explotación de la vida salvaje y la alteración de la composición de los ecosistemas a través de las invasiones biológicas (Ceballos *et al*., 2015). La evidencia de que esta pérdida contemporánea de biodiversidad incluye el declive global de los anfibios se sustenta ya en décadas de investigación (Stuart *et al*., 2004, 2008). La alteración y destrucción del medio, la contaminación y el cambio climático reducen sistemáticamente el hábitat de los anfibios. Además, el comercio legal e ilegal reduce la abundancia y altera la composición de las comunidades (Hughes *et al*., 2021), pudiendo facilitar la introducción de nuevos patógenos que causan mortalidades masivas o impiden el reclutamiento (p.ej. Berger *et al*., 1998; Davidson *et al*., 2002; Finlay y Vredenberg, 2007; McMenamin *et al*., 2008; Johnson *et al*. 2011; Fisher *et al*., 2012; Faruk *et al*., 2013; Martel *et al*., 2014; Price *et al*., 2014).

Es bien sabido que las enfermedades emergentes pueden tener consecuencias importantes en la dinámica de las poblaciones de los hospedadores (Anderson y May, 1979), y muchas veces conducen a las poblaciones a su declive, o incluso a su extinción (Daszak *et al*., 2000). En este contexto, es importante distinguir entre vigilancia, infección y enfermedad. Con el término vigilancia ('surveillance', en inglés) entendemos el estudio de la ocurrencia de un patógeno y de sus efectos en las poblaciones de los hospedadores en la naturaleza. Muchas veces, estos estudios van destinados a determinar si se ha producido su posible emergencia; es decir, si la distribución geográfica de un patógeno se ha expandido, o si el número de especies a las que infecta se ha incrementado drásticamente (Daszak *et al*., 2000). Así, las tareas de vigilancia epidemiológica incluyen la detección en el medio de uno o varios patógenos, pero también la detección de la infección en sus hospedadores e, incluso, la aparición de las enfermedades que producen. Por lo tanto, infección no debe confundirse con enfermedad. Hablamos de enfermedad cuando el patógeno está alterando la fisiología y disminuyendo la posibilidad de la supervivencia del hospedador, mientras que infección es cuando el patógeno se encuentra vivo dentro del hospedador y se replica con frecuencia (Mörner *et al*., 2002). Por otro lado, las tareas de seguimiento de las poblaciones de los hospedadores incluyen la estimación de abundancias de sus efectivos y, a veces, el cálculo de sus tamaños poblacionales, a lo largo del tiempo para determinar así sus tendencias demográficas. Sólo conociendo la relación entre la ocurrencia de un patógeno en el medio y la infección o enfermedad que está produciendo en sus hospedadores podremos además, evaluar el posible efecto del patógeno en las tendencias poblacionales de sus hospedadores.

En el caso de los anfibios, los hongos quitridios del género *Batrachochytrium* y los virus del género *Ranavirus* son patógenos emergentes que están teniendo un impacto muy relevante en la dinámica de centenares de especies de todo el mundo en las últimas décadas (Skerratt *et al*., 2007, Duffus *et al*., 2015). *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) es originario del sureste asiático (O'Hanlon *et al*., 2018), desde donde se habría expandido, a partir de los inicios del siglo pasado, a prácticamente todo el mundo. Se trata de un patógeno muy generalista capaz de infectar, al menos, al 50% de las especies de anfibios estudiadas, y llegando ya a más de 1.000 especies afectadas de 86 países distintos (Castro-Monzón *et al*., 2020). *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*) es la otra especie conocida del género; aunque capaz de infectar tanto anuros como urodelos, resulta altamente patogénica sólo para estos últimos. Hasta el momento, *Bsal* se encuentra sólo introducida en Europa Central y, en mucha menor medida, aunque provocando también mortalidad, en un área natural cercana a Barcelona (Stegen *et al*., 2017, Martel *et al*., 2020, Bosch *et al*., 2021a). De forma similar, las infecciones por *Ranavirus* (*Rv*) se han multiplicado en las últimas décadas en todo el mundo, estando acompañadas de mortalidades masivas y descensos poblacionales acusados (Green *et al*., 2002, Price *et al*., 2017). Sin embargo, al contrario que para *Bd* y *Bsal*, su distribución general permanece aún desconocida y, con seguridad, subestimada (Duffus *et al*., 2015).

Los efectos de ambos grupos de patógenos sobre las poblaciones de anfibios varían enormemente entre localidades y especies. Así, *Bd* es tolerado por un número importante de especies y, en general, las zonas más calientes del globo sufren menor incidencia dada la inhibición que provoca las altas temperaturas sobre su crecimiento y, a la vez, la mayor respuesta del sistema inmunológico de los anfibios a temperaturas más elevadas (Rollins-Smith, 2020). Los requerimientos térmicos de *Bsal* son menores que los de *Bd*, y su grado de patogenicidad es elevada para muchas especies de urodelos, por lo que su previsible futura expansión es altamente preocupante (Martel *et al*., 2013, Van Rooij *et al*., 2015). Por último, la gran mayoría de especies de anfibios son altamente sensibles a *Rv*, y la reciente subida de temperaturas ha sido señalada como una de las causas implicadas en su emergencia (Price *et al*., 2019).

Mientras que existen ya muchos casos descritos de mortalidades masivas asociadas a *Bd, Bsal* y *Rv* (p.ej. Bosch *et al*., 2001, Price *et al*., 2014, Rosa *et al*., 2017, Martel *et al*., 2020), el número de estudios sobre las tendencias a largo plazo de las poblaciones afectadas es, sin embargo, aún muy reducido por razones operativas. De hecho, aunque *Bd* ha sido señalado como el causante del declive de 500 especies de anfibios (Scheele *et al*., 2019), en realidad no existen datos cuantitativos que apoyen estas conclusiones (Lambert *et al*., 2020). Así, dentro de los escasos estudios existentes sobre el declive de anfibios por enfermedades emergentes, algunos describen impactos muy importantes sólo para algunos taxones, otros describen declives demográficos para una única especie dentro de una comunidad, y otros describen una respuesta heterogénea en las distintas poblaciones estudiadas (p.ej. Bosch *et al*., 2001, Lips *et al*., 2006, 2008; Vredenburg *et al*., 2010; Phillips y Puschendorf, 2013). Estas inconsistencias sugieren que los estudios de corta duración no serían válidos para evaluar el impacto real de las enfermedades, y que sus impactos podrían estar subestimados por la existencia de efectos leves, inadvertidos o indirectos, cuya repercusión

se extendería más allá de los eventos de mortalidad inicial (p.ej. Clare *et al*., 2016; Scheele *et al*., 2017). Alternativamente, otros estudios indican que algunas poblaciones de anfibios que han experimentado declives por *Bd* podrían estar recuperándose y que, por tanto, los efectos de la enfermedad podrán estar sobrestimados (Knapp *et al*., 2016; Scheele *et al*., 2017). En el caso de *Bsal*, por el contrario, existen datos precisos del declive superior al 90% de *Salamandra salamandra* en centroeuropa (Stegen *et al*., 2017). Por último, no existen datos generalizados de los efectos de *Rv* en las poblaciones de anfibios a largo plazo, aunque ya se han constatado caídas bruscas de los efectivos poblacionales tras episodios de mortalidades masivas (p.ej. Price *et al*., 2014; Rosa *et al*., 2017) y, puntualmente, serios declives poblacionales (Bosch *et al*., 2021b).

Mientras que para los casos de *Bd* y *Bsal* existe un amplio consenso sobre sus efectos negativos para muchas especies y, por lo tanto, se han establecido programas de alerta temprana y seguimiento específicos, para *Rv* no se han desarrollado aún propuestas de gestión concretas. De hecho, para muchos autores *Rv* sigue considerándose un patógeno emergente 'de segundo nivel', con escasa relevancia en el declive generalizado de los anfibios (Bosch *et al*., 2021b).

Lógicamente, el análisis de las tendencias poblacionales requiere datos cuantitativos de abundancia recogidos de forma sistemática durante un periodo largo de tiempo. Sin embargo, el carácter discreto de los anfibios, y sus fuertes oscilaciones poblacionales dada su dependencia de las condiciones ambientales, complican la estimación de sus abundancias y hacen necesario largos períodos de estudio para conocer sus tendencias poblacionales. Además, la escala temporal a la que la presencia del patógeno, y la emergencia de enfermedad, se manifiestan en las tendencias poblacionales de los anfibios puede ser muy amplia (p. ej. Bosch *et al*., 2018). Así, si la incidencia del patógeno, y las correspondientes mortalidades masivas asociadas, se concentran en las larvas y en los ejemplares recién metamorfoseados, los descensos significativos en la abundancia de adultos tardarán varios años en ser apreciados.

En aquellas regiones del mundo que son reconocidas como las más impactadas por las enfermedades emergentes de anfibios, como Australia y Centro América, se han establecido programas de vigilancia y de seguimiento de poblaciones durante las dos últimas décadas. Como resultado, Scheele *et al*. (2017), por ejemplo, concluyeron que la quitridiomicosis estaba implicada en el declive de 43 de las 238 especies australianas, aunque también encontraron enormes diferencias en las trayectorias de las especies en declive: mientras algunas especies mostraban un declive continuado, otras parecían experimentar cierta recuperación. En Europa, por el contario, aún no se han establecido programas de seguimiento específicos para evaluar la incidencia de las enfermedades emergentes. De hecho, los programas de seguimiento de anfibios europeos no han conseguido, por ahora, reportar mortalidades masivas asociadas a *Bd*, pese a que estas podrían estar produciéndose, al menos, en aquellas especies más sensibles (p.ej. Harmos *et al*., 2021).

La cuenca mediterránea en general, y la Península Ibérica en particular, representan un punto caliente de diversidad de anfibios, en parte debido a la larga historia reciente de convivencia entre los ecosistemas naturales y las actividades humanas (López-López *et al*., 2011). De hecho, la Europa mediterránea alberga más del 88% de las 94 especies de anfibios europeos, de las que el 33% son endémicas (Cox *et al*., 2006). En España, y aunque se han reportado distintos casos de mortalidades masivas asociadas a enfermedades emergentes y algunos de ellos son objeto de seguimiento desde hace años, tampoco existen programas específicos de incidencia de patógenos. Recientemente, y para suplir estas carencias, la Asociación Herpetológica Española ha puesto en marcha la iniciativa SOSanfibios.org, cuyo objetivo es enriquecer el programa general de seguimiento de poblaciones (SARE, https://siare.herpetologica.es/sare) con datos de infección de patógenos.

A continuación, discutimos la importancia del diseño de los programas de seguimiento de poblaciones de anfibios en el contexto de las enfermedades emergentes. Así, y para la generalidad de las especies de anfibios ibéricos, proponemos unas pautas para el monitoreo de poblaciones antes de la emergencia de los patógenos, una vez que esta se ha producido, y tras la aplicación de actuaciones de mitigación de las enfermedades. Para ello, repasamos las especies, los momentos del año, los estadios de desarrollo, los tipos de medios y las técnicas más adecuadas para la obtención de datos relevantes sobre la presencia y la incidencia de *Bd, Bsal* y *Rv*.

DISEÑO DE PROGRAMAS DE SEGUIMIENTO EN EL CONTEXTO DE LAS ENFERMEDADES EMERGENTES

Cualquier programa de seguimiento de poblaciones de anfibios debería, como mínimo, ser capaz de detectar posibles episodios de mortalidad masiva provocados por enfermedades emergentes. Además, sería deseable que cualquier programa de seguimiento fuese también capaz de detectar los primeros indicios de incidencia de enfermedad e, incluso, la mera presencia de patógenos de anfibios, aun cuando estos no estén provocando enfermedad. Evidentemente, todo esto sólo es posible si se tiene en cuenta la dinámica de las distintas enfermedades emergentes existentes.

Desgraciadamente, muchas veces la época del año, la etapa de desarrollo y los lugares de reproducción más favorables para la obtención de datos de abundancia poblacional no son los más idóneos para la detección temprana de los patógenos o de su incidencia en las poblaciones. En esos casos, será necesario realizar, por separado, muestreos específicos para patógenos, y muestreos específicos para estimar abundancias poblacionales. Por ejemplo, si bien el conteo de puestas de bufónidos puede arrojar datos válidos para calcular tendencias poblacionales, no sirve para detectar la presencia o incidencia de *Bd/Bsal/Rv*. En otras ocasiones, como en el caso de las especies del género *Alytes*, el muestreo de sus larvas es ideal para, con poco esfuerzo, estimar tamaños poblacionales y, a la

vez, analizar la presencia e incidencia de todos los patógenos emergentes importantes, incluyendo *Bsal* (Stegen *et al*., 2017).

Época del año

La época del año resulta especialmente relevante para maximizar la probabilidad de detectar la presencia y, sobre todo, la incidencia de patógenos emergentes. En el caso de la quitridiomicosis por *Bd*, mientras que en zonas tropicales la elevada humedad ambiental hace que los hospedadores adultos presenten una incidencia elevada (p.ej. Murray *et al*., 2010), en las zonas templadas, y en la Península Ibérica en concreto, la escasa humedad ambiental hace que los ejemplares adultos presenten cargas de infección menores durante la fase terrestre (p.ej. Daversa *et al*., 2018). Por el contrario, las larvas suelen presentar mayor infección, sobre todo al final de la metamorfosis cuando la queratina ya está presente en todo el cuerpo y el sistema inmune deja de actuar para no interferir con los cambios drásticos en la morfología de los animales (p.ej. Garner *et al*., 2009). Por lo tanto, las larvas no sufren, en general, mortalidad por *Bd*, y esta se concentra en los ejemplares recién metamorfoseados. Sin embargo, la inmensa mayoría de los programas de seguimiento de anfibios sólo contemplan visitas durante el inicio de la estación reproductiva, cuando es más sencillo contabilizar los ejemplares adultos que se encuentran reproduciéndose en las masas de agua. Por lo tanto, los programas de seguimiento deberían incluir, al menos, una visita a las poblaciones en el momento de la metamorfosis con objeto de comprobar que no se están produciendo episodios de mortalidad masiva de metamórficos por *Bd*.

Por otro lado, y también para el caso de la quitridiomicosis, los períodos fríos son los más favorables para el desarrollo de la infección, dado que, aunque las temperaturas de crecimiento óptimo en cultivo en laboratorio para estos patógenos son relativamente altas (hasta 18ºC en *Bd* y 15ºC en *Bsa*; Piotrowski *et al*., 2004, Martel *et al*., 2013), las bajas temperaturas ralentizan el sistema inmune de los anfibios y favorecen la infección por *Bd* (Rollins-Smith, 2020). Así, por ejemplo, en larvas de *A. obstetricans* existe una relación negativa altamente significativa entre temperatura del agua y carga de infección por *Bd* (Fernández-Beaskoetxea *et al*., 2015). Además, las cargas de infección elevadas en las larvas de los anuros pueden producir la pérdida de dentículos del disco oral (Berger *et al*., 1998, Fellers *et al*., 2001, Fisher *et al*., 2018), por lo que puede resultar un indicio válido de incidencia de *Bd*. Sin embargo, en ningún caso puede atribuirse, de inmediato, la pérdida de dentículos a la quitridiomicosis, dado que existen otros factores posibles, como la contaminación, que provocan también este efecto (Navarro-Lozano *et al*., 2018).

Al contrario, la mayor incidencia de *Rv* se produce a altas temperaturas, cuando el metabolismo de los ejemplares es más elevado y el virus puede replicarse más rápido. Además, el aumento extraordinario de la temperatura por el calentamiento global, supone una ventaja adicional para el patógeno dadas las peculiaridades de la dinámica patógeno-hospedador (Price *et al*., 2019). Por lo tanto, las mortalidades masivas por ranavirosis suelen tener lugar durante el verano (Price *et al*., 2019), por lo que el seguimiento de poblaciones debería incluir, además, una visita durante el mes más cálido del año.

Lugares de muestreo

Los hábitats más favorables para detectar la presencia de *Bd/Bsal/Rv* son, en general, las zonas de montaña, bien por sus bajas temperaturas que favorecen la infección por *Bd/Bsal*, como por el alto grado de aislamiento genético de sus poblaciones que hace aumentar su susceptibilidad a los patógenos (Pearman y Garner, 2005). Dado que *Bd* no presenta formas de resistencia a la sequedad, las masas de agua temporales presentan menor incidencia (p.ej. Medina *et al*., 2015), siendo más indicado concentrar los seguimientos en aguas permanentes. Por otro lado, las aguas lénticas favorecen la acumulación de zoosporas y viriones que no son arrastrados por la corriente (p.ej. Medina *et al*., 2015) y, en general, los medios con altas concentraciones de larvas, como las charcas de montaña que acumulan varias cohortes de larvas invernantes, son medios altamente favorables para el desarrollo de enfermedades infecciosas y deberían ser objeto de monitoreo. Además, y especialmente para el caso de *Rv*, los anfibios de zonas agrícolas y ganaderas pueden presentar elevadas incidencias relacionadas con los altos niveles de estrés e inmunodepresión producidos por concentraciones elevadas de pesticidas, fertilizantes y antibióticos (Hua *et al*., 2017; Cusaac *et al*., 2021).

Por último, conviene recordar que las especies introducidas son, muchas veces, vectores de transmisión de patógenos a grandes distancias (p.ej. Weldon *et al*., 2004; Fisher y Garner, 2007; Solís *et al*., 2010; Valenzuela-Sánchez *et al*., 2017; Martel *et al*., 2020). Por lo tanto, siempre es necesario incluir medios altamente antropizados en los programas de seguimiento de enfermedades emergentes, como zonas de recreo habituales y áreas en núcleos urbanos, pero también espacios protegidos con alto número de visitantes (p.ej. von Essen *et al*., 2020).

Especies y estadios de desarrollo

La elección de la especie, o especies, y las etapas de desarrollo para detectar la presencia de patógenos y estimar su incidencia, resulta extremadamente importante dada la gran variabilidad que existe en su susceptibilidad. Si el objetivo es sólo detectar lo antes posible la presencia de patógenos en poblaciones sanas, lógicamente debemos centrarnos en las etapas de desarrollo y en las especies con mayor probabilidad de resultar infectadas. En la tabla 1 aparecen los géneros ibéricos, las etapas de desarrollo, las épocas del año y los hábitats recomendados para detectar, con mayor probabilidad, la presencia de *Bd/Bsal/Rv*. Todas las especies de la familia Alytidae son especialmente sensibles a *Bd*, al igual que los géneros *Salamandra, Bufo* y *Pelophylax,* si bien, como indicamos antes, en las especies fundamentalmente terrestres (*Alytes* spp., *Bufo spinosus* y *Salamandra salamandra*) los adultos

Patógeno	Género	Estadio de desarrollo	Época del año	Características ambientales
Bd	*Alytes*	larvas invernantes	meses fríos	elevada altitud, aguas permanentes y quietas
	Bufo	recién metamorfoseados	final del verano	elevada altitud
	Discoglossus	adultos	primavera	indiferente
	Pelophylax	adultos	primavera	elevada altitud, aguas permanentes y quietas
	Salamandra	larvas invernantes	meses fríos	elevada altitud, aguas permanentes y quietas
	Triturus	adultos	primavera	elevada altitud, aguas permanentes y quietas
Bsal	*Chioglossa*	adultos	primavera, otoño	indiferente
	Ichthyosaura	adultos	primavera, otoño	indiferente
	Pleurodeles	adultos	primavera, otoño	indiferente
	Lissotriton	adultos	primavera, otoño	indiferente
	Salamandra	adultos	primavera, otoño	indiferente
	Triturus	adultos	primavera, otoño	indiferente
Ranavirus	indiferente	indiferente	meses cálidos	poblaciones de montaña aisladas, áreas degradadas con abundante carga ganadera o actividad agrícola

Tabla 1. - Géneros, estadios de desarrollo, épocas del año y características ambientales más indicadas para el seguimiento de la incidencia de enfermedades emergentes en los anfibios Ibéricos.

raramente están infectados, o presentan prevalencias bajas (p.ej. Medina *et al*., 2015). De forma similar, las ranas verdes suelen ser portadoras de *Bd*, aunque sus hábitos diurnos y la exposición al sol hacen que no desarrollen la enfermedad (Bosch *et al*., 2018). Por lo tanto, son las larvas de las especies europeas más susceptibles a *Bd* las ideales para detectar su presencia, si bien, en el caso de los anuros, y dado que la infección sólo se encuentra presente en el disco oral, si no es posible introducir la punta de la torunda en la boca es necesario sacrificar al ejemplar y analizar el disco oral completo, incluso mediante histología. Por el contrario, las larvas de urodelo presentan queratina en todo el cuerpo, facilitando la toma de muestras para detección de infección. En ambos casos, cuanto mayor sea la etapa de desarrollo larvario, mayor probabilidad de encontrar infección, siendo especialmente útiles las larvas invernantes, que concentran las cargas más elevadas (Medina *et al*., 2015; Fernández-Beaskoetxea *et al*., 2016). En el caso de *Bsal*, todas las especies son susceptibles de presentar infección, aunque algunas de ellas, como *Calotriton asper* y *Lissotriton helveticus*, presentan baja susceptibilidad y no son recomendables para programas de alerta temprana. Hay que recordar que los anuros también pueden ser susceptibles a la infección por *Bsal*, aunque no desarrollen la enfermedad, y especialmente *A. obstetricans* es un buen candidato para ser objeto de seguimiento de este patógeno. En el caso de *Rv*, cualquier especie es susceptible de presentar infección, si bien *Alytes* es, nuevamente, el género más susceptible y, por tanto, más recomendado para el seguimiento de este patógeno.

Por otro lado, y dado que *Bd* se haya ampliamente distribuido en todo el mundo desde hace décadas (Fisher *et al*., 2009; Olson *et al*., 2013), en aquellas zonas donde climatológicamente puede desarrollarse fácilmente debe considerarse casi endémico (Fisher *et al*., 2009; Lips, 2016). Por lo tanto, si queremos entender la dinámica de la infección y la probabilidad de que la enfermedad aparezca en poblaciones sanas, los seguimientos a realizar en dichas zonas deberían incluir, en la práctica, a todas las especies de la comunidad, y no sólo a las especies más susceptibles. De hecho, en comunidades de anfibios ricas, los efectos de la quitridiomicosis a largo plazo serán, previsiblemente, complejos, y su dinámica difícil de entender. Por ejemplo, Bosch y Rincón (2008) documentan la expansión inicial de *Bufo spinosus* tras la casi completa desaparición de *A. obstetricans* en el macizo de Peñalara. Sin embargo, esa rápida expansión de *B. spinosus* fue seguida, años más tarde, de su lento, pero inexorable declive (Bosch *et al*. 2014; 2018), ilustrando cómo los estudios a corto plazo y centrados sólo en las especies más sensibles no son suficientes para entender correctamente los efectos de las enfermedades emergentes en las comunidades de anfibios.

PROTOCOLOS DE BIOSEGURIDAD DURANTE LAS LABORES DE SEGUIMIENTO

Conviene recordar, en primer lugar, que cualquier actividad de seguimiento de poblaciones de anfibios debe realizarse bajo condiciones estrictas de bioseguridad, tanto en aquellas donde aún no se ha detectado la presencia de patógenos, como en aquellas con presencia confirmada. En el primer caso es fundamental evitar la entrada de patógenos no presentes, mientras que en el segundo se trata de evitar la dispersión de los ya presentes a otras zonas libres de estos. En ambos casos, sin embargo, las medidas de bioseguridad a aplicar son parecidas. Todo el material que entre en contacto con el medio (botas de campo, mangas de muestreo, recipientes para retener animales, etc.) debe desinfectarse con lejía doméstica sin diluir o, preferentemente con soluciones comerciales desinfectantes como Virkon® (Phillott *et al*., 2010). La aplicación de estas sustancias debe realizarse antes y después del muestreo y, preferentemente, en el laboratorio para evitar que acaben en el medio natural, sumergiendo totalmente el material en el líquido desinfectante durante el mayor tiempo posible (y siempre superior a 5 minutos). Al concluir los trabajos en un punto de muestreo, y sin abandonar

éste, es muy importante eliminar primero la materia orgánica de todo el material de muestreo (incluyendo las botas de campo) mediante un cepillo de cerdas duras. Después, se debe aplicar alguna de estas sustancias desinfectantes mediante un pulverizador, y almacenar todo el material en bolsas de plástico cerradas hasta llegar al laboratorio, donde deberá ser sumergido completamente en líquido desinfectante. El uso de recipientes no desechables para retener a los animales está desaconsejado y, obviamente, todos los ejemplares deben manejarse con guantes desechables de nitrilo.

SEGUIMIENTO DE POBLACIONES SIN INCIDENCIA CONOCIDA DE PATÓGENOS EMERGENTES

Muestras de infección en ejemplares de anfibios

Para detectar la presencia de patógenos y, a la vez y mucho más relevante, para conocer su incidencia en los anfibios, se pueden emplear técnicas histológicas o bien técnicas moleculares (PCR). En el caso de la histología, su baja capacidad de detección durante las primeras etapas de la infección, y la casi siempre necesidad de analizar órganos internos en el caso de *Rv*, desaconsejan su uso para la mera detección de patógenos, quedando reservada normalmente para la confirmación de un diagnóstico previo mediante PCR. Por el contario, la histología permite la diferenciación entre animales verdaderamente enfermos y animales infectados o portadores, dado que las lesiones cutáneas son determinantes de la enfermedad: alteración de la estructura epidérmica y dérmica (en el caso de *Bd* y *Bsal*), y lesiones hepáticas, renales, gástricas, cutáneas e incluso en médula ósea en animales afectados por *Rv* (Miller *et al*., 2015).

La alta sensibilidad de la PCR hace que esta sea la técnica estrella para la detección de patógenos en anfibios, sobre todo cuando la enfermedad aún no ha cursado y no pueden observarse signos externos. Las muestras para PCR suelen ser tejidos fijados en etanol en campo, y que también pueden emplearse para su análisis histológico (fundamentalmente, falanges de ejemplares ya metamorfoseados, el extremo de la cola de larvas, o el extremo de la cola de urodelos adultos), pero también torundas estériles de algodón. En el último caso, la ventaja de no ocasionar ningún daño al animal, y no favorecer posibles infecciones posteriores, es evidente. La toma de muestras en torunda se realiza pasando el algodón por toda la superficie del animal, aunque con especial incidencia en la zona ventral y posterior del mismo, hasta completar, al menos, 25 barridos extensos (Hyatt *et al*., 2007). Estos deben realizarse, además, con firmeza para arrastrar las posibles zoosporas y viriones presentes en la piel y, en el caso de las larvas de anuro, la punta de la torunda debe también introducirse en el disco oral del ejemplar (lo que es posible, solo, en las especies de mayor tamaño). Inmediatamente tras la toma de muestras, las torundas deben conservarse en frio o congeladas y, cuando esto no sea posible, fijadas añadiendo 2-3 gotas de etanol al 70% o superior. Es importante que los ejemplares a muestrear estén húmedos, pero sin un exceso de agua y, sobre todo, limpios de barro o cualquier otra sustancia para evitar posibles inhibiciones de la PCR. Posteriormente, la detección del posible ADN de los patógenos, así como su cuantificación precisa, se realiza mediante una PCR de punto final, o una qPCR (PCR cuantitativa o también llamada en tiempo real). Para ello, se emplean cebadores específicos del patógeno correspondiente y, en el caso de la qPCR, una sonda Taqman específica del ADN diana marcada con fluorescencia. De esta forma, el grado de especificidad es aún más alto, reduciéndose la probabilidad de obtener falsos positivos. Los protocolos de qPCR más empleados para *Bd, Bsal* y *Rv* son, respectivamente, los de Boyle *et al*. (2004), Blooi *et al*. (2013) y Leung *et al*. (2017).

En el caso de la histología se emplea la tinción general de hematoxilina/eosina, si bien se pueden usar tinciones específicas de hongos como la de Grocott-Gomori, o incluso la de rojo Congo (Berger *et al*., 1999; Briggs y Burgin, 2004; Kriger *et al*., 2006). Estas tinciones permiten detectar perfectamente todas las formas del ciclo vital de los hongos quitridios en la piel de los animales afectados, y también los cuerpos de inclusión víricos generados por *Rv* en el interior del citoplasma de las células hepáticas o de otros órganos diana del virus. Existen tinciones inmunohistoquímicas específicas para *Bsal* y para *Rv* que permiten destacar, colorimétricamente, estos agentes en un tejido afectado, si bien su uso es todavía experimental (Saucedo *et al*., 2016; Thomas *et al*., 2017). Pueden realizarse también técnicas de citología mediante improntas cutáneas de animales vivos afectados con cargas altas y mediante el uso de tinciones citológicas generales (Diff Quick) o específicas para hongos, como el azul de lactofenol (Pessier, 2007).

El número de muestras necesario para detectar, con un grado aceptable de fiabilidad, la presencia de *Bd/Bsal/Rv* dependerá, evidentemente, del valor de prevalencia existente en la población estudiada. Así, una prevalencia, por ejemplo, del 10% en la especie y etapa de desarrollo estudiada, implica que será necesario tomar, al menos, 10 muestras para detectar la presencia del patógeno, y siempre y cuando utilicemos técnicas de análisis altamente fiables, como la qPCR. Por lo tanto, resulta complicado establecer, a priori, tamaños muestrales para zonas donde no existan datos previos de infección, pero, en general, tamaños muestrales inferiores a 20 estarían desaconsejados dado que prevalencias de infección en torno al 5% son habituales. En cualquier caso, y dado nuestro alto grado de conocimiento actual sobre la biología de *Bd/Bsal/Rv*, y como hemos señalado antes, la elección correcta de las especies, estadios de desarrollo, épocas del año y hábitats, reducirá enormemente el tamaño muestral necesario para detectar su presencia y estudiar su incidencia (Gray *et al*., 2017).

Muestras de ADN ambiental

Para detectar la presencia de *Bd, Bsal* o *Rv* en las poblaciones de anfibios pueden emplearse además técnicas de ADN ambiental (eDNA en sus siglas en inglés). Desde 2007 existen métodos probados en laboratorio y en campo para *Bd* (p.ej. Walker *et al*., 2007), y más recientemente para *Rv* (Hall *et al*., 2015) y *Bsal* (Spitzen-van der Sluijs *et*

al., 2020). En todos ellos el funcionamiento es similar. Se trata de filtrar volúmenes de agua razonables, bien sea con jeringuillas o ayudados con bombas mecánicas, mediante membranas de filtrado con un tamaño de poro suficientemente pequeño para retener las zoosporas de *Bd/Bsal* o los viriones de *Rv* (normalmente, 0,45 um y 0,2 um, respectivamente). En la mayoría de los casos, y siempre que se trate de un medio léntico con abundantes partículas en suspensión, es conveniente realizar primero un prefiltrado para no saturar la membrana prematuramente. Una vez realizado el filtrado, la membrana debe almacenarse congelada, o bien conservada en un buffer específico. Ya en el laboratorio, la extracción del ADN presente en la membrana de filtrado se realiza, normalmente, mediante kits de extracción comerciales para muestras de suelo (p.ej. el kit PowerSoil DNA Isolation Kit de Laboratorios MO Bio). Finalmente, con la extracción obtenida se realiza una PCR de punto final para detectar o, mejor aún, una qPCR para cuantificar el ADN de los patógenos presentes. Evidentemente, todo el proceso debe realizarse bajo condiciones muy estrictas para evitar la contaminación cruzada. Todo el proceso debe realizarse con guantes, y las membranas de filtrado deben esterilizarse con radiación de UV antes de ser utilizadas en el campo y manejarse siempre con pinzas estériles. El portafiltro, las jeringuillas, los tubos del filtro mecánico y cualquier recipiente o utensilio que entre en contacto con el medio deben ser previamente tratados con hipoclorito sódico (lejía doméstica), para destruir cualquier resto de ADN presente, y enjuagados con agua destilada o doblemente purificada de laboratorio, antes de usarse. Evidentemente, todo el material debe volver a ser esterilizado antes de ser usado en otra masa de agua, por lo que el proceso puede resultar algo tedioso si el muestreo incluye varias masas de agua en la misma jornada de campo. El punto exacto para la toma de la muestra en cada masa de agua debe elegirse con cuidado, dada la esperada variabilidad ambiental en la abundancia de zoosporas y viriones o, mejor aún, debe realizarse en múltiples localizaciones dentro de la masa de agua en función de su tamaño, para obtener un valor medio. Si esto no es posible, la toma de la muestra debería realizarse en los microhábitats más frecuentados por los anfibios, o en la salida del agua de la charca asumiendo que allí estamos recogiendo gran parte del material existente en ella. En el caso de *Rv*, también es posible extraer ADN de muestras de suelo, dado que los viriones son altamente resistentes a la desecación (Hall *et al*., 2015), aunque en ese caso, y dado el limitado volumen de muestra que es posible extraer con los kits comerciales, la detección puede ser más complicada.

La ventaja del uso de ADN ambiental para la detección y cuantificación de los patógenos es evidente: ni siquiera es necesaria la presencia de los anfibios para la toma de muestras, por lo que es un método muy indicado cuando no sea posible capturar a los animales (por ejemplo, durante el día, fuera de la época de reproducción, etc.). Sin embargo, esta ventaja es también su gran inconveniente: si la abundancia de anfibios hospedadores es baja, la abundancia de sus patógenos también será baja, por lo que necesitaremos filtrar volúmenes grandes de agua para encontrar zoosporas o viriones. Además, y fundamentalmente en el caso de *Bd* y *Bsal*, la existencia de centenares de especies de hongos quitridios en todo el mundo aumenta la posibilidad de obtener falsos positivos para *Bd* o *Bsal*. Además, este problema se agudiza si, como ocurre muchas veces, el método de ADN ambiental se basa en la detección de regiones de ADN más cortas de las empleadas con otro tipo de muestras, para lidiar así con la mayor fracturación del ADN ambiental. Igualmente arriesgado es el uso de SYBER Green, en lugar de sondas Taqman específicas para los patógenos estudiados, dado que así reducimos la especificidad del diagnóstico y aumentamos la probabilidad de obtención de falsos positivos.

En cualquier caso, conviene recordar que la Organización Internacional de Salud Animal (OIE, por sus siglas en francés) considera obligatoria la declaración de infección por *Bd/Bsal/Rv* (p.ej. Schloegel *et al*., 2010) y, si no ha sido previamente diagnosticada correctamente en una zona concreta son necesarios, al menos, dos métodos diagnósticos distintos. Por lo tanto, la existencia de infección en una zona geográfica no puede establecerse únicamente mediante PCR (incluso en muestras de tejido), y un análisis histológico de tejido de anfibios infectados es totalmente necesario.

Registro de signos compatibles con quitridiomicosis y ranavirosis

Mientras que la quitridiomicosis por *Bd* no produce lesiones macroscópicas evidentes en la piel, tanto *Bsal* como *Rv* producen signos claros en ejemplares enfermos. En el caso de *Bsal* es posible observar pequeñas úlceras en la piel, mientras que *Rv* puede producir úlceras muchos más evidentes y necrosis en extremidades, ojos, boca, etc. Evidentemente, se deben tomar muestras para la detección de infección de cualquier ejemplar con signos compatibles con estas enfermedades y ser analizadas inmediatamente.

Muestras de infección en ejemplares encontrados muertos

Cualquier ejemplar encontrado muerto durante las labores de seguimiento debería ser recogido para su necropsia posterior en laboratorio (Fig. 1). La necropsia debe realizarse siguiendo protocolos establecidos para anfibios, de un modo sistemático (revisando los sistemas corporales), ordenado (siempre siguiendo un protocolo no improvisado) y completo (no descuidando ningún órgano) (Pessier y Pinkerton, 2003). Debería incluir, al menos, la inspección macroscópica de la piel en busca de lesiones compatibles con la quitridiomicosis y la ranavirosis, y la de los órganos internos antes especificados (básicamente hígado y riñón) para esta última. Posteriormente, debería realizarse un análisis por PCR a partir de muestras de piel e hígado, y complementado con un análisis histológico.

Las necropsias deben realizare también en los ejemplares encontrados muertos por causas evidentes como atropellos, episodios de congelación o sequía prematura, depredación, etc., ya que permiten la obtención de muestras valiosas de tejido (sobre todo interno) para detectar la posible presencia desconocida de patógenos sin ocasionar daños a ejemplares vivos.

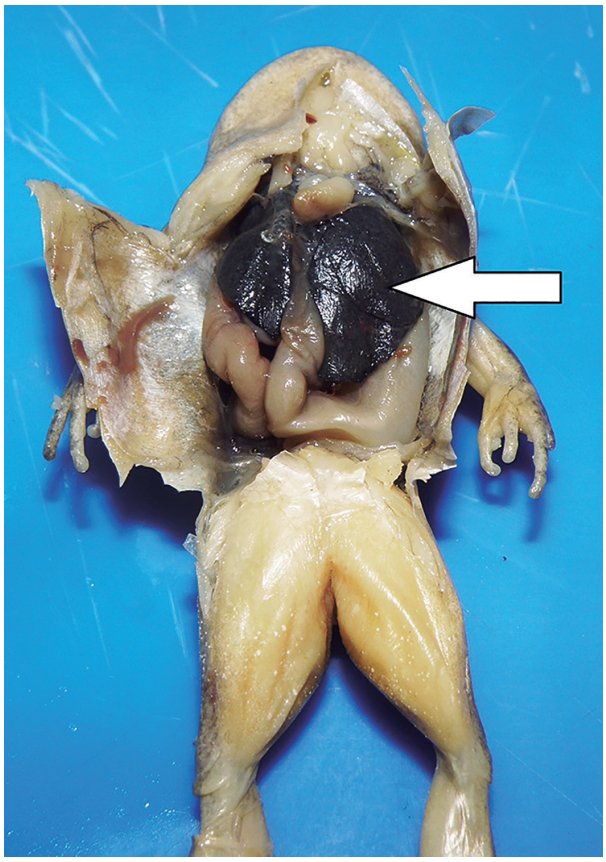

Fig. 1. - Necropsia de un ejemplar de *Rana pyrenaica* muerto por ranavirosis. Se destaca la disposición del aparato digestivo, y con la flecha se indica el lóbulo izquierdo hepático donde tomar muestras para la detección de *Ranavirus*.

SEGUIMIENTO DE POBLACIONES CON INCIDENCIA CONOCIDA DE ENFERMEDADES EMERGENTES

Las poblaciones con presencia confirmada de patógenos emergentes deberían ser objeto, cuanto antes, de seguimiento para conocer con precisión los cambios en los niveles de infección y los efectos de la enfermedad sobre la tendencia poblacional. En este caso, las medidas de bioseguridad durante los muestreos deben ser aún más extremas que en el caso anterior. Así, por ejemplo, los guantes deben cambiarse para manipular distintos ejemplares o, alternativamente, rociarse con etanol absoluto antes de manipular un nuevo ejemplar, pero asegurándose que el etanol se ha evaporado completamente. Evidentemente, la toma de muestras de infección resulta fundamental en este caso, y debería abarcar todas las especies y estadios de desarrollo presentes, y no sólo aquellos más susceptibles. También los muestreos de ADN ambiental están recomendados en este caso para evaluar los cambios en los niveles de infección en el medio, más aún porque los niveles de zoosporas y viriones serán elevados en este caso.

Además, y dado que previsiblemente los patógenos emergentes provocarán cambios en las abundancias de las especies, el cálculo del tamaño poblacional debería ser lo más exacto posible. Idealmente, se deberían emplear técnicas de marcaje y recaptura, aunque las estimaciones visuales pueden ser suficientes para calcular las trayectorias poblacionales con relativa precisión.

Conteo de ejemplares enfermos y retirada de cadáveres

En este caso, todos los ejemplares con signos de enfermedad deben ser contabilizados, y se debe tomar una muestra de infección suficiente de cada una de las especies y estadios de desarrollo implicados con objeto de calcular su prevalencia de infección.

Todos los ejemplares encontrados muertos deben ser contabilizados y retirarse del medio con objeto de ser analizados en laboratorio y, además, de reducir la carga ambiental de infección y evitar futuros contagios de ejemplares sanos. El conteo y la retirada de ejemplares muertos deben realizarse, preferentemente, durante el día, buscando en un amplio margen de terreno alrededor de la masa de agua y dentro de esta, pero también levantando piedras y cualquier objeto presente en el medio. Evidentemente, los cadáveres deben manipularse con extremo cuidado para no dispersar los agentes patógenos, aunque estos estén ya totalmente secos. Para ello, la mejor opción es fijar los más frescos directamente en el campo, en etanol al 70% o superior, y en formol al 4% para análisis histológicos de calidad una muestra más pequeña de cada especie y estadio de desarrollo. Los cadáveres más deteriorados (no aptos ni para histología ni para análisis de PCR) deben recogerse en bolsas de plástico a las que se añadirá Virkon o lejía, cerradas con bridas de plástico en el campo, y destruidas lo antes posible en dependencias especializadas mediante incineración.

ESTIMACIÓN DE LA ABUNDANCIA Y CÁLCULO DE TENDENCIAS POBLACIONALES

Como hemos indicando antes, además de la obtención de datos de presencia y/o incidencia de patógenos, resulta fundamental realizar estimaciones, lo más precisas posibles, de la abundancia de las poblaciones, antes incluso de la llegada de un patógeno emergente y, sobre todo, antes de que se produzcan las primeras mortalidades masivas. Evidentemente, sólo conociendo los valores de abundancia antes de los brotes de enfermedad seremos capaces de evaluar los efectos de la misma sobre las poblaciones.

Las técnicas de marcaje y recaptura, tanto de larvas como de adultos, y tanto con marcajes no individuales (Fig. 2a) como con marcajes con microchip (Fig. 2b), son, sin duda, las más recomendadas para la obtención de estimaciones de abundancia precisas en poblaciones de anfibios. Sin embargo, en el contexto de las enfermedades emergentes, es altamente recomendable evitar, en la media de lo posible, la captura y el manejo de ejemplares con objeto de reducir los riesgos de contagio. Así, el programa de seguimiento de poblaciones de la Asociación Herpetológica Española (SARE) realizado por voluntarios, por ejemplo, se basa en muestreos de encuentros visuales sin captura de ejemplares. Lógicamente, los datos de abundancia

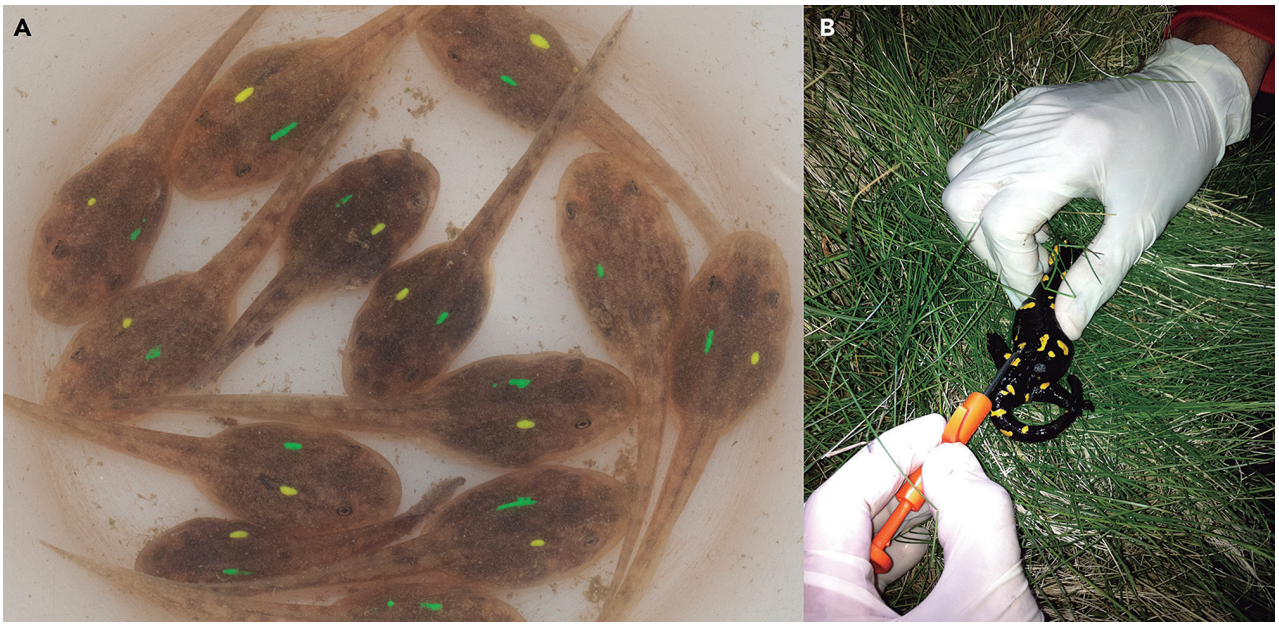

Fig. 2. - Marcaje no individual con elastómeros de colores de larvas de *Alytes obstetricans* (A) y marcaje individual con microchip de un ejemplar de *Salamandra salamandra* (B).

obtenidos con este método son mucho menos precisos, y siempre relativos a la especie y a la estación de muestreo. No obstante, esta metodología es suficiente para establecer tendencias y, en su caso, declives poblacionales (p.ej. Bosch y Carabias, 2014).

Por ejemplo, el estudio a largo plazo de la comunidad de anfibios del macizo de Peñalara, en el corazón del Parque Nacional de Guadarrama, tras el brote de quitridiomicosis severo aportó datos interesantes basándose, simplemente, en el conteo visual de puestas y larvas (Bosch *et al*., 2018). Como puede apreciarse en la Fig. 3, las trayectorias poblacionales durante los 18 años de estudio de las especies sensibles a *Bd* y que sufrieron, por tanto, mortalidades masivas, fueron claramente negativas, mientras que el resto de las especies (a excepción de *Rana iberica*) mostraron tendencias positivas o neutras durante el período de estudio (Bosch *et al*., 2018). En este caso, todas las especies eran portadoras de *Bd*, pero la enorme diferencia de susceptibilidad entre ellas pone de manifiesto la necesidad de elegir la especie adecuada si no se aborda el estudio completo de la comunidad. Además, este estudio demostró una correlación negativa estadísticamente significativa entre niveles de infección y abundancia de larvas y puestas, así como la existencia de un esperado retraso entre ambas variables como consecuencia de los períodos necesarios para alcanzar la madurez sexual. Por último, este estudio demostró que los efectos devastadores en las especies sensibles podrían ser permanentes y provocar, en sólo algunas décadas, su extinción local.

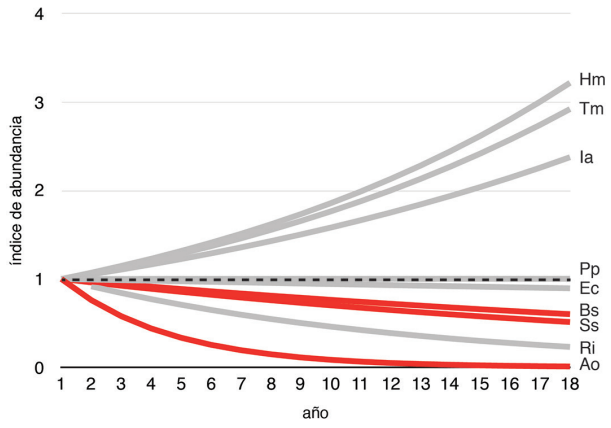

Fig. 3. - Índices de abundancia modelizados de 9 especies de anfibios en el macizo de Peñalara durante un período de 18 años consecutivos tras tres desde las primeras mortalidades registradas por *Bd*. En rojo aparecen las especies para las que se han detectado mortalidades masivas, mientras que en gris se muestran las especies para las que nunca se han encontrado ejemplares muertos. La línea de puntos indica el índice 0 de ausencia de crecimiento/declive. Hm, *Hyla molleri*; Tm, *Triturus marmoratus*; Ia, *Ichthyosaura alpestris*; Pp, *Pelophylax perezi*; Ec, *Epidalea calamita*; Bs, *Bufo spinosus*; Ss, *Salamandra salamandra*; Ri, *Rana iberica*; Ao, *Alytes obstetricans*.

En el caso de la ranavirosis, un estudio de 14 años, también basado en conteos visuales, puso de manifiesto los efectos severos y persistentes de *Rv* sobre las especies más sensibles (Bosch *et al*., 2021b). Los conteos visuales incluyeron estadios adultos en algunas especies, como por ejemplo *S. salamandra* y varias especies de tritones, y cubrieron gran variedad de medios. Como puede apreciarse en la Fig. 4, las trayectorias de aquellas poblaciones donde se registraron mortalidades asociadas a *Rv* fueron mayoritariamente negativas, mientras que el resto de las poblaciones presentaron trayectorias planas o, incluso, positivas. Este estudio demuestra el importante papel que *Rv* puede desempeñar en los declives de anfibios, y la urgente necesidad de considerar a este patógeno como una de las mayores amenazas para su conservación.

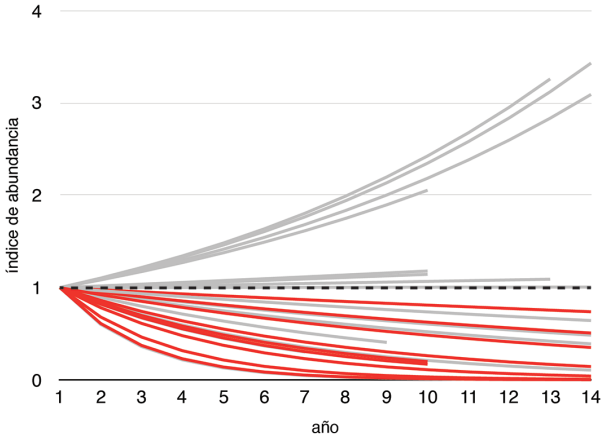

Fig. 4. - Índices de abundancia modelizados para 24 poblaciones de anfibios del Parque Nacional de Picos de Europa durante un período de 14 años comenzando tres años después de que registrásemos las primeras mortalidades por Rv. En rojo aparecen las poblaciones para las que se han detectado mortalidades masivas, mientras que en gris se muestran las poblaciones en las que nunca se han encontrado ejemplares muertos. La línea de puntos indica el índice 0 de ausencia de crecimiento/declive.

Por el contario, los seguimientos de poblaciones afectadas por enfermedades emergentes mediante el marcaje individual con microchip proporcionan datos, no solo de sus tendencias poblacionales, sino también de la dinámica de infección de los patógenos. Por ejemplo, en el caso de *Bufo spinosus*, el marcaje de casi 2.000 ejemplares en Guadarrama durante más de 15 años nos ha permitido, no solo demostrar la tendencia negativa de las poblaciones más afectadas (Bosch *et al*. 2014), sino documentar los cambios anuales que se dan en el estatus de infección de los ejemplares adultos, o los momentos del año cuando se produce, probablemente, la pérdida y la ganancia de infección (Daversa *et al*., 2018).

Por último, los estudios de genética de poblaciones pueden resultar eficaces para analizar los efectos de las enfermedades emergentes a largo plazo. Por ejemplo, Albert *et al*. (2015) encontraron una importante reducción de la diversidad genética en la población de *A. obstetricans* del macizo de Peñalara como resultado del cuello de botella demográfico experimentado por el brote severo de quitridiomicosis. De esta forma, es posible inferir de forma indirecta el efecto de las enfermedades a largo plazo, incluso sin tener información previa al brote de mortalidad.

SEGUIMIENTO DE POBLACIONES TRAS ACTUACIONES DE MITIGACIÓN DE ENFERMEDADES EMERGENTES

El seguimiento continuo de las poblaciones afectadas por patógenos emergentes no sólo es necesario para evaluar la tendencia poblacional, sino también para recabar datos valiosos para intentar mitigar los impactos de las enfermedades. Además, una vez que se ha puesto en marcha algún intento de mitigación, el seguimiento de la población es totalmente necesario para analizar el resultado de esta. Por ejemplo, Fernández-Loras *et al*. (2020) realizaron un intento de eliminación de *Bd* en un sistema de pilones de ganado de la provincia de Teruel que alberga poblaciones de *A. obstetricans*. Tras retirar las larvas infectadas de todos los pilones experimentales, en algunos de ellos no se realizaron medidas de control posteriores, en otros se impidió la entrada de ejemplares adultos durante toda la estación mediante su vallado y, finalmente, otro grupo de pilones fueron completamente desecados. Todos los pilones experimentales, y los del grupo control, fueron seguidos durante tres años tras las intervenciones, y se recogieron muestras de infección cuando se encontraron nuevas larvas invernantes en ellos. Como cabría esperar, la infección no desapareció del grupo control durante el período de seguimiento posterior, ni tampoco lo hizo del grupo de pilones donde sólo se retiraron las larvas infectadas, ni en los que además habían sido vallados. En el caso de los pilones que fueron desecados completamente, la infección desapareció durante los dos años posteriores a la intervención, aunque volvió a aparecer tres años después. Por lo tanto, este experimento demostró que, incluso intervenciones severas del medio acuático en poblaciones de estructura simple, no serían efectivas a largo plazo si no se aborda el hábitat al completo, incluyendo el medio terrestre circundante.

En otro experimento más exitoso en la Sierra de Tramontana de Mallorca (Bosch *et al*., 2015) con *A. muletensis*, procedimos al vaciado completo de todas las pozas existentes en dos torrentes infectados con *Bd* durante el período de mayor sequía. Como puede verse en la Fig. 5 para el caso del Torrent des Ferrerets, la abundancia larvaria había caído a niveles insostenibles cuando decidimos realizar la intervención severa, también considerando el riesgo extremo de dispersión del patógeno al vecino torrente que alberga la inmensa mayoría de ejemplares de la especie. Las larvas existentes y los adultos que pudieron ser capturados de las inmediaciones de las pozas de los torrentes intervenidos fueron trasladados al laboratorio y tratados con fungicidas antes de ser liberados el año siguiente en sus localidades exactas de captura. Por último, las paredes de las pozas, y sus alrededores que mantenían cierto grado de humedad, fueron tratados con Virkon tras el vaciado con objeto de eliminar cualquier vestigio de *Bd*. Como se aprecia en la figura, tras la intervención la abundancia de larvas comenzó a recuperarse, mientras que despareció la carga de infección. El seguimiento de esta actuación continúa ocho años después de la intervención hasta la actualidad, sin que se haya vuelto a registrar infección nuevamente.

CONCLUSIONES

Los programas de vigilancia epidemiológica en poblaciones de anfibios son esenciales dado el importante papel de los patógenos emergentes en el declive de este grupo animal. Estos programas, destinados al estudio de la ocurrencia de los patógenos y la detección de enfermedad y mortalidad, deben ir de la mano de programas de seguimiento de poblaciones para poder establecer los efectos de las enfermedades sobre las tendencias poblacionales de los anfibios. Por desgracia, ambos tipos de programas tienen requerimientos específicos distintos, y no siempre es posible obtener datos epidemiológicos y estimaciones de abundancia durante las mismas jornadas de trabajo de

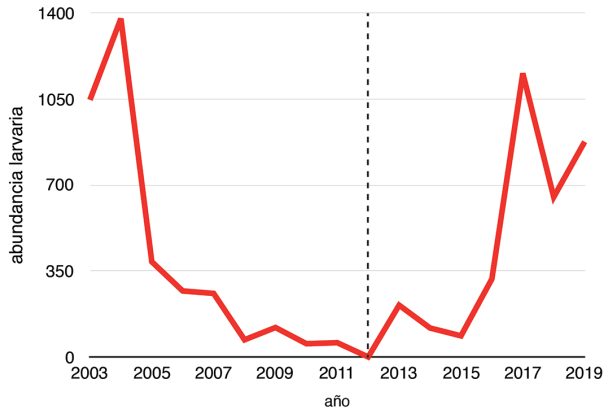

Fig. 5. - Número de larvas de *Alytes muletensis* contabilizadas en el Torrent des Ferrerets antes y después de la erradicación de *Bd* realizada en 2012 (Bosch *et al.*, 2015).

campo. El avance en el conocimiento de la dinámica de las enfermedades de anfibios realizado en las últimas dos décadas permite acotar, hasta cierto punto, los trabajos de los programas de vigilancia, e intentar compatibilizarlos con las tareas de seguimiento de poblaciones. Lamentablemente, el elevado coste económico del análisis de muestras de infección mediante métodos moleculares (no inferior a 5-10 € por muestra), o el elevado tiempo de análisis que requieren las técnicas histológicas, complican enormemente la obtención de datos epidemiológicos.

AGRADECIMIENTOS

El personal de la Consejería de Medio Ambiente de las Islas Baleares y, especialmente, Xavier Manzano, Eva Moragues, Irene Garneria y Samuel Pinya, colaboraron en los trabajos de desinfección realizados en Mallorca y realizan las labores de seguimiento de las poblaciones de ferreret. Gonçalo M. Rosa contribuyó a mejorar el texto aportando información relevante.

BIBLIOGRAFÍA

Albert, E.M., Fernández-Beaskoetxea, S., Godoy, J.A., Tobler, U., Schmidt, B.R., Bosch, J., 2015. Genetic management of an amphibian population after a chytridiomycosis outbreak. Conserv. Genet. 16, 103-111.

Anderson, R.M., May, R.M., 1979. Population biology of infectious diseases: Part I. Nature 280, 361-367.

Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E., Cunningham, A.A., Goggin, C.L., Slocombe, R., Ragan, M.A., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Hines, H.B., Lips, K.R., Marantelli, G., Parkes, H., 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. Proc. Nat. Acad. Sci. United States of America 95, 9031-9036.

Berger, L., Speare, R., Kent, A., 1999. Diagnosis of chytridiomycosis in amphibians by histologic examination. http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/histo/chhisto.htm.

Blooi, M., Pasmans, F., Longcore, J.E., Spitzen-Van Der Sluijs, A., Vercammen, F., Martel, A., 2013. Duplex real-Time PCR for rapid simultaneous detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* in amphibian samples. J. Clin. Microbiol. 51, 4173-4177.

Bosch, J., Carabias, J., 2014. Primeros resultados del Programa SARE en anfibios. Bol. Asoc. Herpet. Esp. 25, 13-21.

Bosch, J., Fernández-Beaskoetxea, S., Garner, T.W.J., Carrascal, L.M., 2018. Long-term monitoring of an amphibian community after a climate change- and infectious disease-driven species extirpation. Global Change Biol. 24, 2622-2632.

Bosch, J., Fernández-Beaskoetxea, S., Scherer, R.D., Amburgey, S.M., Muths, E., 2014. Demography of common toads after local extirpation of co-occurring Midwife Toads. Amphibia-Reptilia 35, 293-303.

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

Bosch, J., Martínez-Solano, I., García-París, M., 2001. Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of Central Spain. Biol. Cons. 97, 331-337.

Bosch, J., Mora-Cabello de Alba, A., Marquínez, S., Price, S.J., Thumsová, B., Bielby, J., 2021b. Long-term monitoring of amphibian populations of a national park in northern Spain reveals negative persisting effects of *Ranavirus*, but not *Batrachochytrium dendrobatidis*. Front. Vet. Sci. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.645491.

Bosch, J., Rincón, P.A., 2008. Chytridiomycosis-mediated expansion of *Bufo bufo* in a montane area of Central Spain: an indirect effect of the disease. Divers. & Distrib. 14, 637-643.

Bosch, J., Sánchez-Tomé, E., Fernández-Loras, A., Oliver, J.A., Fisher, M.C., Garner, T.W.J., 2015. Successful elimination of a lethal wildlife infectious disease in nature. Biol. Lett. 11, 20150874.

Boyle, D.G., Boyle, D.B., Olsen, V., Morgan, J.A.T., Hyatt, A.D., 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. Diseas. Aquat. Organ. 60, 141–148.

Briggs, C., Burgin, S., 2004. Congo Red, an effective stain for revealing the chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, in epidermal skin scrapings from frogs. Mycologist 18, 98-104.

Castro-Monzón, F., Rödel, M.O., Jeschke, J.M., 2020. Tracking *Batrachochytrium dendrobatidis* infection across the globe. EcoHealth 17, 270–279.

Ceballos, G., Ehrlich, P.R., Barnosky, A.D., García, A., Pringle, R.M., Palmer, T.M., 2015. Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. Sci. Adv. 1, e1400253.

Clare, F.C., Halder, J.B., Daniel, O., Bielby, J., Semenov, M.A., Jombart, T., Loyau, A., Schmeller, D.S., Cunningham, A.A., Rowcliffe, M., Garner, T.W.J., Bosch, J., Fisher, M.C., 2016. Climate forcing of an emerging pathogenic fungus across a montane multihost community. Phil. Trans. Roy. Soc. B 371, 20150454.

Cox, N., Chanson, J., Stuart, S., 2006. The Status and Distribution of Reptiles and Amphibians of the Mediterranean Basin. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge.

Cusaac, J.P.W., Carter, E.D., Woodhams, D.C., Robert, J., Spatz, J.A., Howard, J.L., Lillard, C., Graham, A.W., Hill, R.D.,

Reinsch, S., McGinnity, D., Reeves, B., Bemis, D., Wilkes, R.P., Sutton, W.B., Waltzek, T.B., Hardman, R.H., Miller, D.L., Gray, M.J., 2021. Emerging pathogens and a current-use pesticide: potential impacts on eastern hellbenders. J. Aquat. An. Health 33, 24–32.

Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., 2000. Emerging infectious diseases of wildlife - Threats to biodiversity and human health. Science 287, 443-449.

Daversa, D.R., Monsalve-Carcaño, C., Carrascal, L.M., Bosch, J., 2018. Seasonal migrations, body temperature fluctuations, and infection dynamics in adult amphibians. PeerJ 6, e4698.

Davidson, C., Shaffer, H.B., Jennings, M.R., 2002. Spatial tests of the pesticide drift, habitat destruction, UV-B, and climate-change hypotheses for California amphibian declines. Cons. Biol. 16, 1588–1601.

Duffus, A.L.J., Waltzek, T.B., Stöhr, A.C., Allender, M.C., Gotesman, M., Whittington, R.J., Hick, P., Hines, M.K., Marschang, R.E., 2015. Distribution and host range of ranaviruses. In: Gray, M.J., Chinchar, V.G. (Eds.), Ranaviruses. Springer International Publishing, 9–57.

Faruk, A., Belabut, D., Ahmad, N., Knell, R.J., Garner, T.W.J., 2013. Effects of oil-palm plantations on diversity of tropical anurans. Cons. Biol. 27, 615-624.

Fellers, G.M., Green D.E., Longcore J.E., 2001. Oral chytridiomycosis in the mountain yellow legged frog (*Rana muscosa*). Copeia 4: 945–953.

Fernández-Beaskoetxea, S., Bosch, J., Bielby, J., 2016. Infection and transmission heterogeneity of a multi-host pathogen (*Batrachochytrium dendrobatidis*) within an amphibian community. Dis. Aquat. Organ. 118, 11–20.

Fernández-Beaskoetxea, S., Carrascal, L.M., Fernández-Loras, A., Fisher, M.C., Bosch, J., 2015. Short term minimum water temperatures determine levels of infection by the amphibian chytrid fungus in *Alytes obstetricans* tadpoles. PLoS ONE 10, e0120237.

Fernández-Loras, A., Boyero, L., Bosch, J., 2020. In-situ severe breeding habitat intervention only achieves temporary success in reducing *Batrachochytrium dendrobatidis* infection. Amphibia-Reptilia 41, 261-267.

Finlay, J.C., Vredenberg, V.T., 2007. Introduced trout sever trophic connections in watersheds: consequences for a declining amphibian. Ecology 88, 2187-2198.

Fisher, M.C., Garner, T.W.J., 2007. The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. Fungal Biol. Rev. 21, 2–9.

Fisher, M.C., Garner, T.W.J., Walker, S.F., 2009. Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. Ann. Rev. Microbiol. 63, 291–310.

Fisher, M.C., Ghosh, P., Shelton, J.M.G., Bates, K., Brookes, L., Wierzbicki, C., Rosa, G.M., Farrer R.A., Aanensen, D.M., Alvarado-Rybak, M., Bataille, A., Berger, L., Böll, S., Bosch, J., Clare, F.C., Courtois, E.A., Crottini, A., Cunningham, A.A., Doherty-Bone, T.M., Gebresenbet, F., Gower, D.J., Höglund, J., James, T.Y., Jenkinson, T.S., Kosch, T.A., Lambertini, C., Laurila, A., Lin, C., Loyau, A., Martel, A., Meurling, S., Miaud, C., Minting, P., Ndriantsoa, S., O'Hanlon, S.J., Pasmans, F., Rakotonanahary, T., Rabemananjara, F.C.E., Ribeiro, L.P., Schmeller, D.S., Schmidt, B.R., Skerratt, L., Smith, F., Soto-Azat, C., Tessa, G., Toledo, L.F., Valenzuela-Sánchez, A., Verster, R., Vörös, J., Waldman, B., Webb, R.J., Weldon, C., Wombwell, E., Zamudio, K.R., Longcore, J.E., Garner, T.W.J., 2018. Development and worldwide use of non-lethal, and minimal population-level impact, protocols for the isolation of amphibian chytrid fungi. Scient. Rep. 8, 7772. DOI:10.1038/s41598-018-24472-2.

Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L., Gurr, S.J, 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. Nature 484, 186-194.

Garner, T.W.J., Walker, S., Bosch, J., Leech, S., Rowcliffe, J.M., Cunningham, A.A., Fisher, M.C., 2009. Life history trade-offs influence mortality associated with the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. Oikos 118, 783-791.

Gray, M.J., Duffus, A.L.J., Haman, K.H., Harris, R.N., Allender, M.C., Thompson, T.A., Christman, M.R., Sacerdote-Velat, A., Sprague, L.A., Williams, J.M., Miller, D.L., 2017. Pathogen surveillance in herpetofaunal populations: guidance on study design, sample collection, biosecurity, and intervention strategies. Herp. Rev. 48, 334–351.

Green, D.E., Converse, K.A., Schrader, A.K., 2002. Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the USA, 1996-2001. Ann. New York Acad. Sci. 969, 323–339.

Hall, E.M., Crespi, E.J., Goldberg, C.S., Brunner, J.L., 2015. Evaluating environmental DNA-based quantification of ranavirus infection in wood frog populations. Mol. Ecol. Res. 16, 423–433.

Harmos, K., Bosch, J., Thumsová, B., Martínez-Silvestre, A., Velarde, R., Vörös, J., 2021. Evidence of amphibian mortality caused by chytridiomycosis in Central Europe. Herp. Notes 12, 1213-1218.

Hua, J., Wuerthner, V.P., Jones, D.K., Mattes, B., Cothran, R.D., Relyea, R.A., Hoverman, J.T., 2017. Evolved pesticide tolerance influences susceptibility to parasites in amphibians. Evol. Applic. 10, 802–812.

Hughes, A.C., Marshall, B.M., Strine, C.T., 2021. Gaps in global wildlife trade monitoring leave amphibians vulnerable. eLife 10, e70086.

Hyatt, A.D., Boyle, D.G., Olsen, V., Boyle, D.B., Berger, L., Obendorf, D., *et al.* 2007. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis.* Dis. Aquat. Organ. 73, 175–92.

Johnson, P.T.J., Mckenzie, V.J., Peterson, A.C., Kerby, J.L., Brown, J., Blaustein, A.R., Jackson, T., 2011. Regional Decline of an Iconic Amphibian Associated with Elevation, Land-Use Change , and Invasive Species. Cons. Biol. 25, 556–566.

Knapp, R.A., Fellers, G.M., Kleeman, P.M., Miller, D.A.W., Vredenburg, V.T., Bree, E., Briggs, C.J., 2016. Large-scale recovery of an endangered amphibian despite ongoing exposure to multiple stressors. Proc. Nat. Acad. Sci. United States of America 113, 11889-11894.

Kriger, K.M., Hines, H.B., Hyatt, A.D., Boyle, D.G., Hero, J.M., 2006. Techniques for detecting chytridiomycosis in wild frogs: comparing histology with real-time Taqman PCR. Dis. Aquat. Organ. 71, 141-148.

Lambert, M.R., Womack, M.C., Byrne, A.Q., Hernández-Gómez, O., Noss, C.F., Rothstein, A.P., Blackburn, D.C., Collins, J.P., Crump, M.L., Koo, M.S., Nanjappa, P., Rollins-Smith, L., Vredenburg, V.T., Rosenblum, E.B., 2020. Comment on "Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity". Science 367, eaay1838.

Leung, W.T.M., Thomas-Walters, L., Garner, T.W.J., Balloux, F., Durrant, C., Price, S.J., 2017. A quantitative-PCR based me-

thod to estimate ranavirus viral load following normalisation by reference to an ultraconserved vertebrate target. J. Vir. Meth. 249, 147–155.

Lips, K.R., 2016. Overview of chytrid emergence and impacts on amphibians. Phil. Trans. Royal Soc. B 371, 20150465.

Lips, K.R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J.D., Alford, R.A., Voyles, J., Carey, C., Livo, L., Pessier, A.P., Collins, J.P., 2006. Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. Proc. Nat. Acad. Sci. United States of America 103, 3165–3170.

Lips, K.R., Diffendorfer, J., Mendelson, J.R., Sears, M.W., 2008. Riding the wave: Reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. PLoS Biol. 6, 0441–0454.

López-López, P., Maiorano, L., Falcucci, A., Barba, E., Boitani, L., 2011. Hotspots of species richness, threat and endemism for terrestrial vertebrates in SW Europe. Acta Oecol. 37, 399–412.

Martel, A., Blooi, M., Adriaensen, C., Van Rooij, P., Beukema, W., Fisher, M.C., Farrer, R.A., Schmidt, B.R., Tobler, U., Goka, K., Lips, K.R., Muletz, C., Zamudio, K., Bosch, J., Lötters, S., Wombwell, E., Garner, T.W.J., Spitzen-van der Sluijs, A., Salvidio, S., Ducatelle, R., Nishikawa, K., Nguyen, T.T., Van Bocxlaer, I., Bossuyt, F., Pasmans, F., 2014. Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. Science 346, 630-631.

Martel, A., Spitzen-Van Der Sluijs, A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M.C., Woeltjes, A., Bosman, W., Chiers, K., Bossuyt, F., Pasmans, F., 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. Proc. Nat. Acad. Sci. United States of America 110, 15325-15329.

Martel, A., Vila-Escale, M., Fernández-Guiberteau, D., Martínez-Silvestre, A., Canessa, S., Van Praet, S., Pannon, P., Chiers, K., Ferran, A., Kelly, M., Picart, M., Piulats, D., Li, Z., Pagone, V., Pérez-Sorribes, L., Molina, C., Tarragó-Guarro, A., Velarde-Nieto, R., Carbonell, F., Obón, E., Martínez-Martínez, D., Guinart, D., Casanovas, R., Carranza, S., Pasmans, F., 2020. Integral chain management of wildlife diseases. Conservation Letters 13, 1-6.

McMenamin, S.K., Hadly, E.A., Wright, C.K., 2008. Climatic change and wetland desiccation cause amphibian decline in Yellowstone National Park. Proc. Nat. Acad. Sci. United States of America 105, 16988-16993.

Medina, D., Garner, T.W.J., Carrascal, L.M., Bosch, J., 2015. Delayed metamorphosis of amphibian larvae facilitates *Batrachochytrium dendrobatidis* transmission and persistence. Dis. Aquat. Organ. 117, 85-92.

Miller, D., Pessier, A., Hick, P., Whittington, J.K., 2015. Comparative Pathology of Ranaviruses and Diagnostic Techniques. 171-208. In: Gray, M.J., Chinchar, V.G. (eds.), Ranaviruses. Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates. Springer Open.

Mörner, T., Obendorf, D.L., Artois, M., Woodford, M.H., 2002. Surveillance monitoring of wildlife diseases. OIE Rev. Scient. Tech. 21, 67-76.

Murray, K., Retallick, R., McDonald, K.R., Mendez, D., Aplin, K., Kirkpatrick, P., Berger, L., Hunter, D., Hines, H.B., Campbell, R., Pauza, M., Driessen, M., Speare, R., Richards, S.J., Mahony, M., Freeman, A., Phillott, A.D., Hero, J.-M., Driscoll, D., Puschendorf, R., Skerratt, L.F., 2010. The distribution and host range of the pandemic disease chytridiomycosis in Australia spanning surveys from 1956 to 2007. Ecology 91, 1557.

Navarro-Lozano, A., Sánchez-Domene, D., Rossa-Feres, D.C., Bosch, J., Sawaya, R.J., 2018. Are oral deformities in tadpoles accurate indicators of anuran chytridiomycosis? PLoS ONE 13, e0190955.

O'Hanlon, S.J., Rieux, A., Farrer, R.A., Rosa, G.M., Waldman, B., Bataille, A., Kosch, T.A., Murray, K., Brankovics, B., Fumagalli, M., Martin, M.D., Wales, N., Alvarado-Rybak, M., Bates, K.A., Berger, L., Böll, S., Brookes, L., Clare, F.C., Courtois, E.A., Cunningham, A.A., Doherty-Bone, T.M., Ghosh, P., Gower, D.J., Hintz, W.E., Höglund, J., Jenkinson, T.S., Lin, C.F., Laurila, A., Loyau, A., Martel, A., Meurling, S., Miaud, C., Minting, P., Pasmans, F., Schmeller, D., Schmidt, B.R., Shelton, J.M.G., Skerratt, L.F., Smith, F., Soto-Azat, C., Spagnoletti, M., Tessa, G., Toledo, L.F., Valenzuela-Sánchez, A., Verster, R., Vörös, J., Webb, R.J., Wierzbicki, C., Wombwell, E., Zamudio, K.R., Aanensen, D.M., James, T.Y., Gilbert, M.T.P., Weldon, C., Bosch, J., Balloux, F., Garner, T.W.J., Fisher, M.C., 2018. Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. Science 360, 621–627.

Olson, D.H., Aanensen, D.M., Ronnenberg, K.L., Powell, C.I., Walker, S.F., Bielby, J., Garner, T.W.J., Weaver, G., Fisher, M.C., 2013. Mapping the global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the amphibian chytrid fungus. PLoS ONE 8, e56802.

Pearman, P.B., Garner, T.W.J., 2005. Susceptibility of Italian agile frog populations to an emerging strain of *Ranavirus* parallels population genetic diversity. Ecol. Lett. 8, 401-408.

Pessier, A., 2007. Cytologic diagnosis of disease in amphibians. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice, 10, 187-206.

Pessier, A.P., Pinkerton, M., 2003. Practical gross necropsy of amphibians. Sem. Avian Exotic Pet Med., 12, 81-88.

Phillips, B.L., Puschendorf, R., 2013. Do pathogens become more virulent as they spread? Evidence from the amphibian declines in Central America. Proc. Royal Soc. B: Biol. Sci. 280, 20131290.

Phillott, A.D., Speare, R., Hines, H.B., Skerratt, L.F., Meyer, E., McDonald, K.R., Cashins, S.D., Mendez, D., Berger, L., 2010. Minimising exposure of amphibians to pathogens during field studies. Dis. Aquat. Organ. 92, 175–185.

Piotrowski, J.S., Annis, S.L., Longcore, J.E., 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. Mycologia 96, 9-15.

Price, S.J., Ariel, E., Maclaine, A., Rosa, G.M., Gray, M.J., Brunner, J.L., Garner, T.W.J., 2017. From fish to frogs and beyond: Impact and host range of emergent ranaviruses. Virology 511, 272-279.

Price, S.J., Garner, T.W.J., Nichols, R.A., Balloux, F., Ayres, C., Mora-Cabello de Alba, A., Bosch, J., 2014. Collapse of amphibian communities due to an introduced ranavirus. Curr. Biol. 24, 2586-2591.

Price, S.J., Leung, W.T.M., Owen, C.J., Puschendorf, R., Sergeant, C., Cunningham, A.A., Balloux, F., Garner, T.W.J., Nichols, R.A., 2019. Effects of historic and projected climate change on the range and impacts of an emerging wildlife disease. Global Ch. Biol. 25, 2648–2660.

Rollins-Smith, L.A., 2020. Global amphibian declines, disease, and the ongoing battle between *Batrachochytrium* fungi and the immune system. Herpetologica 76, 178-188.

Rosa, G.M., Sabino-Pinto, J., Laurentino, T.G., Martel, A., Pasmans, F., Rebelo, R., Griffiths, R.A., Stöhr, A.C., Marschang, R.E., Price S.J., Garner, T.W.J., Bosch, J., 2017. Impact of asynchronous emergence of two lethal pathogens on amphibian assemblages. Scient. Rep. 7, 43260.

Saucedo, B., Rijks, J., Spitzen-Van Der Sluijs, A., Wilkie, G., Hughes, J., Van Asten, A., Van den Broek, J., Kik, M., Van Beurden, S., Gröne, A., 2016. Ranaviruses in wild amphibians in the Netherlands: the 2015 update. Conference of the European Wildlife Disease Association 12, 187-188.

Scheele, B.C., Pasmans, F., Skerratt, L.F., Berger, L., Martel, A., Beukema, W., Acevedo, A.A., Burrowes, P.A., Carvalho, T., Catenazzi, A., De la Riva, I., Fisher, M.C., Flechas, S.V., Foster, C.N., Frías- Álvarez, P., Garner, T.W.J., Gratwicke, B., Guayasamin, J.M., Hirschfeld, M., Kolby, J.E., Kosch, T.A., La Marca, E., Lindenmayer, D.B., Lips, K.R., Longo, A.V., Maneyro, R., McDonald, C.A., Mendelson III, J., Palacios-Rodriguez, P., Parra-Olea, G., Richards-Zawacki, C. L., Rödel, M.O., Rovito, S.M., Soto-Azat, C., Toledo, L.F., Voyles, J., Weldon, C., Whitfield, S.M., Wilkinson, M., Zamudio, K.R., Canessa, S., 2019. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. Science 363, 1459–1463.

Scheele, B.C., Skerratt, L.F., Grogan, L.F., Hunter, D.A., Clemann, N., McFadden, M., Newell, D., Hoskin, C.J., Gillespie, G.R., Heard, G.W., Brannelly, L., Roberts, A.A., Berger, L., 2017. After the epidemic: Ongoing declines, stabilizations and recoveries in amphibians afflicted by chytridiomycosis. Biol. Cons. 206, 37–46.

Schloegel, L.M., Daszak, P., Cunningham, A.A., Speare, R., Hill, B., 2010. Two amphibian diseases, chytridiomycosis and ranaviral disease, are now globally notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE): an assessment. Dis. Aquat. Organ. 92, 101-108.

Skerratt, L.F., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., McDonald, K.R., Phillott, A.D., Hines, H.B., Kenyon, N., 2007. Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. EcoHealth 4, 125–134.

Solís, R., Lobos, G., Walker, S.F., Fisher, M.C., Bosch. J., 2010. Presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in feral populations of *Xenopus laevis* in Chile. Biol. Inv. 12, 1641-1646.

Spitzen-van der Sluijs, A., Stark, T., DeJean, T., Verbrugghe, E., Herder, J., Gilbert, M., Janse, J., Martel, A., Pasmans, F., Valentini, A., 2020. Using environmental DNA for detection of *Batrachochytrium salamandrivorans* in natural water. Environ. DNA 2, 565–571.

Stegen, G., Pasmans, F., Schmidt, B.R., Rouffaer, L.O., Van Praet, S., Schaub, M., Canessa, S., Laudelout, A., Kinet, T., Adriaensen, C., Haesebrouck, F., Bert, W., Bossuyt, F., Martel, A., 2017. Drivers of salamander extirpation mediated by *Batrachochytrium salamandrivorans*. Nature 544, 353-356.

Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L., Waller, R.W., 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. Science 306, 1783-1786.

Stuart, S.N., Hoffmann, M., Chanson, J.S., Cox, N.A., Berridge, R.J., Ramani, P., Young, B.E. (eds.), 2008. Threatened Amphibians of the World. Lynx Edicions, Barcelona.

Thomas, V., Blooi, M., Van Rooij, P., Van Praet, S., Verbrugghe, E., Grassell, E., Lukac, M., Smith, S., Pasmans, F., Martel, A., 2017. Recommendations on diagnostic tools for Batrachochytrium salamandrivorans. Transb. Emerg. Dis. 66, e478-e488.

Valenzuela-Sánchez, A., O'Hanlon, S.J., Alvarado-Rybak, M., Uribe-Rivera, D.E., Cunningham, A.A., Fisher, M.C., Soto-Azat, C., 2018. Genomic epidemiology of the emerging pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* from native and invasive amphibian species in Chile. Transb. Emerg. Dis. 65, 309–314.

Van Rooij, P., Martel, A., Haesebrouck, F., Pasmans, F., 2015. Amphibian chytridiomycosis: A review with focus on fungus-host interactions. Vet. Res. 46, 1–22.

von Essen, M., Leung, W.T.M., Bosch, J., Pooley, S., Ayres, C., Price, S.J., 2020. High pathogen prevalence in an amphibian and reptile assemblage at a site with risk factors for dispersal in Galicia, Spain. PLoS ONE 15, e0236803.

Vredenburg, V.T., Knapp, R.A., Tunstall, T.S., Briggs, C.J., 2010. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. Proc. Nat. Acad. Sci. United States of America 107, 9689–9694.

Walker, S.F., Baldi, M., Jenkins, D., Garner, T.W.J., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., Bosch, J., Fisher, M.C., 2007. Environmental detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in a temperate climate. Dis. Aquat. Organ. 77, 105-112.

Weldon, C., Du Preez. L.H., Hyatt, A.D., Muller, R., Speare, R., 2004. Origin of the amphibian chytrid fungus. Emerg. Infect. Dis. 10, 2100–2105.

Munibe Monographs. Nature Series • 5 (2023) • 31-47 • Donostia-San Sebastián • ISSN 2340-0463 - eISSN 2340-3055

Monitorización de las comunidades de anfibios mediante *metabarcoding* de ADN ambiental

Monitoring of amphibian communities throughout environmental DNA metabarcoding

Amaia Caro[1,2], Ibai Ugarte-Zabaleta[1,2], Julen Vázquez-Sanz[1,2], Aitor Albaina[3,4], María José Madeira[1,2], Benjamín Juan Gómez-Moliner[1,2]

[1] Departamento de Zoología y Biología Celular Animal, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco, UPV/EHU. Paseo de la Universidad, 7. 01006 Vitoria-Gasteiz. Araba.

[2] Biodiversity Research Group, CIEA Lucio Lascaray. Avda. Miguel de Unamuno, 3. 01006 Vitoria-Gasteiz. Araba. Correspondencia: ibaiugarte7@gmail.com

[3] Departamento de Zoología y Biología Celular Animal, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco, UPV/EHU. Barrio Sarriena, s/n. 48940 Leioa. Bizkaia.

[4] Centro de Estudios Ambientales (CEA), Ayuntamiento de Vitoria-Gasteiz. Pintor Teodoro Dublang, 25. 01008 Vitoria-Gasteiz. Araba.

RESUMEN

Las metodologías de ADN ambiental o eDNA permiten la detección del ADN presente en el ambiente y posibilitan la identificación y clasificación de las especies presentes en el medio sin necesidad de avistarlas ni capturarlas. De esta forma, permiten trabajar con especies poco abundantes, esquivas y/o en peligro de extinción de una manera eficaz, segura y no invasiva. Por ello, se muestran como una opción muy prometedora para el estudio y monitoreo de las comunidades de anfibios, ya que la probabilidad de detección de algunas especies mediante métodos tradicionales de muestreo puede ser baja y varía dependiendo de las condiciones ambientales. Sin embargo, la técnica aún plantea varios retos, siendo esencial optimizar los procedimientos y ajustarlos a cada tipo de estudio y objetivos perseguidos. Aquí, se presentan los resultados preliminares de la puesta a punto de una metodología *metabarcoding* basada en el análisis de eDNA para monitorizar las comunidades de anfibios en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV). El protocolo de muestreo diseñado y la metodología *metabarcoding* propuesta, basada en una región del gen 12S mitocondrial, se ha empleado en 60 masas de agua de Álava y dos de Navarra. El *locus* seleccionado ha mostrado ser adecuado para distinguir las especies de anfibios presentes en el área de estudio. Además, se han obtenido resultados para 38 humedales, mostrando que la metodología tiene potencial para la detección de anfibios y permitiendo identificar los procedimientos a mejorar para optimizar la metodología. Se demuestra, por tanto, que los estudios de eDNA son una metodología prometedora para la monitorización de las comunidades de anfibios.

PALABRAS CLAVE: 12S, anfibios, eDNA, *metabarcoding*, Vitoria-Gasteiz.

ABSTRACT

Environmental DNA or eDNA methodologies allow the detection of DNA present in the environment and enable the identification and classification of the species present in the environment without the need to sight or capture them. In this way, they allow working with scarce, elusive and/or endangered species in an effective, safe and non-invasive way. Therefore, they could be a very promising option for the study and monitoring of amphibian communities, since their detection probability for some species by traditional sampling methods is often low and varies depending on environmental conditions. However, the technique still poses several challenges, and it is essential to optimize procedures and adjust them to each type of study and the objectives pursued. Here the preliminary results of the fine-tuning of a *metabarcoding* methodology based on eDNA analysis to monitor amphibian communities in the Basque Country are presented. The sampling protocol designed and the proposed *metabarcoding* methodology, based on a region of the mitochondrial 12S gene, has been used in 60 ponds of Araba and in two of Nafarroa. The selected locus has been shown to be suitable for distinguishing amphibian species from the study area. In addition, results have been obtained for 38 ponds, showing that the methodology is has potential for amphibian detection and allowing the identification of the procedures to be improved in order to optimize the methodology. It is therefore demonstrated that eDNA studies are a promising methodology for monitoring amphibian communities.

KEY WORDS: 12S, amphibians, eDNA, *metabarcoding*, Vitoria-Gasteiz.

https://doi.org/10.21630/mmns.2023.5.03

(cc) BY-NC-ND

LABURPENA

Ingurumen DNA edo eDNA metodologiei esker, ingurunean dagoen DNA detekta daiteke, eta bertan dauden espezieak identifikatu eta sailkatu daitezke, ikusi edo harrapatzeko beharrik gabe. Horrela, aukera ematen dute espezie ez oso ugari, iheskor eta/edo galzorian daudenekin modu eraginkor, seguru eta ez inbaditzailean lan egiteko. Izan ere, espezie batzuetan ohiko laginketa-metodoen bidez hautemateko probabilitatea txikia izaten da eta ingurumen-baldintzen araberakoa. Horregatik, oso aukera egokia da anfibioen komunitateak aztertzeko eta monitorizatzeko; hainbat erronka izan arren. Hori dela eta, prozedurak optimizatu eta helburu bakoitzari egokitzea beharrezkoa da. Hemen aurkezten dira Euskal Autonomi Erkidegoko (EAEko) anfibio-komunitateak monitorizatzeko eDNAren analisian oinarritutako *metabarcoding* metodologia baten doikuntzaren emaitzak. Diseinatutako laginketa-protokoloa eta proposatutako *metabarcoding*-metodologia, 12S gene mitokondrialaren eskualde batean oinarritua, Arabako 60 ur-masatan eta Nafarroako bitan erabili dira. Hautatutako locusak azterketa eremuko anfibio espezieak bereizteko egokia dela erakutsi du. Gainera, 38 ur-maseterako emaitzak lortu dira, anfibioak detektatzeko metodologia eraginkorra izan daitekeela baieztatuz, eta metodologia optimizatzeko hobetu beharreko prozedurak identifikatzeko aukera emanez. Beraz, eDNA azterketak anfibioen komunitateak monitorizatzeko etorkizun handiko metodologia direla frogatzen da.

GAKO-HITZAK: 12S, anfibioak, eDNA, *metabarcoding*, Vitoria-Gasteiz.

INTRODUCCIÓN

El ADN ambiental o eDNA (del inglés: *environmental* DNA) se refiere al material genético presente en muestras ambientales como sedimento, agua, aire y excrementos, incluyendo células enteras, ADN extracelular e incluso organismos enteros (Ficetola *et al*., 2008; Barnes y Turner, 2015; Taberlet *et al*., 2018). Recientes avances en las técnicas moleculares han proporcionado nuevas herramientas que permiten capturar, extraer, amplificar y secuenciar el eDNA, de forma que con la información obtenida es posible detectar y clasificar las especies presentes en el medio de donde se ha extraído la muestra. Así, a pesar de ser un método de prospección relativamente nuevo, el eDNA ya ha demostrado tener un enorme potencial para el monitoreo biológico, pudiéndose emplear como base para una amplia gama de estudios como inventarios taxonómicos (Ficetola *et al*., 2008; Olds *et al*., 2016; Fraija-Fernández *et al*., 2020; Cornman *et al*, 2021), evaluaciones de distribución de las especies (Fraija-Fernández *et al*., 2020), estudios de dieta (Deagle *et al*, 2009, Albaina *et al*. 2016; Jakubavičiūtė *et al*., 2017) o para monitorización de especies (Thomsen *et al*, 2012; Bohmann *et al*, 2014; Biggs *et al*, 2014; Thomsen y Willersley, 2015; Valentini *et al*, 2016) entre otras muchas aplicaciones.

Se distinguen dos métodos principales de eDNA en función de si se identifica una o varias especies simultáneamente. El eDNA *barcoding* (o *single-species* eDNA) tiene un enfoque específico en el que el objetivo es la identificación de una única especie. En cambio, el eDNA *metabarcoding* tiene un enfoque multiespecífico donde se identifica un conjunto de especies mediante la secuenciación masiva de un fragmento o fragmentos concretos de ADN (*barcodes*) para todos los organismos de un determinado grupo taxonómico dentro de una muestra (de aquí en adelante *metabarcoding*). Así, este enfoque puede ser de muy amplio espectro o más específico; es decir, puede realizarse la identificación de especies pertenecientes a categorías taxonómicas más o menos inclusivas. En cambio, tiene un enfoque multiespecífico mediante la secuenciación masiva de un fragmento o fragmentos concretos de ADN (*barcodes*), por la que se identifica un conjunto de especies.

El uso de eDNA ofrece la ventaja de ser no invasivo y, además, reduce el riesgo de dispersión secundaria e involuntaria de enfermedades y especies invasoras. Otra ventaja de estos métodos es que la recogida de muestras necesarias para el análisis suele ser técnicamente más sencilla y rápida que la recogida de datos bióticos tradicionales (Ficetola *et al*., 2008; Thomsen *et al*., 2012), lo cual permite que los muestreos puedan llevarse a cabo por personas no profesionales (Biggs *et al*., 2014). Además, se ha demostrado que bajo determinadas circunstancias los métodos de eDNA tienen una mayor capacidad de detección y rentabilidad en comparación con los métodos tradicionales de muestreo (por ejemplo, Dejean *et al*. 2012; Biggs *et al*., 2014). Estas características suponen que mediante estas técnicas se pueda trabajar con especies poco abundantes, esquivas y/o en peligro de extinción con una mayor eficacia (Bohmann *et al*., 2014) y, como se evita la manipulación de los ejemplares, de forma más segura.

Sin embargo, los métodos de eDNA se encuentran todavía en desarrollo y la metodología aun plantea varios retos. Cada paso de la metodología requiere consideraciones críticas antes de su aplicación y tiene numerosas variables que pueden influir en el resultado. Las concentraciones altamente variables de eDNA y su potencial heterogeneidad a través del medio hacen que sea necesario el desarrollo de una estrategia de muestreo adecuada que permita aumentar al máximo posible la captación de ADN del objeto de estudio (Carew *et al*., 2013; Goldberg *et al*., 2016; Deiner *et al*., 2017). El método de extracción de ADN empleado también puede afectar a los resultados (Deiner *et al*., 2015; Hinlo *et al*., 2017), así como el marcador molecular (o *barcode*) seleccionado y el rendimiento de la PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) (Thomsen *et al*., 2012; Miya *et al*., 2015; Deiner *et al*., 2015; Bylemans *et al*., 2018). Además, es imprescindible disponer de bases de datos de secuencias de referencia completas de cada uno de los *barcodes* seleccionados para poder identificar las secuencias obtenidas (Schenekar *et al*., 2020). Por tanto, resulta esencial para cada nueva aplicación optimizar los procedimientos, idealmente con un estudio piloto, para asegurar que el diseño es apropiado para detectar el taxón o los taxones en estudio.

El grupo de los anfibios es uno de los taxones más amenazados a nivel mundial y ha experimentado un gran declive global en sus poblaciones. Los métodos convencionales para el muestreo de anfibios incluyen la detección

visual, la escucha de cantos y la captura de individuos. Estas técnicas convencionales requieren visitar el área de estudio múltiples veces para evitar factores que pueden condicionar la detección, tales como las condiciones ambientales locales (Tanadini y Schmidt, 2011) y los hábitos discretos de algunas especies de anfibios (Booker, 2016). A todo esto, debemos añadir que el DNA ambiental permite discriminar entre la ausencia y presencia de especies en muestras de agua, incluso en densidades pequeñas de individuos (Ficetola *et al*., 2008), y que la marca molecular de las especies puede perdurar en el medio. Se conocen casos de secuencias de DNA de animales y plantas que han durado hasta 300.000 años en sedimentos antiguos de permafrost (Hofreiter *et al*., 2003). Por todo ello, el uso de técnicas de eDNA puede ser especialmente beneficioso para el estudio y monitorización de anfibios, especialmente en aquellas especies que, debido a su rareza y comportamiento, son difíciles de detectar mediante técnicas convencionales.

Han sido muchos los estudios de eDNA enfocados en la detección de anfibios que han mostrado que se trata de una metodología adecuada para el grupo (Booker *et al*., 2016; Pilliod *et al*., 2014; Tanadini y Schmidt, 2011). Sin embargo, en función de las especies objetivo y la tipología de masas de agua a muestrear, la aplicación de esta metodología para el grupo requiere de una minuciosa puesta a punto optimizada para objetivos específicos. Así, el objetivo de este estudio es llevar a cabo la puesta a punto de una metodología *metabarcoding* basada en el análisis de eDNA recogido en muestras de agua para monitorizar las comunidades de anfibios en humedales de distinta tipología de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV). Aquí se presentan los resultados preliminares del procedimiento diseñado, protocolo que se espera sirva de ayuda en la conservación y gestión de este grupo taxonómico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Base de datos de referencia del locus seleccionado

Cuando se pone en marcha cualquier estudio de eDNA, es muy importante contar con una base de datos representativa del *barcode* elegido para las especies objeto del estudio, con el fin de: (i) determinar si el marcador seleccionado es suficientemente polimórfico para distinguir las diferentes especies y (ii) tener una base de datos de referencia sobre la que comparar las secuencias de ADN obtenidas en las muestras analizadas. Para este proyecto se ha seleccionado un fragmento de 48-55 pb del gen mitocondrial 12S, utilizado previamente con éxito en el seguimiento de anfibios (Valentini *et al*., 2016). Para construir la base de datos de referencia se obtuvo de la bibliografía, en primer lugar, la matriz de secuencias obtenidas por Valentini *et al*. (2016) para este fragmento en concreto. Con el fin de lograr una mayor resolución taxonómica, también se analizaron para este marcador molecular 56 muestras de tejido de 16 especies de anfibios de la península ibérica, provenientes de las colecciones del Instituto Alavés de la Naturaleza (IAN), la Sociedad de Ciencias Aranzadi (SCA), el Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN) y el Departamento de Zoología y Biología Celular Animal de la Universidad del País Vasco (Tabla 1). La extracción de ADN de los tejidos se realizó mediante el kit comercial *DNeasy Tissue* de Qiagen®. Después, se utilizaron los *primers* 12SAL [5'-AAACTGGGATTAGATACCCCACTAT-3' (Palumbi *et al*., 1991)] y 16SR3 [5'-TTTCATCTTTCCCTTGCGGTAC-3' (Vences *et al*., 2003)] para amplificar un fragmento de 655-986 pb que contenía el fragmento de la región 12S seleccionada. Tras la amplificación, la secuenciación de los productos de la PCR fue realizada por Macrogen (Madrid). La edición de las secuencias se realizó con el programa Geneious 5.1.7 (Kearse *et al*., 2012). Para aquellas especies citadas en el área de estudio no representadas en la base de datos de Valentini *et al*. (2016) y de las que no se pudo obtener ninguna secuencia útil de las muestras de tejido, se realizó una búsqueda de secuencias del marcador molecular seleccionado en la base de datos pública GenBank, y las secuencias encontradas fueron añadidas a la matriz de referencia.

Protocolo de muestreo de las muestras ambientales

En los sistemas lénticos, el eDNA muestra una distribución parcheada (Ross, 2013). Esto se debe tanto a una presencia desigual de cada especie en el medio como a que la dispersión del eDNA se ve limitada horizontalmente por barreras físicas y verticalmente por una estratificación química de la columna de agua (Murakami *et al*., 2019). Así pues, a la hora de diseñar la estrategia de recogida de las muestras ambientales en masas de agua lénticas es necesario tener en cuenta estas características, para lograr que las muestras sean representativas de la comunidad de organismos que habitan en ellas y que son el objeto de estudio.

En este proyecto, las masas de agua se categorizaron en cuatro tipos en función del tamaño (diámetro): Tipo 1 < 20 m, Tipo 2 entre 20-50 m, Tipo 3 entre 50-80 m y Tipo 4 > 80 m (Figura 1), recogiendo 1, 2, 3 y 4 submuestras, respectivamente. Cada submuestra consistió en 250 ml de agua, recogidos mediante varias muestras de menor volumen tomadas en distintos puntos, hasta alcanzar el volumen final. De esta forma, la periferia de la masa de agua quedaba muestreada en su totalidad. Para evitar posibles contaminaciones (que representan uno de los factores críticos en los trabajos con eDNA), se empleó un kit de recogida individualizado diseñado en este trabajo para la recolección de cada una de las submuestras y se descontaminó cualquier material (pinzas y botas) que hubiera entrado en contacto con el agua, con lejía diluida al 50% entre masas de agua. Cada uno de los kits de recolección se contenía dentro de una bolsa zip hermética y constaba de: (1) un bote de plástico auto-clavado de 250 ml, (2) un bote de plástico auto-clavado de 50 ml, (3) un par de guantes de látex sin polvo, (4) una ficha de campo dentro de una bolsa zip y (5) papel de secado.

Una vez recogidas las muestras de agua, éstas se depositaron en la nevera de campo para conservarlas en frío hasta realizar el filtrado, el cual se hizo dentro de las 24 horas siguientes a su recolección. El filtrado se llevó a cabo usando los filtros desechables Nalgene™ con membrana

Especie	Código	Localidad	Provincia	Colección	Secuencia
S. salamandra	Ssal-01	PN Valderejo	Araba	SCA	-
	Ssal-02	Lekunberri	Nafarroa	SCA	Si
	Ssal-03	Artikutza (Goizueta)	Nafarroa	SCA	Si
	Ssal-04	Encharcamientos Unguino	Araba	IAN	Si
L. helveticus	Lhel-01	Oiartzun	Gipuzkoa	SCA	Si
	Lhel-02	Badostáin	Nafarroa	SCA	Si
	Lhel-03	Altube	Araba	IAN	Si
T. marmoratus	Tmar-01	PN Valderejo	Araba	SCA	-
	Tmar-02	Sierra Andía	Nafarroa	SCA	Si
	Tmar-03	Arguedas	Nafarroa	SCA	Si
	Tmar-04	--	Araba	IAN	Si
I. alpestris	Ialp-01	Sierra Andía	Nafarroa	SCA	-
	Ialp-02	Sierra Sálvada	Araba	SCA	-
	Ialp-03	Encharcamientos Unguino	Araba	IAN	-
D. galganoi	Dgal-01	Fontecha	Araba	MNCN	-
	Dgal-02	Fontecha	Araba	SCA	-
	Dgal-03	Pechón	Cantabria	MNCN	-
	Dgal-04	Fuentes de Valdepero	Palencia	MNCN	-
	Dgal-05	Puentelarra	Araba	EHU	-
	Dgal-06	Puentelarra	Araba	EHU	-
	Dgal-07	Puentelarra	Araba	EHU	-
A. obstetricans	Aobs-01	Pamplona	Nafarroa	SCA	Si
	Aobs-02	--	Araba	IAN	-
	Aobs-03	Heredia	Araba	IAN	-
P. punctatus	Ppun-01	Sierra Sálvada	Araba	SCA	Si
	Ppun-02	Herramélluri	La Rioja	SCA	Si
P. cultripes	Pcul-01	Lacorzana	Araba	SCA	Si
	Pcul-02	Sesma	Nafarroa	SCA	Si
E. calamita	Ecal-01	Lapuebla de Labarca	Araba	SCA	Si
	Ecal-02	Fustiñana	Nafarroa	SCA	Si
	Ecal-03	Herramélluri	La Rioja	SCA	Si
	Ecal-04	Buruaga	Araba	IAN	Si
	Ecal-05	Txingudi	Gipuzkoa	EHU	-
	Ecal-06	Txingudi	Gipuzkoa	EHU	Si
B. spinosus	Bspi-01	Oiartzun	Gipuzkoa	SCA	Si
	Bspi-02	Irún	Gipuzkoa	SCA	Si
	Bspi-03	Ordoñana	Araba	IAN	Si
	Bspi-04	Luzuriaga	Araba	IAN	Si
	Bspi-05	Irún	Gipuzkoa	EHU	Si
	Bspi-06	Irún	Gipuzkoa	EHU	Si
H. molleri	Hmol-01	Valgañón	La Rioja	SCA	Si
	Hmol-02	PN Valderejo	Araba	SCA	Si
	Hmol-03	Sierra Lóquiz	Nafarroa	SCA	-
R. temporaria	Rtem-01	Lekunberri	Nafarroa	SCA	Si
	Rtem-02	Lizaso	Nafarroa	SCA	Si
	Rtem-03	Orio	Gipuzkoa	SCA	Si
	Rtem-04	Lizaso	Nafarroa	EHU	Si
R. dalmatina	Rdal-01	Amurrio	Araba	SCA	Si
	Rdal-02	Gorbea	Araba	SCA	Si
	Rdal-03	Berberana	Burgos	SCA	-

Especie	Código	Localidad	Provincia	Colección	Secuencia
P. perezi	Pper-01	Pamplona	Nafarroa	SCA	-
	Pper-02	Bikuña	Araba	IAN	-
R. iberica	Ribe-01	Monsagro	Salamanca	EHU	Si
	Ribe-02	Monsagro	Salamanca	EHU	Si
R. pyrenaica	Rpyr-01	--	Aragón	EHU	Si
	Rpyr-02	--	Aragón	EHU	Si

Tabla 1. - Muestras de tejido de anfibios de la península ibérica agrupadas por especies empleadas para la construcción de la base de datos de secuencias de ADN del *locus* 12S seleccionado para este estudio, indicando el éxito de secuenciación.

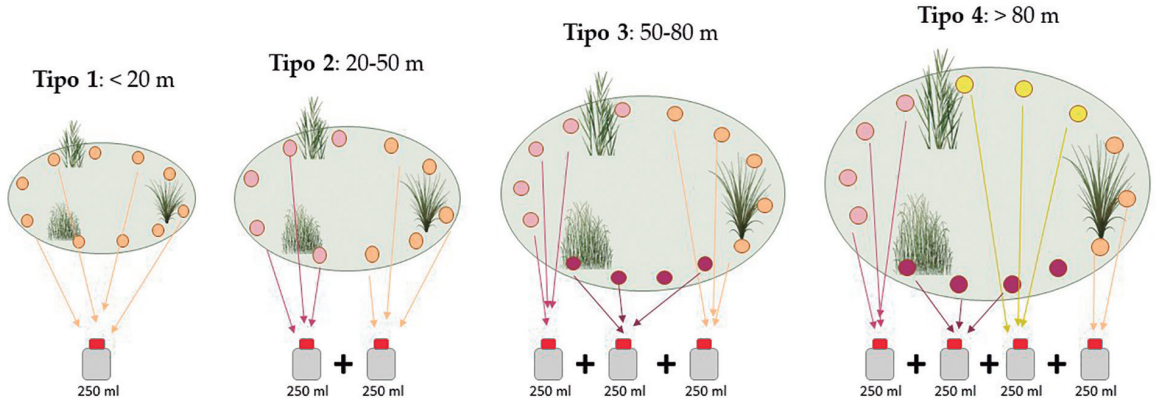

Fig. 1. - Tipos de masas de agua en función del tamaño (diámetro) y submuestras recogidas en cada categoría.

de nitrato de celulosa, con poros de 0,45 µm de diámetro y utilizando una bomba de vacío eléctrica. Tras desechar el agua filtrada, los filtros de celulosa se retiraron utilizando pinzas esterilizadas al fuego y se guardaron individualizados en botes de 5 ml que se conservaron congeladas a -80 °C hasta la posterior extracción del ADN.

Para algunas de las masas de agua se recogieron también muestras de sedimento, con el objetivo de comparar los resultados obtenidos mediante ambos tipos de muestra y determinar la adecuación de cada uno a los distintos objetivos del estudio. En este caso, las submuestras se recogieron raspando el sedimento en distintos puntos hasta llenar tubos Eppendorf® de 2 ml que se conservaron en frío durante la jornada de campo. Posteriormente se congelaron a -80 °C hasta realizar la extracción de ADN.

En total se muestrearon 60 masas de agua de los municipios de Vitoria-Gasteiz, Valdegovía/Gaubea, Lantarón y Bernedo de la provincia de Álava, resultando en 114 muestras de agua y 15 muestras de sedimento (Tabla 2). Adicionalmente se incluyeron dos masas de agua de la provincia de Navarra, añadiendo un total de 3 muestras de agua más. La recolección de las muestras se llevó a cabo por personal del Centro de Estudios Ambientales (CEA), del IAN y de la SCA.

Extracción de ADN de las muestras ambientales de agua y sedimento

La extracción de ADN de las muestras ambientales se realizó en una estancia con flujo laminar de aire, tratamiento ultravioleta (UV) y libre de ADN procedente de especies animales no humanas, con el fin de evitar cualquier fuente de contaminación externa. La extracción de las muestras de agua se efectuó mediante el kit comercial *DNeasy PowerWater* de Qiagen®, y las muestras de sedimento se extrajeron con el kit comercial *Dneasy PowerSoil* de Qiagen®, en ambos casos siguiendo las especificaciones del fabricante. Además, para poder comparar los resultados en función del método de extracción empleado, dos de las muestras de sedimento también se extrajeron con el kit comercial *NucleoSpin® Soil DNA Isolation* de Machery-Nagel.

Metabarcoding de las muestras ambientales de agua y sedimento

El *metabarcoding* de las muestras ambientales, se llevó a cabo atendiendo a las masas de agua y no a las diferentes submuestras recogidas en cada una de ellas. Por tanto, en primer lugar, para cada masa de agua se mezcló el ADN extraído de cada una de las submuestras (*poolplexing*), manteniendo independientes las muestras de agua de las de sedimento, lo cual resultó en 68 muestras (61 de agua y 7 de sedimento). A pesar de decantarnos por realizar un *poolplexing* de cada una de las masas de agua, también se incluyeron para algunas de las charcas sus distintas submuestras por separado, de forma que se pudiera comparar los resultados de ambos procedimientos. Así, finalmente se diseñaron dos experimentos (*runs*) de secuenciación masiva con diferente número de muestras, 62 en el primero y 49 en el segundo, obteniendo distinto número de secuencias de ADN promedio (cobertura de

#	Masa de agua	Código	Municipio	Provincia	Fecha de muestreo	HUSO	X	Y	Submuestras de agua	Submuestras de sedimento
1	Puerto Vitoria I	Vi1	Vitoria-Gasteiz	Araba	23/05/2019	30T	526183	4736439	2	-
2	Puerto Vitoria 3	Vi3	Vitoria-Gasteiz	Araba	23/05/2019	30T	526293	4736491	3	-
3	Balsa de Olarizu	Ola	Vitoria-Gasteiz	Araba	23/05/2019	30T	527021	4741442	3	-
4	Laguna del Jardín Botánico	Jar	Vitoria-Gasteiz	Araba	23/05/2019	30T	527356	4742059	4	-
5	Balsa de Larregana – Salburua	Lar	Vitoria-Gasteiz	Araba	30/05/2019	30T	529664	4745606	3	2
6	Balsa de Arkaute	Ark	Vitoria-Gasteiz	Araba	30/05/2019	30T	529952	4745243	4	-
7	Laguna Parque Zabalgana 2	Za2	Vitoria-Gasteiz	Araba	03/06/2019	30T	522993	4744147	2	-
8	Parque Zabalgana I	ZaI	Vitoria-Gasteiz	Araba	03/06/2019	30T	523067	4744030	4	-
9	Balsa de Betoño	Bet	Vitoria-Gasteiz	Araba	04/06/2019	30T	528684	4745229	4	3
10	Balsa de Duranzarra	Dur	Vitoria-Gasteiz	Araba	04/06/2019	30T	529152	4745139	4	2
11	Ataria W	AtW	Vitoria-Gasteiz	Araba	04/06/2019	30T	529190	4745269	1	-
12	Ataria E	AtE	Vitoria-Gasteiz	Araba	04/06/2019	30T	529316	4745290	2	-
13	Balsa Orgaz	Org	Vitoria-Gasteiz	Araba	10/06/2019	30T	523366	4739188	2	-
14	Armentia 2	Ar2	Vitoria-Gasteiz	Araba	10/06/2019	30T	524443	4742076	3	-
15	Bosque Armentia	Bos	Vitoria-Gasteiz	Araba	10/06/2019	30T	523751	4741538	3	-
16	Laguna Lezea	Lez	Vitoria-Gasteiz	Araba	10/06/2019	30T	523178	4743419	3	-
17	Balsa Aberasturi	Abe	Vitoria-Gasteiz	Araba	12/06/2019	30T	534248	4738983	4	-
18	Balsa Villafranca	Vil	Vitoria-Gasteiz	Araba	12/06/2019	30T	534343	4739326	4	-
19	Botrino 2	Bo2	Vitoria-Gasteiz	Araba	13/06/2019	30T	534592	4737346	1	-
20	Botrino 5	Bo3	Vitoria-Gasteiz	Araba	13/06/2019	30T	534645	4737355	2	-
21	Palogan 1	Pa1	Vitoria-Gasteiz	Araba	13/06/2019	30T	532810	4735920	1	-
22	Palogan 2	Pa2	Vitoria-Gasteiz	Araba	13/06/2019	30T	532771	4735908	1	-
23	Palogan 5	Pa5	Vitoria-Gasteiz	Araba	13/06/2019	30T	532686	4735885	1	-
24	Palogan 6	Pa6	Vitoria-Gasteiz	Araba	13/06/2019	30T	532644	4735881	1	-
25	Palogan 7	Pa7	Vitoria-Gasteiz	Araba	13/06/2019	30T	532560	4735884	2	-
26	Palogan 8	Pa8	Vitoria-Gasteiz	Araba	13/06/2019	30T	532472	4735808	1	-
27	Puerto Vitoria V	Vi5	Vitoria-Gasteiz	Araba	17/06/2019	30T	526331	4736579	1	-
28	Puerto Vitoria VI	Vi6	Vitoria-Gasteiz	Araba	17/06/2019	30T	523618	4736607	1	-
29	Larraisabel I	La1	Vitoria-Gasteiz	Araba	17/06/2019	30T	525829	4736736	3	-
30	Larraisabel X	L10	Vitoria-Gasteiz	Araba	17/06/2019	30T	525908	4736778	3	-
31	Larraisabel XII	L12	Vitoria-Gasteiz	Araba	17/06/2019	30T	525937	4736838	3	-
32	Larraisabel XIV	L14	Vitoria-Gasteiz	Araba	17/06/2019	30T	525855	4736905	2	-
33	Pieza Vitoria II	PV2	Vitoria-Gasteiz	Araba	17/06/2019	30T	527127	4736772	1	-
34	Gamarra II	Ga2	Vitoria-Gasteiz	Araba	18/06/2019	30T	528849	4747575	1	-
35	Junguitu II	Ju2	Vitoria-Gasteiz	Araba	04/07/2019	30T	532749	4746522	2	-
36	Balsa Lubiano I	Lu1	Vitoria-Gasteiz	Araba	04/07/2019	30T	534676	4748601	3	-
37	Pozo de Laku	Lak	Vitoria-Gasteiz	Araba	07/07/2019	30T	528939	4748017	-	3
38	Yurre	Yur	Vitoria-Gasteiz	Araba	08/07/2019	30T	524373	4746952	2	-
39	Aranguiz	Ara	Vitoria-Gasteiz	Araba	08/07/2019	30T	533828	4748094	2	-
40	Balsa Riego Ullibarri-Viña	Ruv	Vitoria-Gasteiz	Araba	08/07/2019	30T	518904	4747190	3	-
41	Laguna Ullibarri-Viña	UVi	Vitoria-Gasteiz	Araba	08/07/2019	30T	519407	4747799	2	-
42	Charca Miñastu	Miñ	Vitoria-Gasteiz	Araba	02/06/2019	30T	513443	4749343	1	-
43	Santa Marina	Mar	Vitoria-Gasteiz	Araba	02/06/2019	30T	512629	4749188	2	-
44	Charca Gomara	Gom	Vitoria-Gasteiz	Araba	02/06/2019	30T	513915	4748057	1	-
45	Solinde I	Sol	Valdegovía	Araba	03/06/2019	30T	483093	4744441	1	-
46	Arroyo Polledo	Pol	Valdegovía	Araba	03/06/2019	30T	481366	4745337	1	-

#	Masa de agua	Código	Municipio	Provincia	Fecha de muestreo	HUSO	X	Y	Submuestras de agua	Submuestras de sedimento
47	Alemanes	Ale	Valdegovía	Araba	03/06/2019	30T	480746	4748288	1	-
48	Crucero	Cru	Valdegovía	Araba	03/06/2019	30T	481601	4747225	1	1
49	Santa Ana	Ana	Valdegovía	Araba	03/06/2019	30T	481722	4747081	1	2
50	Arreo	Arr	Lantarón	Araba	10/06/2019	30T	500938	4736236	1	-
51	Fontecha	Fon	Lantarón	Araba	10/06/2019	30T	496985	4733785	1	-
52	El Laguillo	Lag	Valdegovía	Araba	10/06/2019	30T	481855	4754757	1	-
53	El Hayal I	Hay	Valdegovía	Araba	10/06/2019	30T	499485	4747070	1	-
54	Arroyo Renejas	Ren	Valdegovía	Araba	18/06/2019	30T	493875	4734910	1	-
55	Barranco La Torca	Tor	Valdegovía	Araba	18/06/2019	30T	489276	4734386	1	-
56	Arroyo Manduerco	Man	Valdegovía	Araba	18/06/2019	30T	492067	4735755	1	-
57	Dehesa Quintana II	Qu1	Bernedo	Araba	19/06/2019	30T	542829	4723835	1	-
58	Dehesa Quintana I	Qu2	Bernedo	Araba	19/06/2019	30T	542829	4723835	1	-
59	Fuente Honda	Hon	Bernedo	Araba	19/06/2019	30T	541853	4724430	1	2
60	Raso de los Espinos	Esp	Bernedo	Araba	19/06/2019	30T	540397	4724166	1	-
61	Arrollo en Corella (Burcemay)	Cor	Corella	Nafarroa	02/06/2019	30T	602402	4663373	1	-
62	Encharcamiento Acequia del Espartal	Tut	Tudela	Nafarroa	02/06/2019	30T	607521	4656582	2	-

Tabla 2. - Masas de agua incluidas en el presente proyecto indicando el número de submuestras de los dos tipos de muestra (agua y sedimento) para cada una de ellas.

reads) por muestra en cada *run*. Esto permite comparar la capacidad de detección de anfibios en función de la cobertura y determinar el número de muestras que resulta óptimo incluir en cada *run*. Algunas de las muestras se incluyeron en ambos *runs*, con el fin de comparar ambos resultados. También se incluyeron en ambos análisis los blancos de extracción (muestras sin ADN que sirven para testar la presencia de contaminaciones), así como cinco *mock samples* (muestras cuyo contenido de ADN es conocido) y los blancos de PCR. Las *mock samples* fueron preparadas partiendo de ADN extraído de tejidos de la citada colección de anfibios, cuya cantidad de ADN se cuantificó para poder prepararlas a una concentración determinada por cada especie incluida (Tabla 3).

Tanto la preparación de la librería (procesado del ADN extraído para su secuenciación masiva que incluye, entre otros, la amplificación por PCR del *barcode* seleccionado y el indexado diferenciado para cada muestra individual) como la posterior secuenciación en la plataforma Illumina (Sistema de secuenciación NextSeq™ 550) se realizaron en el Servicio de Genómica de la UPV/EHU (SGIker – UPV/EHU). Para la realización de las PCRs de librería de ambos *runs* se utilizaron 12,5 µl del kit KAPA HIFI, 8,5 µl de H_2O y 1 µl de cada uno de los *primers* diseñados por Valentini *et al*. (2016) a 10 µM [batra_F (L3541) 5'-ACACCGCCC-GTCACCCT-3' y batra_R (H3596) 5'-GTAYACTTACCAT-GTTACGACTT-3']. Sin embargo, las condiciones de PCR fueron distintas para cada uno de los *runs*. En el *run* 1 se emplearon 2 µl de ADN con las siguientes condiciones diseñadas para este estudio: 5 min de activación a 95 °C, 10 x (30 s de desnaturalización a 95 °C, 30 s de hibridación de los *primers* comenzando a 63 °C y bajando 0,5 °C en cada ciclo y 1 min de elongación a 72 °C), 25 x (30 s de desnaturalización a 95 °C, 30 s de hibridación a 55 °C y 1 min de elongación a 72 °C) y un paso de elongación final de 7 min a 72 °C. En el *run* 2 se usaron las mismas condiciones de Valentini *et al*. (2016) para testar la adecuación de su protocolo a nuestra problemática. Para los dos *runs* se realizaron tres réplicas de PCR independientes por muestra que posteriormente fueron mezcladas para

Mock sample	Especies y concentración de ADN (µl/ml)
MockR1	*R. temporaria [0,1]*
MockR2	*R. temporaria [0,5]*
MockR3	*R. temporaria [1,0]*
MockR4	*R. temporaria [0,5], R. dalmatina [1,0], B. spinosus [1,0], L. helveticus [1,0]*
MockR5	*R. temporaria [1,0], R. dalmatina [1,0], B. spinosus [1,0], L. helveticus [1,0], S. salamandra [1,0], T. marmoratus [1,0], D. galganoi [1,0], A. obstetricans [1,0], P. punctatus [1,0], P. cultripes [1,0], E. calamita [1,0], H. molleri [1,0], R. iberica [1,0], R. pyrenaica [1,0], P. perezi [1,0]*

Tabla 3. - Composición de las *mock samples* indicando la concentración de ADN de cada una de las especies entre corchetes en µl/ml.

su secuenciación. En el *run* 2 se incluyeron nueve réplicas independientes para dos de las muestras con el fin de comprobar si el aumento de réplicas aumentaba la cobertura de *reads* de anfibios. Por otro lado, en el *run* 1 dos de las muestras se duplicaron añadiendo en una muestra de cada par un bloqueador de ADN (*blocking primer*) de humanos (batra_blk: TCACCCTCCTCAAGTATACTTCAAAGGCA-SPC3I; Valentini *et al*., 2016) para comprobar su efecto. Después, la purificación y la indexación (unión de una secuencia de nucleótidos determinada al ADN amplificado que permite identificar la muestra de procedencia de cada *read*) se realizaron con el protocolo de Nextera XT de Illumina. Finalmente, la secuenciación de las librerías de ADN se llevó a cabo en un secuenciador MiSeq de Illumina con un cartucho *MiSeq Reagent Kit* v2 de 300 ciclos, que produce secuencias de 150 pares de bases a partir de ambos extremos del fragmento de ADN amplificado (*paired-end reads*), con una cobertura final de aproximadamente 30 millones de *paired-end reads* para el fragmento seleccionado.

Tratamiento bioinformático de los datos de metabarcoding

Una vez recibidos los resultados de la plataforma Illumina demultiplexados por muestra, se chequeó la calidad y el número de *reads* de cada una de las muestras con el programa FastQC (Andrews, 2010). Descartadas aquellas muestras de mala calidad, se procedió a realizar el análisis bioinformático de los datos utilizando un procedimiento común, pero de forma independiente para cada uno de los *runs*.

En primer lugar, se ensamblaron los *paired-end reads* mediante el programa USEARCH v.11 (Edgar, 2010). Después, se eliminaron las zonas de los *primers* con el programa CUTADAPT v.2.10 (Martin, 2011), permitiendo un error máximo del 0,1 y una cobertura mínima de tres pares de bases. Posteriormente, también con el software CUTADAPT, se filtraron los *reads* por tamaño, delimitando una ventana de 43 a 59 pares de bases. Después de un filtrado de calidad (función fastq_filter de USEARCH), se agruparon los *reads* idénticos o *uniques* con USEARCH (fastx_uniques) descartando todas aquellas agrupaciones con un número de *reads* menor a ocho. Tras la obtención de estas agrupaciones, se procedió a construir la tabla de estas *uniques* por muestras o *Unique Table*.

Una vez construidas para cada uno de los *runs* estas *Unique Tables*, se realizó un proceso de filtrado de las mismas. En primer lugar, se descartaron todas aquellas muestras con una cobertura de *reads* que, tras el análisis bioinformático, presentaban menos de 100 *reads*. Después, usando el software R v.3.6.3 (R Core Team, 2020), todas aquellas *uniques* cuya presencia no superaba un 1% en ninguna muestra fueron eliminadas de la tabla. Para acabar con el filtrado se fijaron dos umbrales de abundancia por muestra para cada *unique*, del 0,5% para aquellas muestras con un número de *reads* superior a 450 y del 4% para las muestras con un número de *reads* entre 101 y 449. De acuerdo a estos umbrales los *reads* de aquellas *uniques* con una presencia inferior a dichos valores fueron transformados a cero en las muestras correspondientes, sorteando de esta forma los posibles *cross-talks* (*reads* asignados erróneamente a muestras a las que no correspondían).

La asignación taxonómica de las *uniques* retenidas se realizó mediante las herramientas VSEARCH (Rognes *et al*., 2016) y q2-feature-classifier (Bokulich *et al*., 2018) como se implementan en QIIME2 (Bolyen *et al*., 2019), para dos umbrales de identidad (umbral mínimo de pares de bases compartidas con las secuencias de la base de datos de referencia; en escala de 0 a 1): 0,80 y 0,99. Para esta asignación taxonómica se usó como base de datos de referencia aquella construida específicamente en este trabajo. Finalmente, para aquellas *uniques* que con el umbral menos exigente (el de 0,80) no se asociaban a ninguna especie de la base de datos de referencia, se realizó una búsqueda individual en la base de datos pública de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) con la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Base de datos de referencia: adecuación del locus seleccionado

La base de datos de secuencias de referencia construida para la región del 12S mitocondrial seleccionada resultó en 194 secuencias (agrupadas en 73 secuencias únicas) pertenecientes a 55 especies. De estas secuencias, 152 pertenecían al trabajo de Valentini *et al*. (2016), 37 fueron nuevas secuencias generadas en este trabajo, y 5 se obtuvieron de la base de datos pública GenBank. La base de datos obtenida resulta fundamental para realizar una asignación taxonómica exitosa de las secuencias obtenidas mediante el análisis de secuenciación de alto rendimiento, ya que de esta forma se pueden compensar muchos errores de secuenciación (Harris, 2003), así como evitar la falta de secuencias para la región objetivo y la posible existencia de especies mal asignadas en bases de datos públicas (Santos y Branco, 2012; Valentini *et al*., 2016).

Se ha obtenido una matriz de diferencias (variabilidad) en la composición nucleotídica entre las 73 secuencias únicas recuperadas indicando la especie de anfibio a la que pertenecen (Figura 2). En ella se puede observar que las diferencias intraespecíficas para el conjunto de especies analizadas son muy escasas, mientras que existen diferencias interespecíficas diagnósticas para cada taxón. Por tanto, se trata de una región óptima, capaz de identificar y diferenciar las distintas especies que componen este grupo taxonómico y, por consiguiente, de gran aplicabilidad para llevar a cabo estudios de monitorización de anfibios. Además, su corta longitud hace que sea un marcador molecular muy adecuado para este tipo de estudios de ADN ambiental, en los que el ADN disponible en las muestras recogidas suele presentar niveles de degradación elevados (Valentini *et al*., 2016; Ruppert *et al*., 2019). Así, este marcador molecular permite distinguir todas las especies de anfibios incluidas en la base de datos de referencia, salvo las kleptoespecies del género *Pelophylax* que no es

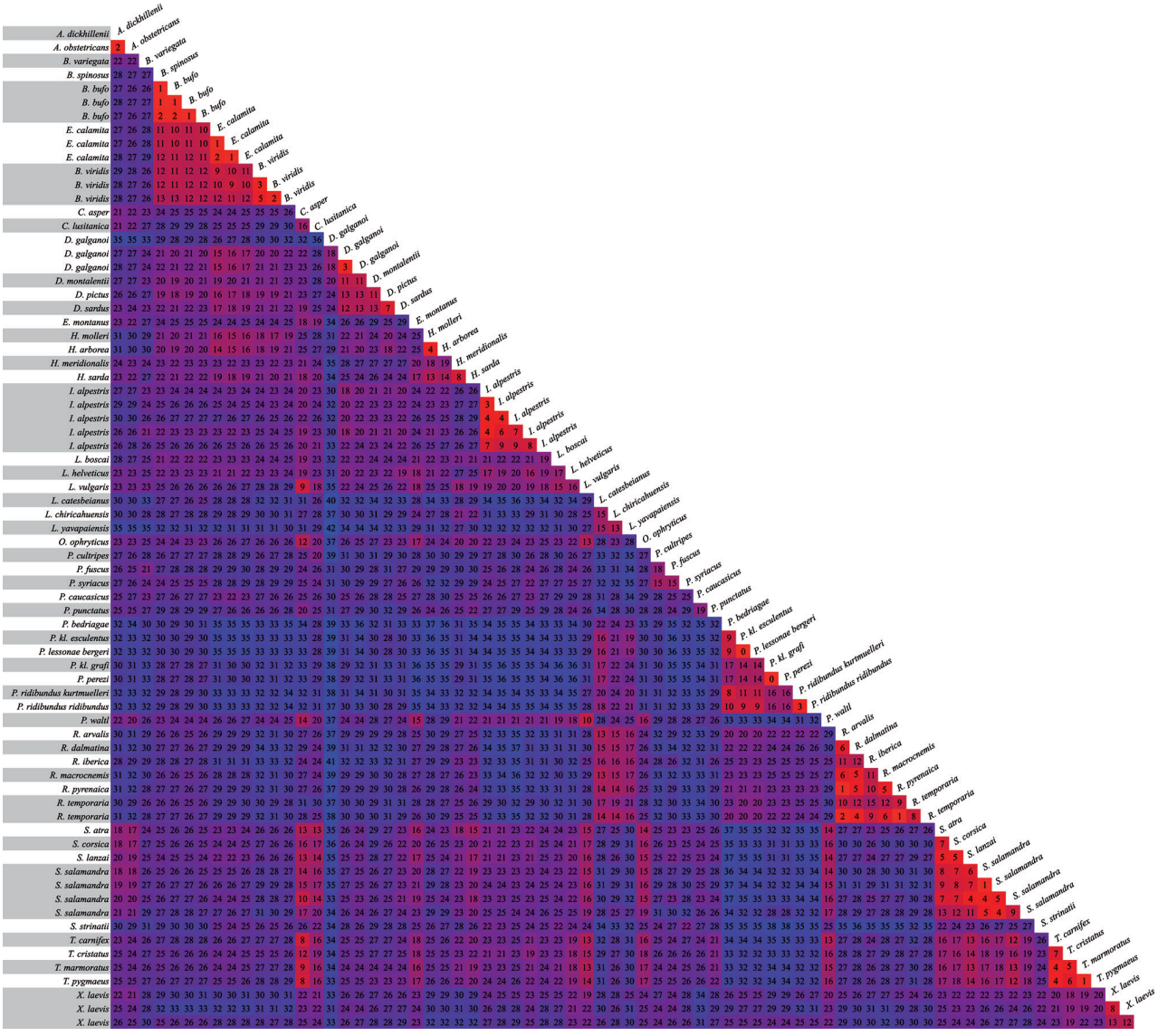

Fig. 2. - Matriz de diferencias de pares de bases entre las secuencias únicas presentes en la base de datos de referencia construida en este trabajo. La escala de colores va desde rojo para indicar el menor número de diferencias, hasta el azul para el mayor número de diferencias.

posible distinguirlas de sus especies parentales, debido a que las secuencias de *Pelophylax* kl. *grafi* y *Pelophylax perezi*, y las de *Pelophylax* kl. *esculentus* y *Pelophylax lessonae* son idénticas para el fragmento de ADN analizado. Esto era de esperar ya que estas kleptoespecies son formas híbridas que contienen combinaciones de material genético de las dos especies parentales que dan lugar a las mismas (Radojičić *et al.*, 2015). En el área de estudio de este trabajo solo podría aparecer la kleptoespecie *P.* kl. *grafi*, pero debido a que la probabilidad de que realmente esté presente en las masas de agua bajo estudio es muy baja, se ha optado por considerar *Pelophylax perezi* aquellas *uniques* asignadas a estas secuencias. Al tratarse de una región mitocondrial, en caso de introgresión también podría suceder una identificación errónea; sin embargo, en la zona de muestreo no existen dos especies que puedan hibridar, por lo que esto no se ha tomado en consideración.

Puesta a punto de la técnica de eDNA metabarcoding

En lo que a la comparativa entre *runs* respecta (Tabla 4), se ha obtenido un menor número de muestras de baja calidad en el *run 1*, secuenciado con el protocolo diseñado en este trabajo, que en el *run 2*, llevado a cabo siguiendo el protocolo publicado por Valentini *et al.* (2016). También se ha observado que a pesar de que en el *run 2* cada muestra tiene una mayor cobertura de *reads* de partida (debido a haber incluido un menor número de muestras en el *run*), el número de *reads* retenidos tras el análisis bioinformático es en general menor que los retenidos en el *run 1* (Tabla 4). Esta tendencia se corrobora en la comparativa de aquellas masas de agua incluidas en ambos *runs* (Tabla 5). Además, en esta comparativa también se observa que el segundo protocolo (*run 2*) no es capaz de detectar algunas especies que sí se detectan en la primera de las metodologías, como es el caso de *Rana dalmatina* en Raso de

los Espinos o de *Pelophylax perezi* y *Lissotriton helveticus* en Dehesa Quintana I. Queda claro pues, que el protocolo diseñado en este trabajo es más adecuado para nuestra problemática en concreto que el protocolo publicado por Valentini *et al*. (2016), demostrando la importancia de las puestas a punto de las metodologías de eDNA para cada casuística (p. ej. Miya *et al*., 2015).

Se ha observado también que en general el número de *reads* retenidos tras el tratamiento bioinformático es muy bajo (Tabla 4), lo cual indica que la mayor parte de los *reads* que se están obteniendo no pertenecen al *barcode* de anfibios seleccionado. Así, se ha comprobado que la inmensa mayoría de los *reads* que se descartan pertenecen a bacterias. Estos *reads* se eliminan en el proceso de tratamiento bioinformático de los datos, debido a que su longitud excede el tamaño esperado y, sobre todo, porque presentan cambios en la secuencia del *primer* mayores del 1% permitido a la hora de extraerlas. Es decir, que a pesar de que los *primers* usados tienen una mayor especificidad hacia las secuencias de anfibios, la gran cantidad de ADN de bacterias presente en las muestras ambientales frente a la baja concentración de ADN de anfibios, conlleva que se obtenga un mayor número de *reads* correspondientes a bacterias que del grupo objetivo. Esto puede deberse a que el método de extracción utilizado favorezca la presencia de ADN de procariotas frente a la de eucariotas y, por lo tanto, convendría realizar un estudio piloto para comparar el efecto del protocolo de extracción en la detección de anfibios (Deiner *et al*., 2015). Algo similar ocurre en estudios moleculares de dieta, donde el ADN del depredador se encuentra en mayor abundancia que el ADN de las presas en las heces. Para remediar esto, se ha aplicado con éxito el uso de *blocking primers* del ADN del depredador (Vestheim y Jarman, 2008). Sería, por tanto, muy interesante el uso de *blocking primers* de procariotas en ensayos posteriores, que reduzcan la amplificación de las bacterias presentes en las muestras, lo que permitirá aumentar el número de *reads* de anfibios obtenidos al final del proceso.

Un aspecto muy importante que se pretendía dilucidar en esta puesta a punto era determinar el número máximo de muestras que se pueden incluir en cada *run*, de forma que la cobertura de *reads* obtenidos no disminuya significativamente y sea lo suficientemente elevada para permitir detectar la presencia de anfibios, incluso de aquellos presentes en muy baja densidad en el medio. Debido a los peores resultados obtenidos para el *run 2*, a la hora de evaluar esta problemática únicamente se han considerado los resultados del *run 1*. La cobertura inicial de secuenciación conseguida para cada muestra en ambos *runs* ha sido similar y muy alta. Como se ha comentado, el tratamiento bioinformático de los datos reduce mucho el número de *reads* retenidos y, sin embargo, sigue siendo suficiente para la detección de anfibios. Por tanto, siempre y cuando se aplique el protocolo diseñado en este trabajo, alrededor de 60 muestras supondría un número adecuado de muestras a incluir, y no se recomendaría superar este número. Aumentar el número de muestras aumentaría el riesgo de perder *reads* de anfibios, sobre todo de aquellos con menor presencia en las muestras analizadas, de forma que podría fallar su detección (falso negativo). En el caso de conseguir aumentar el número de *reads* de anfibios retenidos gracias a cambios en el protocolo que favorezcan su detección, el número de muestras incluidas por *run* podría aumentarse.

Para la secuenciación de alto rendimiento de los humedales con un tamaño superior a los 80 m de diámetro (Tipo 4, ver Figura 1), se incluyeron siete muestras en *poolplexing* correspondientes a los siete humedales que cumplían con esta característica y otras 12 muestras correspondientes a las cuatro submuestras independientes recogidas para tres de ellos (Balsa de Arkaute, Parque Zabalgana I y Balsa Villafranca). De las siete muestras en *poolplexing*, únicamente se obtuvieron resultados para tres de ellas (Balsa Aberasturi, Balsa de Betoño y Laguna del Jardín Botánico), mientras que de las submuestras solo se lograron resultados de una de las masas de agua (Balsa Villafranca). Este número tan alto de resultados negativos parece indicar que el protocolo de muestreo no es capaz de capturar el suficiente ADN ambiental de anfibios en este tipo de charcas de grandes dimensiones. En estos casos sería conveniente aumentar el número de submuestras de agua recogidas a lo largo del perímetro de la masa de agua, con el objetivo de aumentar las posibilidades de capturar ADN del grupo objetivo. De hecho, Valentini *et al*. (2016) lograron detectar anfibios en un lago de 2.200 ha, pero para la recogida de muestra filtraron un total de 180 l.

En cuanto a las muestras de sedimento, ninguna de ellas superó el umbral mínimo de 100 *reads* fijado para considerar fidedignos los resultados. Es cierto que todas estas muestras se incluyeron en el *run 2* y que, por tanto, es posible que siguiendo el protocolo diseñado en este trabajo y testado en el *run 1*, se puedan obtener mejores resultados. Sin embargo, las submuestras de agua de las charcas pertenecientes a las muestras de sedimento también se incluían en el *run 2*, y obtuvieron mejor resultado que las de sedimento. Por tanto, según nuestros resultados, la recogida de agua se presenta como una mejor metodología para la detección de anfibios mediante ADN ambiental cuando el objetivo es la monitorización de la comunidad de anfibios. Esto contrasta con lo encontrado por Booker (2016), que no reporta diferencias significativas en la detección de anfibios entre muestras de sedimento y de agua. Un aspecto muy importante a tener en cuenta en los trabajos de eDNA en medios acuáticos es que cada método de muestreo examina una ventana temporal de detección diferente, ya que el eDNA puede persistir en sedimento desde meses hasta años (Matissoo-Smith *et al*., 2008; Giguet-Covex *et al*., 2014; Turner *et al*., 2015) pero, por lo general, sólo persiste en la columna de agua por ≤ 25 días (Dejean *et al*., 2011; Thomsen *et al*., 2012; Barnes *et al*., 2014; Pilliod *et al*., 2014). Por lo tanto, no se debe descartar por completo el uso de sedimentos en estudios de eDNA de anfibios, y el método de muestreo utilizado debe depender del objetivo del proyecto. En cuanto al método de extracción de las muestras de sedimento respecta, parece que el kit comercial *NucleoSpin® Soil DNA Isolation* de Machery-Nagel presenta mejores resultados que el kit de extracción de Qiagen, ya que en las muestras que se

han extraído con ambos métodos se retienen más *reads* con el kit de Machery-Nagel (CruSQ = 78 vs CruSM = 99 y LakSQ = 19 vs LakSM = 23).

Por otro lado, también se ha testado la eficacia y necesidad de un *blocking primer* de ADN humano, incluyéndose en dos muestras del primer *run*. Ambas muestras fueron analizadas por duplicado, testando una réplica con *blocking primer* y la otra sin él, permitiendo la comparación de los resultados obtenidos. En general, se ha observado que en todas las muestras se obtienen *reads* de humano; sin embargo, todos son excluidos durante el tratamiento bioinformático de los resultados por presentar una longitud mayor a la permitida. Además, estos *reads* no son muy abundantes en ninguna de las muestras. Por lo tanto, no se considera necesario el uso de un *blocking primer* de ADN humano, al menos con el protocolo aquí implementado. Por otro lado, en aquellas muestras en las que se ha empleado el *blocking primer* no se ha observado una reducción importante de *reads* de humano con respecto a sus réplicas sin *blocking primer* (número de *reads* de *Homo sapiens*: UviB = 5 vs Uvi = 5 y, aunque se tratan de muestras de baja calidad, ArkR3B = 53 vs ArkR3 = 245). Otros trabajos como el de Fraija-Fernández *et al*. (2020), donde se estudia la comunidad de peces en zonas oceánicas, tampoco consideran necesaria la utilización de un *blocking primer* de humanos, ya que en su estudio había poca contaminación de fuentes externas provenientes de manipulación humana.

Finalmente, también se ha testado cómo afecta el número de réplicas de PCR realizadas en la preparación de la librería a la presencia de *reads* de anfibios. En dos de las muestras del *run 2* (Ar2W y EspW) se llevaron a cabo nueve réplicas de PCR frente a las tres réplicas realizadas para el resto de muestras. Sin embargo, este aumento de réplicas de PCRs no se tradujo en un aumento significativo del número de *reads* de anfibios (Tabla 4), por lo que se considera que el uso de tres réplicas de PCR es suficiente para lograr una amplificación adecuada. En otros trabajos también se ha demostrado que números bajos de réplicas de PCR son suficientes para distinguir distintos puntos de muestreo entre sí (Ficetola *et al*., 2014; Shirazi *et al*., 2020); sin embargo, también se ha advertido que los taxones raros suelen aparecer en pocas réplicas y, por lo tanto, pueden requerir de mayor número de réplicas para poder ser detectados (Ficetola *et al*., 2008; Beentjes *et al*., 2019; Shirazi *et al*., 2020).

RUN 1				RUN 2			
Muestra	**Calidad**	**Reads totales**	**Reads retenidos**	**Muestra**	**Calidad**	**Reads totales**	**Reads retenidos**
BLW01	OK	78924	723	BLW01	OK	37730	4044
BLW02	OK	46759	14	BLW02	OK	29844	3158
BLW03	OK	12809	429	BLW03	OK	15141	2121
BL_librería	OK	38982	232	BL_librería	OK	40987	3445
MockR1	OK	86194	67762	BLSedQ	OK	22686	2885
MockR2	OK	84542	76429	BLSedM	OK	50755	2063
MockR3	OK	94764	86756	MockR3	OK	144231	121193
MockR4	OK	120855	108217	MockR4-1	OK	155955	139268
MockR5	OK	160218	142156	MockR4-2	OK	125369	111882
AbeW	OK	114479	142	MockR5	OK	206197	184665
Ar2W	OK	178919	287	LarW	OK	192940	219
AraW	OK	140721	174	LarSQ	OK	120328	93
ArkW	OK	178919	111	CruW	MALA	173976	--
ArkR1W	OK	153592	47	CruSQ	OK	157486	78
ArkR2W	OK	167648	35	CruSM	OK	103290	99
ArkR3W	OK	162770	56	AnaW	OK	128918	192
ArkR3WBloc	OK	158282	59	AnaSQ	OK	102224	97
ArkR4W	OK	138495	62	BetW	OK	174895	148
AtEW	OK	141406	57	BetSQ	OK	142383	76
AtWW	OK	123777	65	DurW	OK	147929	72
Bo2W	OK	177616	3934	DurSQ	OK	115649	37
Bo5W	OK	192508	6859	HonW	OK	223372	734
EspW	OK	131804	2346	HonSQ	OK	202024	72
Ga2W	OK	127984	113	LakSQ	OK	172236	19
JarW	OK	127744	248	LakSM	OK	197537	23
Ju2W	OK	180399	245	MiñW	OK	219996	57
L10W	OK	143683	361	MarW	OK	213475	44

RUN 1				RUN 2			
Muestra	**Calidad**	**Reads totales**	**Reads retenidos**	**Muestra**	**Calidad**	**Reads totales**	**Reads retenidos**
L12W	OK	91147	69	GomW	OK	170799	76
L14W	OK	128478	323	CorW	OK	211575	31
La1W	OK	74100	231	TutW	OK	161796	66
LezW	OK	169940	905	SolW	OK	144952	157
OlaW	OK	114713	72	PolW	OK	74642	100
OrgW	OK	73352	525	AleW	OK	110395	147
Pa1W	OK	104040	18322	ArrW	OK	320160	51
Pa2W	OK	177913	1973	FonW	MALA	36177	--
Pa5W	OK	114932	1540	LagW	OK	127354	413
Pa6W	OK	98532	44	HayW	OK	142409	829
Pa7W	OK	100161	1494	RenW	MALA	177607	--
Pa8W	OK	121879	1584	TorW	OK	172393	86
PV2W	OK	102803	5373	ManW	MALA	145870	--
Qu1W	OK	175161	432	L10W	MALA	136712	--
Qu2W	OK	164083	159	L10R1W	OK	201283	275
RuvW	OK	124694	45	L10R2W	OK	200259	147
UviW	OK	128227	109	L10R3W	OK	164335	262
UviWBloc	OK	121256	117	ArkW	OK	189203	51
Vi1W	OK	113267	142	AtEW	MALA	190576	--
Vi3W	OK	131854	268	Ar2W	OK	159416	154
Vi5W	OK	161216	3689	EspW	OK	147717	965
Vi6W	OK	143905	306	Qu1W	OK	144983	108
VilW	OK	145086	103	Qu2W	OK	201501	81
VilR1W	OK	127993	101				
VilR2W	OK	152752	149				
VilR3W	OK	130796	138				
VilR4W	OK	119305	198				
YurW	OK	140006	8				
Za2W	OK	135934	36				
ZalW	OK	136818	73				
ZalR1W	OK	173518	88				
ZalR2W	OK	157523	58				
ZalR3W	OK	102412	15				
ZalR4W	OK	150908	12				
BosW	MALA	36873	--				
Lu1W	MALA	61741	--				

Tabla 4. - Calidad y número de *reads* totales así como número de *reads* retenidos tras el análisis bioinformático para cada muestra en cada uno de los *runs*. La masa de agua a la que pertenece cada una de las muestras se encuentra codificada de acuerdo a los códigos de la Tabla 2. W: muestra de agua; SQ: muestra de sedimento extraída con el *kit Dneasy PowerSoil®* de Qiagen; SM: muestra de sedimento extraída con el *kit NucleoSpin® Soil DNA Isolation* de Machery-Nagel; BLW: blanco de extracción muestras de agua; BLSedQ: blanco de extracción muestras de sedimento *kit Dneasy PowerSoil®* de Qiagen; BLSedM: blanco de extracción muestras de sedimento *kit NucleoSpin® Soil DNA Isolation* de Machery-Nagel; Bloc: muestras a las que se añadió el *blocking primer* de ADN humano.

Caracterización de las comunidades de anfibios en Álava mediante la técnica de eDNA metabarcoding desarrollada

En este proyecto de puesta a punto se han incluido un total de 62 masas de agua, habiendo obtenido resultados válidos para 37 de ellas y siendo, por tanto, 25 los humedales donde la baja calidad de los resultados de la secuenciación impide la interpretación de los mismos. Además, también se han obtenido resultados adecuados para las cinco *mock samples*.

En el caso de las *mock samples*, en ambos *runs* se obtuvieron 15 *uniques* que se corresponden con las especies de anfibios incluidas en las mismas (Tabla 3). En las masas de agua, en el *run 1* se detectaron nueve especies de anfibios de la península ibérica, seis especies de peces, tres

especies de aves y una especie de microorganismo eucariota. En el *run 2*, en cambio, se detectaron ocho especies de anfibios, dos especies de peces y una de ave. Es destacable la capacidad del método de detectar, además de los anfibios, algunas especies de peces y aves. Aunque esto se trate de información secundaría y que puede presentar un sesgo importante en lo que respecta a las especies detectadas, puede dar de forma indirecta aviso de la presencia de especies interesantes, ya sea por su escasez o por su condición de especies invasoras. En este sentido, hay que tener en cuenta que el marcador molecular empleado está diseñado para la detección y diferenciación de anfibios. Se trata de un fragmento de ADN muy corto que, a la vista de los resultados obtenidos, puede ser capaz de detectar especímenes de otros grupos taxonómicos diferentes al de anfibios, pero con escasa o nula capacidad de diferenciación a nivel de especie y/o de género, ya que el fragmento no presenta suficiente variabilidad dentro de estos grupos. Por lo tanto, la asignación realizada en este trabajo para los grupos taxonómicos diferentes al de anfibios debe tomarse con precaución.

Atendiendo al número de *reads* de las *uniques* identificadas como anfibios (Tabla 6), en la mayoría de las masas de agua se detectaron entre dos y cuatro especies. Las especies detectadas en los humedales con esta metodología coincidieron en su mayoría con las especies reportadas de visu por los técnicos que realizaron el muestreo, pero en la mayoría de los casos, con el mismo esfuerzo de muestreo, se ha detectado un mayor número de especies con la metodología *metabarcoding* aquí presentada.

La especie más abundante fue *Rana temporaria*, detectada en 27 masas de agua. Sin embargo, en base a la biología de la especie y a inventarios previos de los humedales (Luis Lobo, com. pers.), la presencia de *R. temporaria* no era de esperar en cinco charcas donde se ha detectado (Tabla 6). Teniendo en cuenta la gran cantidad de ADN de *R. temporaria* que se incluyó en las *mock samples* y que para ninguna otra especie de anfibio hemos detectado esta problemática, consideramos que estos falsos positivos se deben a un problema de *cross-talk* que no ha podido filtrarse en el procesado bioinformático debido a la baja cantidad de *reads* de anfibios retenidos en las muestras ambientales (Olds *et al*., 2016; Cornman *et al*., 2021). Las especies *Lissotriton helveticus* y *Triturus marmoratus* se detectaron en 25 y 18 masas de agua respectivamente. Las especies *Bufo spinosus* (presente en 12 humedales) y *Pelophylax perezi* (detectada en 13) también fueron bastante abundantes, mientras que la presencia de *Rana dalmatina, Alytes obstetricans, Salamandra salamandra* y *Hyla molleri* fue más esporádica. A pesar de que el área de muestreo coincidía con la distribución de *Epidalea calamita* y *Pelodytes punctatus,* estas especies no fueron detectadas en ninguna de las masas de agua. A este respecto, es necesario tener en cuenta las fechas de muestreo de las charcas, las cuales pueden favorecer la presencia de unas especies frente a otras en determinados momentos, debido a la fenología reproductiva propia de cada una de las especies. Han sido varios los trabajos que han detectado diferencias significativas en la detección de especies de anfibios en distintos periodos (p. ej. Booker, 2016; Buxton *et al*., 2017); por lo tanto, sería muy interesante aplicar la metodología aquí diseñada en distintos periodos para describir los cambios en la detección de las distintas especies presentes en la zona de estudio.

	ArkW		AtEW		Ar2W		EspW		EspW					Qu1W		Qu2W	
	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	R1	R2	R3	Mix	Mix	Mix	Mix
	Run 1	Run 2	Run 1	Run 2	Run 1	Run 2	Run 1	Run 2	Run 1	Run 2	Run 2	Run 2	Run 2	Run 1	Run 2	Run 1	Run 2
Rana temporaria	--	--	--	--	28	15	15	13	0	--	0	27	0	0	0	0	--
Bufo spinosus	--	--	--	--	30	0	0	0	0	--	0	0	0	207	42	0	--
Pelophylax perezi	--	--	--	--	0	0	260	75	54	--	0	22	37	32	0	71	--
Lissotriton helveticus	--	--	--	--	69	56	0	0	45	--	32	23	51	19	0	26	--
Triturus marmoratus	--	--	--	--	131	49	31	14	0	--	0	0	0	0	0	13	--
Rana iberica	--	--	--	--	0	0	0	0	0	--	0	0	0	0	0	0	--
Rana dalmatina	--	--	--	--	0	0	28	0	40	--	0	0	22	0	0	24	--
Epidalea calamita	--	--	--	--	0	0	0	0	0	--	0	0	0	0	0	0	--
Pelodytes punctatus	--	--	--	--	0	0	0	0	0	--	0	0	0	0	0	0	--
Rana pyrenaica	--	--	--	--	0	0	0	0	0	--	0	0	0	0	0	0	--
Salamandra salamandra	--	--	--	--	0	0	0	0	0	--	0	0	0	0	0	0	--
Hyla molleri	--	--	--	--	0	0	1967	809	196	--	164	33	88	0	0	0	--
Pelobates cultripes	--	--	--	--	0	0	0	0	0	--	0	0	0	0	0	0	--
Alytes obstetricans	--	--	--	--	0	0	0	0	0	--	0	0	0	99	14	20	--
Discoglossus galganoi	--	--	--	--	0	0	0	0	0	--	0	0	0	0	0	--	--

Tabla 5. - Comparativa de los resultados obtenidos en los distintos *runs* para aquellas muestras incluidas en ambos.

Mase de agua	Muestra	Run	*Rana temporaria*	*Bufo spinosus*	*Pelophylax perezi*	*Lissotriton helveticus*	*Triturus marmoratus*	*Rana iberica*	*Rana dalmatina*	*Epidalea calamita*	*Pelodytes punctatus*	*Rana pyrenaica*	*Salamandra salamandra*	*Hyla molleri*	*Pelobates cultripes*	*Alytes obstetricans*	*Discoglassus galganoi*
Fuente Honda	HonW	Run 2	199	7	11	307	128	0	0	0	0	0	0	52	0	0	0
Raso de los espinos	EspW	Run 1	15	0	260	0	31	0	28	0	0	0	0	1967	0	0	0
	EspW	Run 2	13	0	75	0	14	0	0	0	0	0	0	809	0	0	0
Dehesa Quintana II	Qu2W	Run 1	0	0	71	26	13	0	24	0	0	0	0	0	0	20	0
El Hayal I	HayW	Run 2	7	6	0	67	25	0	0	0	0	0	0	0	0	578	0
El Laguillo	LagW	Run 2	0	19	247	17	52	0	0	0	0	0	0	23	0	0	0
Armentia 2	Ar2W	Run 1	28	30	0	69	131	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ar2W	Run 2	15	0	0	56	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gamarra II	Ga2W	Run 1	18	24	0	20	0	0	26	0	0	0	0	0	0	0	0
Junguitu II	Ju2W	Run 1	17	0	12	40	39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Larraisabel X	L10W	Run 1	0	0	54	45	0	0	40	0	0	0	0	196	0	0	0
	L10R1W	Run 2	0	0	0	32	0	0	0	0	0	0	0	164	0	0	0
	L10R2W	Run 2	27	0	22	23	0	0	0	0	0	0	0	33	0	0	0
	L10R3W	Run 2	0	0	37	51	0	0	22	0	0	0	0	88	0	0	0
Larraisabel XIV	L14W	Run 1	46	0	50	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
Larraisabel I	La1W	Run 1	0	0	54	62	83	0	0	0	0	0	0	0	0	22	0
Balsa Orgaz	OrgW	Run 1	57	0	310	47	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Palogán 8	Pa8W	Run 1	1414	9	0	11	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
Dehesa Quintana I	Qu1W	Run 1	0	207	32	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0
	Qu1W	Run 2	0	42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0
Puerto Vitoria 3	Vi3W	Run 1	25	0	0	14	18	0	0	0	0	0	0	109	0	0	0
Santa Ana	AnaW	Run 2	0	0	45	56	0	0	0	0	0	0	0	31	0	31	0
Charca Gomara	GomW	Run 2	9	17	0	8	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Botrino 2	Bo2W	Run 1	3620	0	0	28	0	0	0	0	0	0	36	0	0	0	0
Palogán 2	Pa2W	Run 1	1599	0	0	77	0	0	0	0	0	0	174	0	0	0	0
Palogán 7	Pa7W	Run 1	962	0	0	12	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0
Pieza Vitoria II	PV2W	Run 1	66	0	0	4718	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Laguna Ullibarri-Viña	UviBWB	Run 1	31	0	0	37	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	UviW	Run 1	33	0	0	38	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Puerto Vitoria I	Vi1W	Run 1	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	60	0	0	0
Puerto Vitoria V	Vi5W	Run 1	1441	0	0	21	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Balsa Villafranca	VilW	Run 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	VilR1W	Run 1	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	VilR2W	Run 1	43	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	VilR3W	Run 1	63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	VilR4W	Run 1	20	16	0	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alemanes	AleW	Run 2	11	0	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	83	0
Balsa de Larregana – Salburua	LarW	Run 2	39	32	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Solinde I	SolW	Run 2	11	0	0	71	62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Botrino 5	Bo5W	Run 1	6401	0	0	142	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Laguna del Jardín Botánico	JarW	Run 1	18	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Palogán 1	Pa1W	Run 1	15724	0	0	0	0	0	0	0	0	0	749	0	0	0	0
Palogán 5	Pa5W	Run 1	284	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1204	0	0	0	0

Mase de agua	Muestra	Run	*Rana temporaria*	*Bufo spinosus*	*Pelophylax perezi*	*Lissotriton helveticus*	*Triturus marmoratus*	*Rana iberica*	*Rana dalmatina*	*Epidalea calamita*	*Pelodytes punctatus*	*Rana pyrenaica*	*Salamandra salamandra*	*Hyla molleri*	*Pelobates cultripes*	*Alytes obstetricans*	*Discoglassus galganoi*
Laguna Lezea	LezW	Run 1	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Puerto Vitoria VI	Vi6W	Run 1	0	0	0	0	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Balsa de Betoño	BetW	Run 2	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Balsa Aberasturi	AbeW	Run 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aranguiz	AraW	Run 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº de humedales con presencia			**27**	**12**	**13**	**25**	**18**	**0**	**5**	**0**	**0**	**0**	**6**	**8**	**0**	**7**	**0**
	MockR3	Run 2	105022	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MockR4-1	Run 2	38163	43456	0	30430	0	0	21493	0	0	0	0	0	0	0	0
	MockR4-2	Run 2	29919	35589	0	24726	0	0	17202	0	0	0	0	0	0	0	0
	MockR5	Run 2	24698	4439	37805	2409	28225	25859	2474	14742	13325	10926	7623	69	2935	1255	1710
	MockR1	Run 1	64758	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MockR2	Run 1	72663	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MockR3	Run 1	82897	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MockR4	Run 1	33295	33155	0	18376	0	0	18621	0	0	0	0	0	0	0	0
	MockR5	Run 1	19993	3036	28545	1132	21047	21397	1940	12932	9507	8945	6031	54	2246	1075	1376

Tabla 6. - Número de *reads* de las *uniques* identificadas como anfibios con un porcentaje de identidad superior al 99% para cada muestra indicando la masa de agua a la que pertenecen y el run en el que se incluyeron. Los *reads* de las masas de agua en las que no se esperaría la presencia de *R. temporaria* y se sospecha de un problema de *cross-talk* están indicados en gris. En la parte inferior de la tabla se incluyen los datos para las muestras *mock*.

CONCLUSIONES

En este trabajo se ha abordado la puesta a punto de una metodología de *metabarcoding* basada en análisis de ADN ambiental para la monitorización de anfibios que pueda ser de aplicación en la CAPV. La base de datos de secuencias construida ha confirmado que el *locus* seleccionado, una región del gen 12S mitocondrial, es adecuado para distinguir las especies de anfibios del área de estudio, ya que es suficientemente polimórfico entre especies y está bien conservado intraespecíficamente. Los resultados de la aplicación de la metodología de *metabarcoding* diseñada en humedales de Álava (además de en dos localidades de Navarra) muestran que la técnica es capaz de detectar las especies de anfibios presentes en las masas de agua y ha permitido identificar los procedimientos a mejorar para optimizar la metodología. En concreto, se ha observado que la metodología de muestreo es adecuada para las masas de agua con un diámetro inferior a 80 m, siendo necesario ampliar el número de submuestras de agua recogidas para las masas de mayor tamaño. También se concluye que el uso de muestras de agua, en este caso en concreto, es más adecuado que la recogida de sedimento y se pone en evidencia la necesidad de poner en marcha procedimientos que eviten el amplificado de bacterias. Así pues, estos resultados, aunque preliminares, muestran la importancia de la puesta a punto de este tipo de técnicas para cada problemática y, así mismo, muestran que se trata de una metodología prometedora para la monitorización de las comunidades de anfibios que puede servir de ayuda en la conservación y gestión de este grupo taxonómico.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se ha llevado a cabo gracias a la "Subvención a entidades privadas que realicen proyectos para la generación de conocimiento en la conservación del Patrimonio Natural" del Departamento de Medio Ambiente, Planificación Territorial y Vivienda del Gobierno Vasco de la convocatoria de 2019. También ha sido financiado por un convenio de colaboración CEA Green Lab 2019 con el Centro de Estudios Ambientales de Vitoria, recibiendo así mismo fondos propios de la Unidad de Anillo Verde y Biodiversidad (UAVB) del Ayuntamiento de Vitoria-Gasteiz. Además, queremos agradecer la colaboración prestada por el personal del Ayuntamiento de Vitoria-Gasteiz (Luis Lobo, UAVB), del Instituto Alavés de la Naturaleza (Conrado Tejado) y de la Sociedad de Ciencias Aranzadi (Ion Garin, Alberto Gosá y Carlos Cabido) en la recogida de muestras. Agradecer también a Irati Miguel del Servicio de Genómica del SGIker su asesoramiento en el procedimiento de secuenciación de alto rendimiento.

BIBLIOGRAFÍA

Albaina, A., Aguirre, M., Abad, D., Santos, M., Estonba, A., 2016. 18S rRNA V9 metabarcoding for diet characterization: a critical evaluation with two sympatric zooplanktivorous fish species. Ecol. Evol. 6, 1809–1824.

Andrews, S., 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc

Barnes, M.A., Turner, C.R., 2015. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. Cons. Gen. 17(1), 1–17. https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4.

Barnes, M.A., Turner, C.R., Jerde, C.L., Renshaw, M.A., Chadderton, W.L., Lodge, D.M., 2014. Environmental Conditions Influence eDNA Persistence in Aquatic Systems. PLoS ONE, 12(9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185043.

Beentjes, K.K., Speksnijder, A.G.C.L., Schilthuizen, M., Hoogeveen, M., Van Der Hoorn, B.B., 2019. The effects of spatial and temporal replicate sampling on eDNA metabarcoding. PeerJ, 2019(7), 1–18. https://doi.org/10.7717/peerj.7335.

Biggs, J., Ewald, N., Valentini, A., Gaboriaud, C., Dejean, T., Griffiths, R.A., Foster, J., Wilkinson, J.W., Arnell, A., Brotherton, P., Williams, P., Dunn, F., 2014. Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). Biol. Cons. 183, 19–28. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.029.

Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M.T.P., Carvalho, G.R., Creer, S., Knapp, M., Yu, D.W., de Bruyn, M., 2014. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. Trends Ecol. Evol. 29(6), 358–367. https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.04.003.

Bokulich, N.A., Kaehler, B.D., Rideout, J.R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G.A., Caporaso, J.G., 2018. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. Microbiome 6(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z.

Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., Caporaso, J.G., 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nature Biotechnology 37(8), 852–857. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9.

Booker, B.K., 2016. Developing and assessing an environmental DNA protocol for detecting amphibian species in lentic systems in Alberta, Canada. 1106. http://www.southampton.ac.uk/oes/undergraduate/courses/geology/f601_msci_geology.page.

Buxton, A.S., Groombridge, J.J., Zakaria, N.B., Griffiths, R.A., 2017. Seasonal variation in environmental DNA in relation to population size and environmental factors. Scient. Rep. 7(March), 1–9. https://doi.org/10.1038/srep46294.

Bylemans, J., Gleeson, D.M., Hardy, C.M., Furlan, E., 2018. Toward an ecoregion scale evaluation of eDNA metabarcoding primers: A case study for the freshwater fish biodiversity of the Murray–Darling Basin (Australia). Ecol. Evol. 8(17), 8697–8712. https://doi.org/10.1002/ece3.4387.

Carew, M.E., Pettigrove, V.J., Metzeling, L., Hoffmann, A.A., 2013. Environmental monitoring using next generation sequencing: Rapid identification of macroinvertebrate bioindicator species. Front. Zool. *10*(1). https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-45.

Cornman, R.S., McKenna, J.E., Fike, J.A., 2021. Composition and distribution of fish environmental DNA in an Adirondack watershed. PeerJ 9, 1–34. https://doi.org/10.7717/peerj.10539.

Deagle, B.E., Kirkwood, R., Jarman, S.N., 2009. Analysis of Australian fur seal diet by pyrosequencing prey DNA in faeces. Mol. Ecol. 18(9), 2022–2038. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04158.x.

Deiner, K., Bik, H.M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D.M., de Vere, N., Pfrender, M.E., Bernatchez, L., 2017. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. Mol. Ecol. 26(21), 5872–5895. https://doi.org/10.1111/mec.14350.

Deiner, K., Walser, J. C., Mächler, E., Altermatt, F., 2015. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. Biol. Cons. 183, 53–63. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.018.

Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., Miaud, C., 2011. Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. PLoS ONE 6(8), 8–11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023398.

Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E., Miaud, C., 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: The example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. J. Appl. Ecol. 49(4), 953–959. https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2012.02171.x.

Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics 26(19), 2460-2461.

Ficetola, G.F., Pansu, J., Bonin, A., Coissac, E., Giguet-Covex, C., De Barba, M., Gielly, L., Lopes, C.M., Boyer, F., Pompanon, F., Rayé, G., Taberlet, P., 2014. Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data. Mol. Ecol. Res. 15(3), 543–556. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12338.

Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P., 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. Biol. Lett. 4(4), 423–425. https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118.

Fraija-Fernández, N., Bouquieaux, M.C., Rey, A., Mendibil, I., Cotano, U., Irigoien, X., Santos, M., Rodríguez-Ezpeleta, N., 2020. Marine water environmental DNA metabarcoding provides a comprehensive fish diversity assessment and reveals spatial patterns in a large oceanic area. Ecol. Evol. 10(14), 7560–7584. https://doi.org/10.1002/ece3.6482.

Giguet-Covex, C., Pansu, J., Arnaud, F., Rey, P.J., Griggo, C., Gielly, L., Domaizon, I., Coissac, E., David, F., Choler, P., Poulenard, J., Taberlet, P., 2014. Long livestock farming history and human landscape shaping revealed by lake sediment DNA. Nat. Comm. 5, 1–7. https://doi.org/10.1038/ncomms4211.

Goldberg, C.S., Turner, C.R., Deiner, K., Klymus, K.E., Thomsen, P.F., Murphy, M.A., Spear, S.F., McKee, A., Oyler-McCance, S.J., Cornman, R.S., Laramie, M.B., Mahon, A.R., Lance, R.F., Pilliod, D.S., Strickler, K.M., Waits, L.P., Fremier, A.K., Takahara, T., Herder, J.E., Taberlet, P., 2016. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. Methods in Ecol. Evol. 7(11), 1299–1307. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12595.

Harris, D.J., 2003. Shaking the "deleterious mutations" dogma? Trends in Ecol. Evol. 18(7), 315–317. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00128-9.

Hinlo, R., Gleeson, D., Lintermans, M., Furlan, E., 2017. Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples. *PLoS ONE, 12*(6), 1–22. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179251.

Hofreiter, M., Betancourt, J.L., Pelliza Sbriller, A., Markgraf, V., McDonald, H.G., 2003. Phylogeny, diet, and habitat of an extinct ground sloth from Cuchillo Curá, Neuquén Province, southwest Argentina. Quatern. Res. 59, 364-378.

Jakubavičiute, E., Bergström, U., Eklöf, J.S., Haenel, Q., Bourlat, S.J., 2017. DNA metabarcoding reveals diverse diet of the three-spined stickleback in a coastal ecosystem. PLoS ONE 12(10), 1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186929.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A., 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 28(12), 1647–1649. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199.

Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. Adv. Environ. Biol. 7(10), 2803–2809.

Matisoo-Smith, E., Roberts, K., Welikala, N., Tannock, G., Chester, P., Feek, D., Flenley, J., 2008. Recovery of DNA and pollen from New Zealand lake sediments. Quatern. Internat. 184(1), 139–149. https://doi.org/10.1016/j.quaint.2007.09.013.

Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J.Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M., Iwasaki, W., 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. Royal Soc. Open Sci. 2(7). https://doi.org/10.1098/rsos.150088.

Murakami, H., Yoon, S., Kasai, A., Minamoto, T., Yamamoto, S., Sakata, M.K., Horiuchi, T., Sawada, H., Kondoh, M., Yamashita, Y., Masuda, R., 2019. Dispersion and degradation of environmental DNA from caged fish in a marine environment. Fish. Sci. 85(2), 327–337. https://doi.org/10.1007/s12562-018-1282-6.

Olds, B.P., Jerde, C.L., Renshaw, M.A., Li, Y., Evans, N.T., Turner, C.R., Deiner, K., Mahon, A.R., Brueseke, M.A., Shirey, P.D., Pfrender, M.E., Lodge, D.M., Lamberti, G.A., 2016. Estimating species richness using environmental DNA. Ecol. Evol. 6(12), 4214–4226. https://doi.org/10.1002/ece3.2186.

Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., McMillan, W.O., Stice, L., Grabowski, G., 1991. The simple fool's guide to PCR. Version 2. Honolulu, Hawai.

Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., Arkle, R.S., Waits, L.P., 2014. Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. Molec. Ecol. Resour. 14(1), 109–116. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12159.

R Core Team, 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL http://www.R-project.org/.

Radojičić, J.M., Krizmanić, I., Kasapidis, P., Zouros, E., 2015. Extensive mitochondrial heteroplasmy in hybrid water frog (*Pelophylax* spp.) populations from Southeast Europe. Ecol. Evol. 5(20), 4529–4541. https://doi.org/10.1002/ece3.1692.

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F., 2016. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. PeerJ, 2016(10), 1–22. https://doi.org/10.7717/peerj.2584.

Ross, S.T., 2013. Ecology of North American Freshwater Fishes. University of California Press. http://www.jstor.org/stable/10.1525/j.ctt2tt953.

Ruppert, K.M., Kline, R.J., Rahman, M.S., 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. Global Ecol. Cons. 17, e00547. https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547.

Santos, A.M., Branco, M., 2012. Magic traits, pleiotropy and effect sizes: A response to Haller *et al*. Trends in Ecol. Evol. 27(1), 5–6. https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.09.011.

Schenekar, T., Schletterer, M., Lecaudey, L.A., Weiss, S.J., 2020. Reference databases, primer choice, and assay sensitivity for environmental metabarcoding: Lessons learnt from a re-evaluation of an eDNA fish assessment in the Volga headwaters. River Res. Appl. 36(7), 1004–1013. https://doi.org/10.1002/rra.3610.

Shirazi, S., Meyer, R., Shapiro, B., 2020. PCR replication in environmental DNA metabarcoding. *Auth. Prep*. 1–22.

Tanadini, LG., Schmidt, B.R., 2011. Population size influences amphibian detection probability: Implications for biodiversity monitoring programs. PLoS ONE 6(12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028244.

Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L., Coissac, E., 2018. Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring. Oxford University Press.

Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L., Willerslev, E., 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. Molec. Ecol. 21(11), 2565–2573. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x.

Thomsen, P.F., Willerslev, E., 2015. Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. Biol. Cons. 183, 4–18. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019.

Turner, C.R., Uy, K.L., Everhart, R.C., 2015. Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. Biol. Cons. 183, 93–102. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.017

Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P.F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G.H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J.M., Peroux, T., Crivelli, A.J., Olivier, A., Acqueberge, M., Le Brun, M., Møller, P.R., Willerslev, E., Dejean, T., 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. Molec. Ecol. 25(4), 929–942. https://doi.org/10.1111/mec.13428.

Vences, M., Kosuch, J., Glaw, F., Böhme, W., Veith, M., 2003. Molecular phylogeny of hyperoliid treefrogs: Biogeographic origin of Malagasy and Seychellean taxa and re-analysis of familial paraphyly. J. Zool. Syst. Evol. Res. 41(3), 205–215. https://doi.org/10.1046/j.1439-0469.2003.00205.x.

Vestheim, H., Jarman, S.N., 2008. Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples - A case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs. Front. Zool. 5, 1–11. https://doi.org/10.1186/1742-9994-5-12.

Munibe Monographs. Nature Series • 5 (2023) • 49-59 • Donostia-San Sebastián • ISSN 2340-0463 - eISSN 2340-3055

Seguimiento de anfibios en Navarra mediante censos poblacionales

Monitoring of amphibians in Navarre through population censuses

Alberto Gosá[1]

[1] Sociedad de Ciencias Aranzadi. Departamento de Herpetología. Paseo de Zorroaga 11, 20014 Donostia-San Sebastián. España.
Correspondencia: agosa@aranzadi.eus

RESUMEN

Hace poco más de dos decenios comenzaron los primeros seguimientos de poblaciones de anfibios en Navarra. La primera especie monitoreada mediante censos en sus cinco subpoblaciones desconectadas que mantiene en la provincia fue *Rana dalmatina* Bonaparte, 1840. Los resultados de este periodo no han detectado un decrecimiento poblacional, a lo que ha debido contribuir el programa de recuperación del hábitat reproductor emprendido y el mantenimiento de las manchas forestales (robledal) remanentes donde desarrolla su ciclo biológico en fase terrestre. Posteriormente se iniciaron los seguimientos de comunidades completas de anfibios en espacios protegidos, como el Parque Natural de las Sierras de Urbasa y Andía y las Zonas Especiales de Conservación de la Sierra de Aralar y Roncesvalles-Selva de Irati, donde, en el mejor de los casos, se cuenta con seguimientos discontinuos de 14 años. Más recientemente, se ha iniciado el censo de poblaciones en una zona no protegida y alterada de la Navarra Media, en los valles de Aranguren y Egüés, donde se llevan realizados cuatro años de seguimiento. Los resultados, todavía preliminares, no muestran en general procesos de declive poblacional.

PALABRAS CLAVE: Seguimiento poblacional, censo de poblaciones, anfibios, espacios naturales protegidos, *Rana dalmatina*, Navarra.

ABSTRACT

A little more than two decades ago, the first monitoring of amphibian populations began in Navarre. *Rana dalmatina* Bonaparte, 1840 was the first species monitored through censuses in its five disconnected subpopulations that it maintains in the province. The results of this period have not detected a population decrease, to which the program to recover the reproductive habitat undertaken and the maintenance of the remaining forest patches (oak) where it develops its life cycle in the terrestrial phase must have contributed. Subsequently, the monitoring of complete amphibian communities in protected areas began, such as the Natural Park of Urbasa and Andía Mountains and the Special Areas of Conservation of Aralar Mountain and Roncesvalles-Selva de Irati, where, in the best of the cases, there are 14-year discontinuous monitoring. More recently, a population census has been started in an unprotected and altered area of the Middle Navarre, in the valleys of Aranguren and Egüés, where four years of monitoring have been carried out. The still preliminary results do not generally show processes of population decline.

KEY WORDS: Population monitoring, population census, amphibians, protected natural areas, *Rana dalmatina*, Navarre.

LABURPENA

Duela bi hamarkada baino gehiago hasi ziren Nafarroako anfibio populazioen lehen jarraipenak. *Rana dalmatina* Bonaparte, 1840 izan zen probintzian, bere bost azpipopulazio isolatuetan, errolden bidez monitorizatu zen lehen espeziea. Garai haietako emaitzek ez dute populazioaren beherakadarik hauteman, funtsezkoak izan baitira ugalketa-habitata berreskuratzeko programak eta baso-orbanak (hariztiak) mantentendu izanak, bertan garatzen baita haien lurreko fasea. Ondoren, gune babestuetako anfibioen jarraipena egiten hasi zen, hala nola Urbasa eta Andia mendilerroetako Parke Naturaletan eta Aralar mendilerroko eta Orreaga-Iratiko oihaneko Kontserbazio Eremu Berezietan. Horietan, kasurik onenean, 14 urteko jarraipen etenak izaten dira. Azken lau urteetan, populazioen erroldak egin dira Nafarroako eremu babesgabe eta eraldatuetan, Aranguren eta Egues ibarretan hain zuzen. Emaitzek, oraindik behin-behinekoak, ez dute oro har populazioaren gainbehera-prozesurik islatzen.

GAKO-HITZAK: Populazio-jarraipena, populazioen zentsoak, anfibioak, naturgune babestuak, *Rana dalmatina*, Nafarroa.

INTRODUCCIÓN

El seguimiento de las poblaciones de anfibios es una herramienta que se considera imprescindible para la evaluación de su estado de conservación a largo plazo. Tiene claras implicaciones en la gestión de una fauna que desde hace ya unos decenios es conocida por encontrarse en una grave situación de amenaza a escala global. Las causas son muy diversas, entre las que la pérdida de hábitat aparece recogida de forma recurrente (Beebee y Griffiths, 2005; Cushman, 2006; Ficetola *et al.*, 2015).

El método tradicional de seguimiento en anfibios, para analizar su estado de conservación, se basa en la obtención de censos poblacionales repetidos en series temporales largas, siguiendo unos métodos estandarizados de registro y cuantificación que aparecen recogidos en numerosos manuales de uso (véase, por ejemplo, Heyer *et al.*,

https://doi.org/10.21630/mmns.2023.5.04

(cc) BY-NC-ND

1994; Gent y Gibson, 2003). El censo de anfibios en fase adulta puede resultar más resolutivo que el de la fase larvaria para interpretar la situación de las poblaciones, porque su cuantificación presenta una menor variabilidad y mayor fiabilidad en los resultados. El censo de las poblaciones larvarias puede introducir factores de difícil interpretación en ese sentido, debido a que en dicha fase las poblaciones presentan fluctuaciones aleatorias muy relevantes, impredecibles año tras año y que pueden enmascarar el estado real de su dinámica temporal, aunque pueden servir para interpretar la tendencia general seguida por la población. Sin embargo, la continuidad en el tiempo de ambos tipos de censos en una misma población puede generar a largo plazo una acumulación de información capaz de resolver o, al menos, facilitar la interpretación de su tendencia, de manera que la combinación de datos cuantificados de adultos y larvas puede resultar útil y beneficiosa para el fin último que suele perseguir este tipo de seguimientos, aplicados a la gestión de poblaciones amenazadas.

Hasta finales de la década de 1980 no se empezó a registrar en Navarra información sobre la presencia de especies para el conjunto de anfibios (Gosá y Bergerandi, 1994), y mucho menos del estado de sus poblaciones. A partir de entonces se sucedieron los informes técnicos y algunos estudios de distribución local de especies y de conservación, que finalmente confluyeron y dieron origen a los primeros proyectos de seguimiento de poblaciones. El primero de ellos se inició en 1997 con una especie muy poco conocida en Navarra, pero de la que pronto se sospechó que se encontraba en una situación precaria y amenazada: *Rana dalmatina* Bonaparte, 1840 (Gosá, 2002). A partir de entonces se investigó la distribución de la especie en el territorio y se amplió el seguimiento al conjunto de sus subpoblaciones, que se encontraban aisladas. Se analizó su estructura genética, lo que dio lugar a la detección de una incipiente diferenciación entre los distintos núcleos, debida a la fragmentación (Sarasola-Puente *et al.*, 2012). El seguimiento se realizó en dos espacios protegidos de la Red Natura 2000 (Zonas Especiales de Conservación de los Robledales de Ultzama y Basaburua y de la Sierra de Codés) y otras tres zonas no protegidas (valle de Odieta, Cuenca de Pamplona y valle de La Barranca) (Fig. 1). La especie fue censada anualmente desde 1997 hasta 2014 por la Sociedad de Ciencias Aranzadi en más de 70 puntos de reproducción repartidos entre sus cinco subpoblaciones navarras (Gosá *et al.*, 2013; A. Gosá, datos inéditos de 2014). En 2013 el Gobierno de Navarra se responsabilizó de los censos, encargándose de los mismos a partir de entonces sus guardas medioambientales, bajo supervisión de la Sociedad de Ciencias Aranzadi. Desde entonces el seguimiento se viene aplicando en más de 60 masas de agua, algunas de las cuales no estuvieron incluidas en la

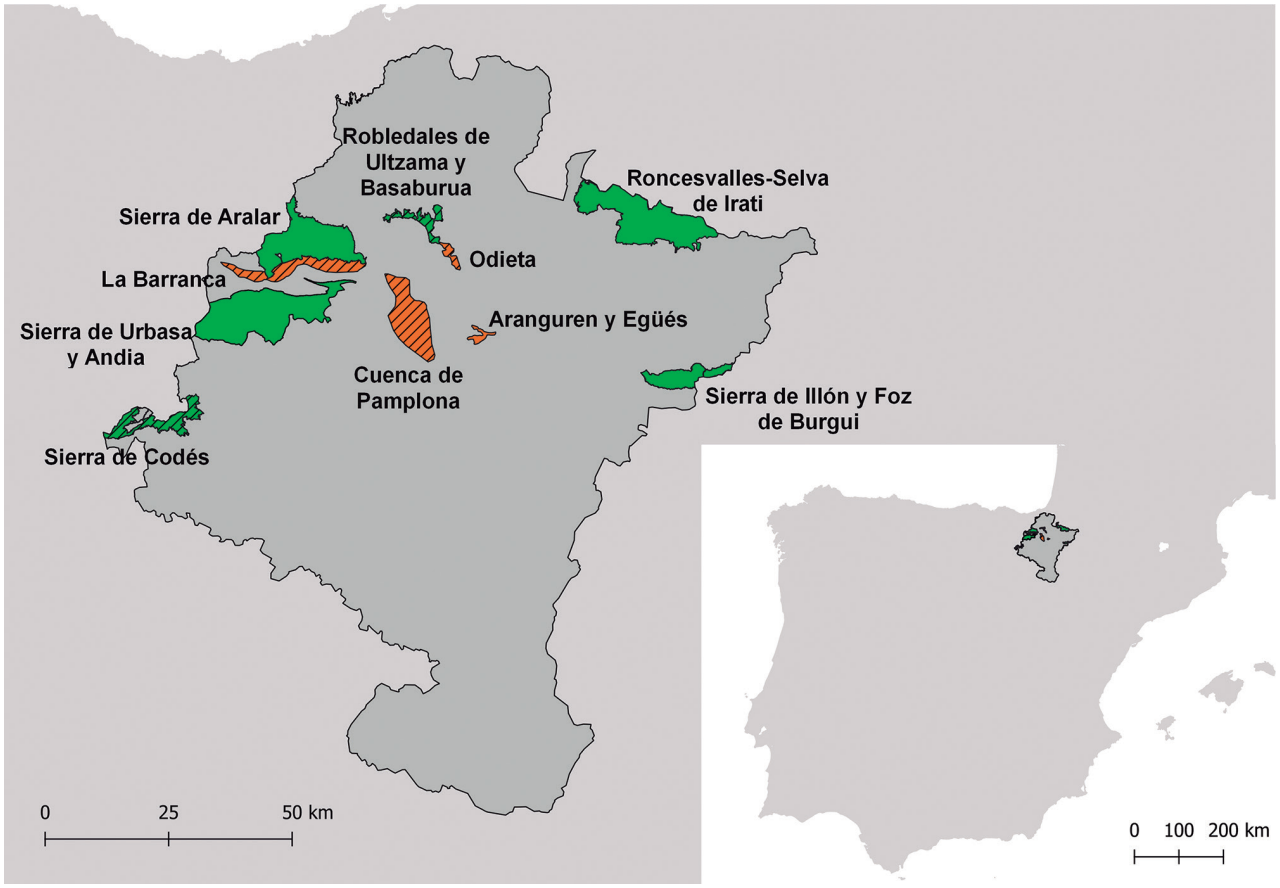

Fig. 1. - Ubicación de las zonas donde se ha realizado el seguimiento de anfibios en Navarra. En verde espacios protegidos; en naranja espacios no protegidos; barras: seguimiento de *Rana dalmatina*.

primera etapa, recogiéndose sus resultados en el presente estudio. Considerando los puntos de reproducción objeto de seguimiento para las dos etapas, se supera largamente la cifra de 100 en los que, al menos, se ha registrado la reproducción en un año, es decir, que han sido utilizados en algún momento por la especie. Muchos de ellos corresponden a humedales creados expresamente para la ampliación y mejora de su hábitat de reproducción en los últimos 20 años.

Los restantes seguimientos emprendidos se han enfocado principalmente al censo del conjunto de especies de las respectivas comunidades de anfibios en diversos enclaves, y no sólo de sus especies catalogadas, cubriendo una parte limitada del territorio navarro, que se extiende entre la zona pirenaica, las sierras occidentales y el centro de la provincia. La mayor parte de los seguimientos ha tenido lugar en espacios protegidos, como el Parque Natural de las Sierras de Urbasa y Andía o las Zonas Especiales de Conservación (ZECs) de la sierra de Aralar y de Roncesvalles-Selva de Irati (Gosá *et al*., 2019). No obstante, alguno se ha dirigido al conjunto de la comunidad bajo el paraguas de una especie protegida, como es el caso de *Ichthyosaura alpestris* (Laurenti, 1768) en la sierra de Aralar (Gosá, 2018), o de *Calotriton asper* (Dugès, 1852) en el Pirineo (Gosá *et al*., 2018a). El último de los seguimientos iniciados está teniendo lugar en la comunidad anfibia de una zona no protegida, en los valles de Aranguren y Egüés (Gosá, 2020) (Fig. 1).

MATERIAL Y MÉTODOS

Las estimaciones se obtuvieron siguiendo una metodología que ha sido ampliamente expuesta en estudios ya publicados para las poblaciones navarras de anfibios y de su entorno (véase por ejemplo Gosá *et al*., 2018b y 2019). Resumiendo mucho, los registros, que en todos los casos fueron diurnos, se obtuvieron básicamente siguiendo dos metodologías diferenciadas, dependiendo del tipo de hábitat donde se realizaran. En ambientes lénticos (charcas u otros tipos de microhumedales, incluidos depósitos artificiales) los datos se obtuvieron por observación directa, escuchas o capturas mediante mangueo con salabre. Los muestreos se realizaron desde las orillas del humedal o en su interior, en visitas repetidas a lo largo de la estación reproductora de los anfibios (generalmente entre finales de invierno y comienzos de verano), durante varios años, sucesivos o con periodos de descanso. El diámetro mayor de los humedales muestreados estuvo comprendido habitualmente entre 5 y 30 metros. Se prestó especial atención a la repetición de las características del censo en cada visita, dependiendo de los condicionantes de cada humedal, para estandarizar la toma de registros y poder finalmente aplicar en condiciones de fiabilidad las pruebas estadísticas de comparación de resultados interanuales y entre humedales. Independientemente de la duración de cada visita, los resultados absolutos se trasformaron en abundancias máximas (censo mayor obtenido en cualquiera de las repeticiones) relativizadas a 20 minutos de muestreo en cada humedal.

En ambientes lóticos (cauces secundarios de montaña) los registros se obtuvieron siguiendo transectos en el interior y orillas de los arroyos, en tramos seleccionados al efecto de 150-600 metros de longitud. Como en el caso de las charcas, se realizaron diversas visitas a cada cauce durante la estación reproductora de los anfibios, en años sucesivos o con periodos intermedios de descanso. Para realizar los análisis estadísticos en condiciones estandarizadas, los datos absolutos de abundancia máxima obtenidos se trasformaron en índices kilométricos de abundancia (IKA: número máximo de individuos / km de cauce). Tanto en charcas como en cauces los resultados de los censos se calcularon y han sido expresados separadamente para las dos fases vitales de los anfibios: la aérea (metamórfica, juvenil y adulta) y la acuática (larvas).

Entre 1997 y 2020 las diversas subpoblaciones de *R. dalmatina* fueron censadas entre una y cuatro o cinco veces por charca y año, repitiéndose excepcionalmente los censos en algunas masas de agua en siete, nueve o quince ocasiones. El número de charcas censadas por año fue variable, y en la mayor parte de subpoblaciones se superó el número mínimo de diez, que puede ser una referencia a tener en cuenta en cuanto a esfuerzo de prospección, para obtener resultados fiables. Cuando no se alcanzó ese umbral de humedales fue debido a la falta de disponibilidad en la zona. La subpoblación con menos charcas censadas, por este motivo, fue la del valle de Odieta, que no superó las cuatro masas de agua; por el contrario, en la subpoblación de la ZEC Robledales de Ultzama y Basaburua se llegó a censar en más de 60 humedales (Gosá *et al*., 2013). Los porcentajes medios de ocupación de la especie en las charcas fueron calculados introduciendo en la muestra contabilizada las charcas que al menos un año fueron utilizadas para la reproducción, aunque en años sucesivos no lo fueran, como consecuencia de la conducta metapoblacional del anfibio. Este uso indistinto de los humedales, año tras año, y la progresiva creación de humedales para su reproducción en la mayor parte de los territorios donde está presente, aconsejó reducir las diferentes comparaciones estadísticas exclusivamente a las muestras de humedales con presencia de la especie en, al menos, uno de los años censados, eliminando del cómputo los humedales que, aun estando disponibles para la especie, nunca fueron utilizados para la reproducción. Los censos se establecieron contabilizando el número de puestas realizadas por las hembras en cada masa de agua durante los sucesivos años de muestreo, de manera que las estimaciones poblacionales se enfocaron al segmento de las hembras, siendo expresadas generalmente en términos de número medio de puestas por charca / año o para el conjunto de charcas de cada subpoblación.

En el Parque Natural de las Sierras de Urbasa y Andía se censaron hasta 76 humedales al menos una vez, si bien no todos ellos fueron muestreados todos los años en que se realizaron los censos, extendidos entre 2004, 2011 y 2013-2018. En Urbasa se repitieron entre una y cinco veces en un mismo año, y en Andía entre una y tres. En la ZEC de la Sierra de Aralar se censaron entre una y cinco veces por año hasta 27 humedales en 2004, 2016 y 2018, tampoco todos

ellos en el mismo año. En la ZEC de Roncesvalles-Selva de Irati el muestreo se efectuó anualmente entre 2011 y 2018 (excepto 2016), en tramos seleccionados de cinco arroyos, que fueron visitados entre una y tres veces por año (Gosá *et al*., 2019). En Aranguren-Egüés se censaron anualmente, entre 2017 y 2020, 27 masas de agua, de una a nueve veces por año (Gosá, 2020).

El análisis estadístico aplicado fue descriptivo, a partir de la comparación de medias interanuales en los distintos territorios y poblaciones, mediante pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney) y paramétricas (ANOVA, test t).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Censo de Rana dalmatina

Para reproducirse, *R. dalmatina* ocupó asiduamente los humedales disponibles en cada subpoblación, presentando porcentajes medios muy diferentes entre ellas (Tabla 1; Kruskal-Wallis: H = 27,01; P < 0,0001). El número de puestas mostró diferencias significativas entre subpoblaciones (Kruskal-Wallis. H = 24,54; P = 0,00006; Fig. 2), correspondiendo el valor más bajo a la subpoblación de Odieta, cuya media de puestas / charca fue significativamente menor que en el resto de subpoblaciones (Mann-Whitney: U = 0 - 17; P < 0,003), y el más alto a la de la Cuenca de Pamplona, donde superó las 40 puestas / charca (Tabla 2). La media de puestas en Ultzama-Basaburua también fue significativamente menor que en la Cuenca de Pamplona (U = 92; P = 0,010).

En la subpoblación de la ZEC Robledales de Ultzama y Basaburua se produjeron variaciones significativas en el número de puestas por charca entre años, resultando la media menor en 2013 (8,15 puestas / charca) y la mayor en 2019 (55,11 puestas / charca). Las mayores diferencias se detectaron entre las medias de 2002 y las de 2005 a 2013, que fueron superiores en 2002, y las de 2017 frente a las de 2006 y 2009 a 2013, que fueron igualmente superiores en 2017 (Mann-Whitney; Tabla 3). En el análisis de esta subpoblación no se tuvo en cuenta ningún año el núcleo localizado en la Balsa de Auza (valle de Ultzama), el más densamente poblado de toda la ZEC Robledales de Ultzama y Basaburua, porque solamente fue censado en dos ocasiones durante la serie temporal de censos: 2004, cuando se contabilizaron 398 puestas, y 2005, con 854 puestas. Previamente a esta serie se había censado en 1994, contabilizándose entonces 638 puestas (Gosá, 1994).

A partir del número de puestas contabilizado en las charcas de cada subpoblación se hicieron estimaciones del número total de puestas en ellas y, aditivamente, en el conjunto de la población navarra (machos y hembras adultos). La estabilidad de la sex-ratio conocida para la especie en su ámbito europeo fue ratificada para la población navarra, a partir de estimaciones realizadas en la subpoblación de la ZEC Robledales de Ultzama y Basaburua entre los años 2002 y 2007. La sex-ratio media obtenida, que fue de 2,16 machos por cada hembra (EE = 0,06; n = 5; rango: 2,00-2,31; Gosá y Sarasola, 2008), se utilizó en los distintos cálculos de los tamaños totales de machos en cada subpoblación, así como para el conjunto de la población navarra.

	Odieta	ZEC Ultzama	Cuenca	Barranca	ZEC Codés
Media	67,64	68,88	95,56	85,72	90,43
EE	6,46	3,83	2,30	3,97	3,42
N (años)	17	21	22	17	23
Rango	0-100	42,42-100	66,67-100	50-100	50-100

Tabla 1. - Porcentaje medio de charcas/año por subpoblación con reproducción de *Rana dalmatina*, para el conjunto de años censados en cada una.

	Odieta	ZEC Ultzama	Cuenca	Barranca	ZEC Codés
Media	5,93	21,74	40,65	25,34	30,03
EE	0,91	2,58	5,94	4,19	3,73
N (años)	8	20	18	17	17
Rango	1-9	8,15-55,11	11-107,5	3,3-64,19	4-53

Tabla 2. - Media de puestas por charca para cada subpoblación de *Rana dalmatina* en el conjunto de años.

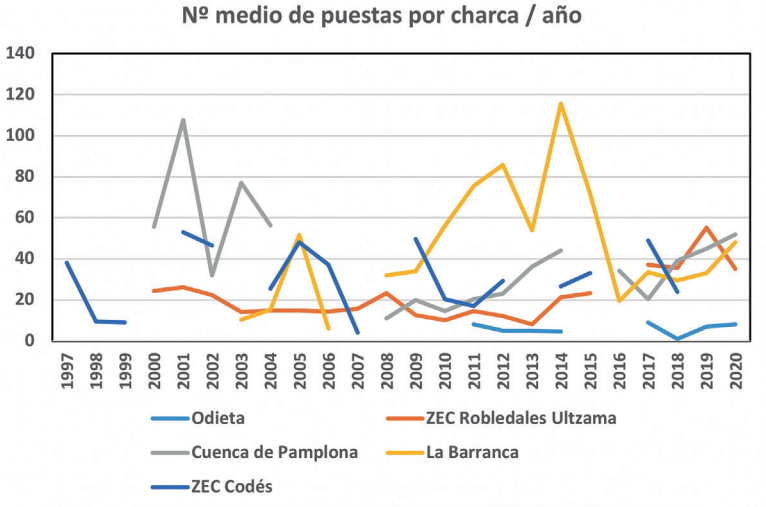

Fig. 2. - Media de puestas por charca y año en las subpoblaciones de *Rana dalmatina*.

Subpoblación	Años	Mann-Whitney	Probabilidad
ZEC Robledales de Ultzama y Basaburua	2002 > 2005 a 2013	U = 54,5 - 156,5	P < 0,042
	2005 < 2020	U = 45,5	P = 0,037
	2006 < 2017, 2020	U = 39,5 - 62	P < 0,041
	2009 < 2017	U = 148	P = 0,034
	2010 < 2017, 2020	U = 88,5 - 133,5	P < 0,031
	2011 < 2017, 2020	U = 119,5 - 204,5	P < 0,046
	2012 < 2017, 2020	U = 103,5 - 165	P < 0,035
	2013 < 2014, 2017, 2020	U = 82 - 415	P < 0,030
La Barranca	2014 > 2016, 2019	U = 2 - 4	P < 0,037

Tabla 3. - Significación estadística de las diferencias en las medias del número de puestas / año en las dos únicas subpoblaciones de *Rana dalmatina* donde se detectaron variaciones.

En los primeros años de seguimiento (finales de la década de 1990 e iniciales de la de 2000) no se censaron todas las subpoblaciones. Salvo en la subpoblación de Odieta, donde el número de humedales fue siempre muy pequeño, en las restantes se fueron introduciendo progresivamente más humedales en el seguimiento, que en muchos casos se fueron creando dentro del programa de conservación de la especie. Por ello, se eliminaron de la estimación de la población total esos primeros años. El aumento del número de humedales considerados según avanzaba el seguimiento ha podido condicionar algunas estimaciones de la población total de los años finales, produciendo algún tipo de sesgo que explicaría la apreciación de un posible crecimiento en alguna de las subpoblaciones, pero la variabilidad de la presencia interanual de la especie en los humedales, dada su conducta metapoblacional, ha podido, por el contrario, compensar hasta cierto punto ese posible sesgo, de manera que, con la prudencia debida, puede admitirse que los resultados sobre los que se basa el análisis de la tendencia de las poblaciones resultan lo suficientemente fiables para explicar correctamente la evolución temporal de la especie en Navarra durante las dos últimas décadas.

El tamaño medio de las subpoblaciones fue muy variable, con diferencias altamente significativas entre ellas (Kruskal-Wallis: H = 54,83; P < 0,00001). Sólo los tamaños poblacionales medios en la Cuenca de Pamplona y La Barranca, de en torno a los 600 individuos, resultaron semejantes (t = -0,078; P = 0,938). La subpoblación más numerosa e importante de Navarra fue la de la ZEC Robledales de Ultzama y Basaburua, superando en promedio los 1.200 individuos y acercándose algunos años a los 3.000, sin incluir en ningún caso los datos censales de la Balsa de Auza (Ultzama). Por el contrario, la subpoblación de Odieta apenas llegó a superar algún año el centenar de individuos (Tabla 4). Sólo en los dos años finales del seguimiento (2019-2020) la estimación total de la población navarra de *R. dalmatina* superó largamente los 5.000 individuos (Fig. 3).

	Odieta	ZEC Ultzama	Cuenca	Barranca	ZEC Codés
Media	40,11	1.299,45	616,00	638,76	227,78
EE	6,92	172,10	132,27	123,15	29,00
N (años)	17	20	19	17	19
Rango	0-101	32-2.961	70-1.973	38-1.671	22-464

Tabla 4. - Tamaño medio de las subpoblaciones (machos y hembras adultos) de *Rana dalmatina* a lo largo del periodo de seguimiento.

Censo de Calotriton asper en la ZEC Sierra de Illón-Foz de Burgui

Calotriton asper es una especie cuyo seguimiento ha tenido principalmente lugar en la ZEC pirenaica de Roncesvalles-Selva de Irati, dentro del programa de censos desarrollado en ella para el conjunto de su comunidad de anfibios. Ahora bien, en otra ZEC pirenaica, la de la Sierra de Illón-Foz de Burgui se ha seguido la especie en tres años repartidos entre 2012 y 2018 (Gosá *et al.*, 2018a). El censo se llevó a cabo en un tramo del Barranco de la Foz (Benasa), afluente del río Salazar, y si bien la serie temporal es todavía muy corta, los datos de los índices kilométricos de abundancia de adultos obtenidos no detectan tendencia negativa en la población instalada en ese cauce (Tabla 5).

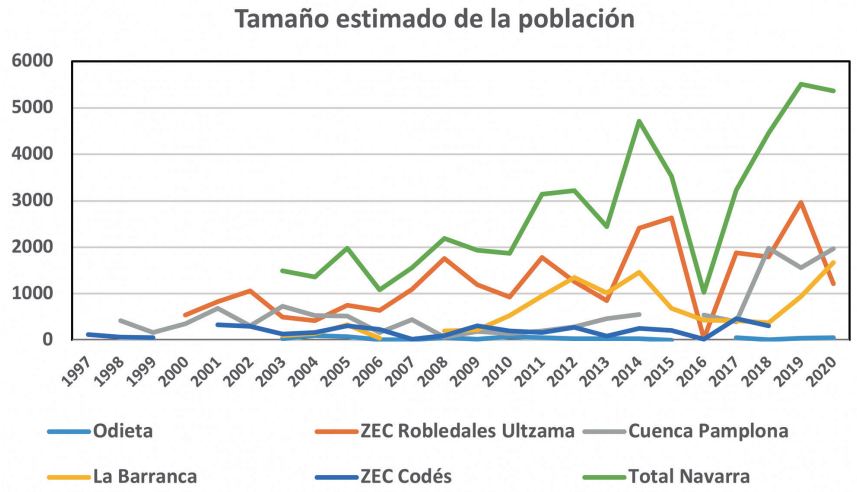

Fig. 3. - Estimación de la evolución del tamaño total (machos y hembras) de las subpoblaciones y del conjunto de la población navarra de *Rana dalmatina* durante los años de seguimiento.

ADULTOS	2012	2013	2018
ZEC Sierra de Illón-Foz de Burgui (Barranco de la Foz)	62,26	52,53	112,11

Tabla 5. - Abundancias máximas de *Calotriton asper* adultos (IKA: nº individuos / km de cauce) obtenidas en tres años de censo poblacional en la ZEC Sierra de Illón-Foz de Burgui.

Censos de anfibios en espacios protegidos

Parque Natural de las Sierras de Urbasa y Andía

El seguimiento de anfibios en el Parque Natural de las Sierras de Urbasa y Andía se llevó a cabo a lo largo de ocho años entre 2004, 2011 y 2013-2018 (Gosá *et al.*, 2018b). El número de humedales donde se realizaron los censos de las poblaciones adultas en los diferentes años varió en cada especie, fluctuando entre 3 y 23 para *Lissotriton helveticus* (Razoumowsky, 1789), 3 y 19 para *Triturus marmoratus* (Latreille, 1800) e *Ichthyosaura alpestris*, 3 y 13 para *Alytes obstetricans* (Laurenti, 1768), 0 y 4 para *Bufo spinosus* Daudin, 1803, 0 y 7 para *Epidalea calamita* (Laurenti, 1768), 1 y 8 para *Hyla molleri* (Bedriaga, 1889) y 3 y 19 para *Pelophylax perezi* (Seoane, 1885). Dichas poblaciones presentaron tasas de abundancia máxima media con diferencias interespecíficas altamente significativas (Kruskal-Wallis: H = 50,03; P < 0,0001; Fig. 4). Las más abundantes fueron las de ciertos tritones, en especial la de *L. helveticus,* que presentó una media interanual superior a los 80 individuos por charca observados en 20 minutos de muestreo. *Ichthyosaura alpestris* también mostró densidades relativamente altas (Tabla 6).

De las poblaciones larvarias sólo se dispuso de censos para un máximo de tres años (2004, 2011 y 2017). El número de humedales donde se realizaron varió interanualmente, entre 2 y 4 para *Salamandra salamandra* (Linnaeus, 1758), 7 y 22 para *L. helveticus*, 5 y 10 para *T. marmoratus*, 4 y 11 para *I. alpestris*, 7 y 20 para *A. obstetricans*, 4 para *E. calamita*, 3 para *Pelodytes punctatus* (Daudin, 1802), 3 y 13 para *H. molleri*, 2 y 9 para *Rana temporaria* Linnaeus, 1758 y 7 para *P. perezi*. Las abundancias máximas medias no presentaron variaciones entre especies (Kruskal-Wallis: H = 12,85; P = 0,169; Fig. 4), si bien las mayores correspondieron a *A. obstetricans* y *H. molleri* (Tabla 6).

ZEC de la Sierra de Aralar

El seguimiento en la ZEC de la Sierra de Aralar se llevó a cabo a lo largo de cuatro años (2004, 2016, 2018 y 2020), si bien no todas las especies fueron censadas en todos

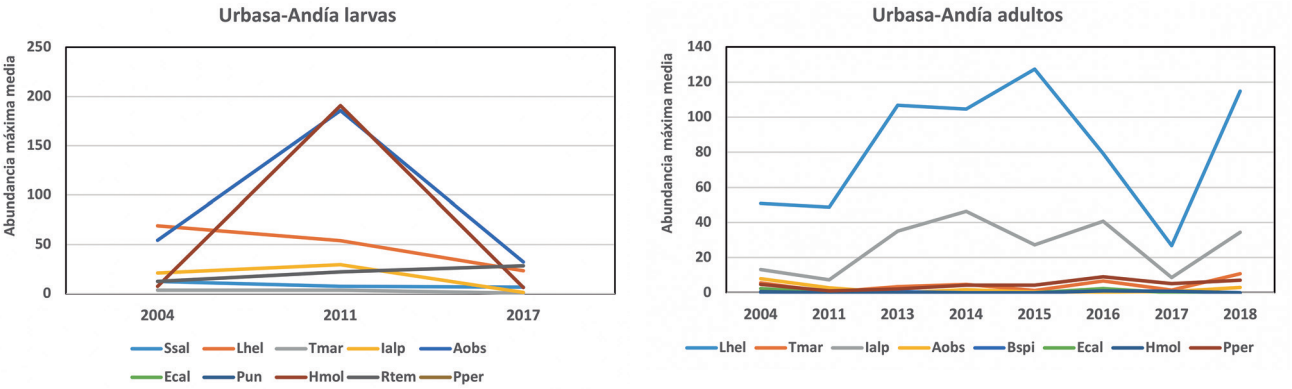

Fig. 4. - Abundancias máximas medias interanuales de las poblaciones adultas y larvarias en el Parque Natural de las Sierras de Urbasa y Andía (20 minutos de muestreo). Ssal: *Salamandra salamandra*; Lhel: *Lissotriton helveticus*; Tmar: *Triturus marmoratus*; Ialp: *Ichthyosaura alpestris*; Aobs: *Alytes obstetricans*; Bspi: *Bufo spinosus*; Ecal: *Epidalea calamita*; Ppun: *Pelodytes punctatus*; Hmol: *Hyla molleri*; Rtem: *Rana temporaria*; Pper: *Pelophylax perezi.*

ADULTOS	Ssal	Lhel	Tmar	Ialp	Aobs	Bspi	Ecal	Ppun	Hmol	Rtem	Pper
Media		82,36	4,27	26,57	2,07	0,31	0,57		0,30		4,68
EE		12.94	1,20	5,34	0,92	0,13	0,37		0,15		0,89
N (años)		8	8	8	8	8	8		8		8
Rango		26,78-127,33	0,40-10,66	7,33-46,33	0-7,92	0-1	0-2,33		0-1		1-9
LARVAS											
Media	8,75	48,60	2,44	17,25	90,60		52,37	25	68,03	20,99	3,92
EE	1,77	13,31	1,07	8,36	47,91		49,87	25	61,31	4,61	3,35
N (años)	3	3	3	3	3		2	2	3	3	2
Rango	6,5-12,25	23,42-68,68	0,3-3,6	1,27-29,50	32,05-185,57		2,5-102,25	0-50	6,07-190,66	12,55-28,44	0,57-7,28

Tabla 6. - Abundancias máximas medias de las poblaciones adultas y larvarias para el conjunto de años de seguimiento en el Parque Natural de las Sierras de Urbasa y Andía. Ssal: *Salamandra salamandra*; Lhel: *Lissotriton helveticus*; Tmar: *Triturus marmoratus*; Ialp: *Ichthyosaura alpestris*; Aobs: *Alytes obstetricans*; Bspi: *Bufo spinosus*; Ecal: *Epidalea calamita*; Ppun: *Pelodytes punctatus*; Hmol: *Hyla molleri*; Rtem: *Rana temporaria*; Pper: *Pelophylax perezi.*

ellos. El número de humedales donde interanualmente fueron censadas las especies fue variable, fluctuando en las poblaciones adultas entre los 7 y 15 para *L. helveticus*, 2 y 7 para *T. marmoratus*, 7 y 11 para *I. alpestris* y 2 y 6 para *R. temporaria*. Los censos más destacados afectaron principalmente a las poblaciones de tritones. Las abundancias máximas medias presentaron diferencias muy significativas entre especies ($F_{3,10}$ = 10,39; P = 0,002; Fig. 5), siendo la de *L. helveticus* la población con mayores densidades medias por charca, superando los 45 individuos. La de *I. alpestris* también presentó abundancias relativamente altas (Tabla 7).

Los tamaños de muestra de los humedales donde se censaron las poblaciones larvarias fluctuaron interanualmente entre 4 y 7 para *S. salamandra,* 6 y 11 para *A. obstetricans* y 5 y 11 para *R. temporaria*. Las tasas de abundancia máxima media fueron significativamente diferentes entre especies ($F_{2,9}$ = 23,62; P = 0,0002; Fig. 5), siendo las menores las de *S. salamandra* (Tabla 7).

ZEC de Roncesvalles-Selva de Irati

Los censos en la ZEC de Roncesvalles-Selva de Irati abarcaron el periodo comprendido entre 2011 y 2018, con la excepción de 2016, año en que no pudieron realizarse. El seguimiento, expresado en forma de IKA (nº de individuos / km de cauce), se efectuó en cinco arroyos, que fueron utilizados de manera dispar por las poblaciones adultas de las especies, con estimaciones significativamente diferentes (véase Gosá *et al.*, 2018b). La especie más recurrente en los arroyos fue *C. asper,* detectada en todos ellos durante la mayor parte de años con abundancias máximas que sobrepasaron con frecuencia los 100 individuos / km en la mayor parte de ellos (Tabla 8). Se detectaron pocas variaciones entre años para todas las poblaciones (Gosá *et al.*, 2018b).

La detección de individuos adultos de las especies que sólo acuden al agua de los arroyos durante la estación reproductora se hizo difícil, por no coincidir plenamente el periodo de censo con su presencia en los mismos o no haberse realizado en horas nocturnas (las de máxima actividad de los anfibios), lo que sin duda habrá producido sesgos a la baja en las estimaciones. Sin embargo, la detección y censo de poblaciones larvarias en condiciones normales demostró el uso habitual que las especies hicieron de los arroyos para reproducirse. El censo de las poblaciones en fase acuática sirvió para compensar de alguna manera el déficit detectado en las poblaciones adultas, complementando las estimaciones. Como en las poblaciones adultas, las larvarias utilizaron igualmente de manera variable los cauces, produciéndose entre ellas estimaciones significativamente diferentes (véase Gosá *et al.*, 2018b). Un grupo amplio de especies (*B. spinosus, A. obstetricans, S. salamandra, Rana pyrenaica* Serra-Cobo, 1993) mantuvo po-

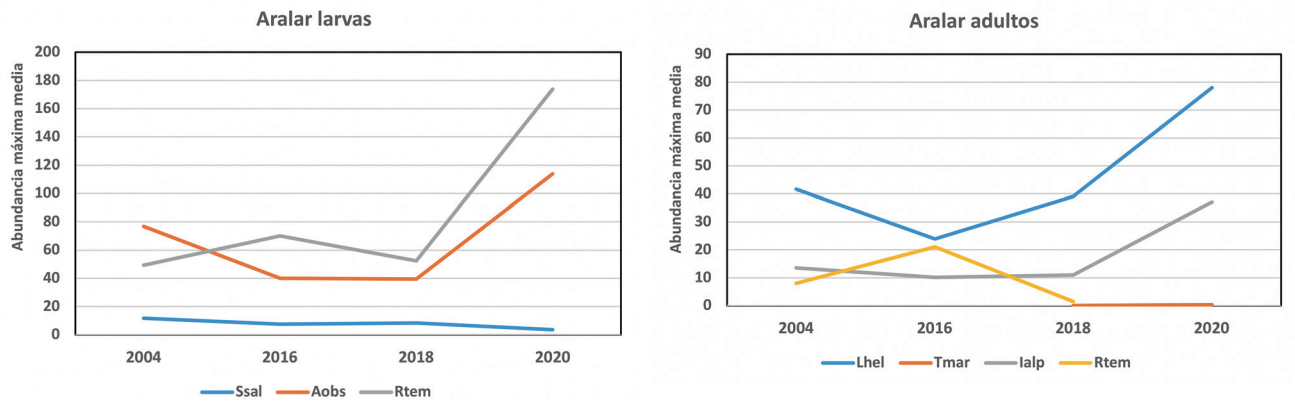

Fig. 5. - Abundancias máximas medias interanuales de las poblaciones adultas y larvarias en la ZEC de la Sierra de Aralar (20 minutos de muestreo). Ssal: *Salamandra salamandra*; Lhel: *Lissotriton helveticus*; Tmar: *Triturus marmoratus*; Ialp: *Ichthyosaura alpestris*; Aobs: *Alytes obstetricans*; Rtem: *Rana temporaria.*

ADULTOS	Ssal	Lhel	Tmar	Ialp	Aobs	Rtem
Media		45,67	1,42	17,95		10,16
EE		11,47	1,28	6,43		5,73
N (años)		4	3	4		3
Rango		23,88-78	0-4	10,12-37,14		1,5-21
LARVAS						
Media	7,65				67,43	86,30
EE	1,65				17,71	29,54
N (años)	4				4	4
Rango	3,42-11,50				39,40-113,71	49,18-173,85

Tabla 7. - Abundancias máximas medias de las poblaciones adultas y larvarias para el conjunto de años de seguimiento en la ZEC de la Sierra de Aralar. Ssal: *Salamandra salamandra*; Lhel: *Lissotriton helveticus*; Tmar: *Triturus marmoratus*; Ialp: *Ichthyosaura alpestris*; Aobs: *Alytes obstetricans*; Rtem: *Rana temporaria.*

Arroyo	Año	IKA/Adultos						
		Ssal	Casp	Lhel	Aobs	Bspi	Rtem	Rpyr
Erlán	2011	0	193	2	2	4	2	
	2012	0	180	2	0	0	0	
	2013	0	153	0	0	0	0	
	2014	0	75	0	0	0	0	
	2015	0	128	0	0	0	0	
	2017	2	145	0	0	0	0	
	2018	0	396	13	0	0	0	
Morate	2011	0	491	0		0		0
	2012	0	0	0		0		0
	2013	0	90	9		0		0
	2014	0	42	0		0		5
	2015	0	132	5		0		5
	2017	0	24	0		0		5
	2018	9	198	0		5		0
Zabaleta	2011	0	15			2	2	0
	2012	0	0			0	0	0
	2013	0	4			4	2	0
	2014	2	0			0	0	0
	2015	0	0			20	2	0
	2017	0	4			0	0	2
	2018	11	15			9	0	2
Loibeltza	2011	50	71	29	21	17	8	4
	2012	0	50	0	0	0	0	0
	2013	0	0	8	0	0	0	0
	2014	0	0	4	0	0	0	0
	2015	0	0	37	0	8	0	0
	2017	0	33	17	0	4	4	0
	2018	17	120	50	4	95	8	54
Ler	2011	38	0	16	0	9	4	13
	2012	0	4	7	0	0	0	0
	2013	0	16	36	0	27	0	0
	2014	0	0	7	0	0	0	0
	2015	0	0	0	0	0	0	0
	2017	0	4	0	0	16	0	25
	2018	0	56	67	2	2	2	2

Tabla 8. - Abundancia máxima (IKA: nº individuos / km de cauce) interanual de las poblaciones adultas de las distintas especies en los cinco arroyos donde se realizaron los censos en la ZEC de Roncesvalles-Selva de Irati (Erlán, Morate, Zabaleta, Loibeltza y Ler). Ssal: *Salamandra salamandra*; Casp: *Calotriton asper*; Lhel: *Lissotriton helveticus*; Aobs: *Alytes obstetricans*; Bspi: *Bufo spinosus*; Rtem: *Rana temporaria*; Rpyr: *Rana pyrenaica*.

blaciones larvarias en la mayor parte de los arroyos durante el periodo censado, sin presentar variaciones apreciables a lo largo del mismo (Gosá *et al*., 2018b). De manera recurrente se estimaron poblaciones de *B. spinosus* con más de 2.000 larvas / km, en diversos cauces (Tabla 9).

Censos de anfibios en espacios no protegidos

Valles de Aranguren y Egüés

El único enclave no protegido donde se han realizado censos para el conjunto de la comunidad anfibia se ubica en plena matriz cerealista de la Navarra Media, caracterizada por una pérdida histórica de humedales, que ha debido debilitar sus poblaciones, y en un ambiente dominado por el uso de agroquímicos. La creación de humedales para la reproducción de anfibios, en una zona de los valles de Aranguren y Egüés muy próxima a la Cuenca de Pamplona (Fig. 1), ha tenido como objeto revertir esta sospecha de déficit en el hábitat de estas especies. La realización de censos, aunque se encuentren en su etapa inicial por lo reciente de su puesta en práctica (2017), aclarará en el futuro el estado de conservación de la comunidad.

Arroyo	Año	IKA/Larvas						
		Ssal	Casp	Lhel	Aobs	Bspi	Rtem	Rpyr
Erlán	2011	17	2		436	10476	4	164
	2012	44	0		526	7453	0	476
	2013	101	0		451	910	0	10
	2014	2	0		38	67	0	46
	2015	31	0		117	9992	0	63
	2017	10	0		134	7985	0	0
	2018	145	2		283	2218	0	52
Morate	2011	137		0	259	19		1929
	2012	52		0	401	208		623
	2013	33		0	599	42		24
	2014	0		0	0	0		14
	2015	156		0	179	0		241
	2017	57		0	208	5		245
	2018	193		9	47	28		104
Zabaleta	2011	1409			0	0		15
	2012	281			0	2		4
	2013	492			0	0		0
	2014	393			0	0		0
	2015	519			0	0		0
	2017	466			2	15		0
	2018	1099			0	0		0
Loibeltza	2011	705		0	1095	3062		37
	2012	490		0	212	2154		0
	2013	1585		0	755	8		46
	2014	62		0	237	502		17
	2015	627		0	676	432		0
	2017	245		0	1158	1627		0
	2018	427		108	950	54		4
Ler	2011	681	2	0	346	112	199	4308
	2012	141	0	0	533	4513	0	1319
	2013	647	0	22	411	2254	0	221
	2014	179	0	0	98	973	0	1103
	2015	98	0	85	480	9190	0	1299
	2017	51	0	0	636	14324	0	31
	2018	933	0	85	906	8328	0	214

Tabla 9. - Abundancia máxima (IKA: nº individuos / km de cauce) interanual de las poblaciones larvarias de las distintas especies en los cinco arroyos donde se realizaron los censos en la ZEC de Roncesvalles-Selva de Irati (Erlán, Morate, Zabaleta, Loibeltza y Ler). Ssal: *Salamandra salamandra*; Casp: *Calotriton asper*; Lhel: *Lissotriton helveticus*; Aobs: *Alytes obstetricans*; Bspi: *Bufo spinosus*; Rtem: *Rana temporaria*; Rpyr: *Rana pyrenaica.*

En los cuatro años censados el número de humedales ha fluctuado ligeramente entre 18 y 27, en función del ritmo de creación de los mismos e incluyendo todos los años un pequeño número de humedales preexistentes. Cada especie fue censada en un número variable de humedales, fluctuando entre los 11 y 18 en las poblaciones adultas de *L. helveticus,* 2 y 4 para las de *P. punctatus*, 0 y 3 para las de *B. spinosus*, 0 y 2 para las de *E. calamita*, 1 y 2 para las de *H. molleri* y 11 y 23 para las de *P. perezi*. Los bajos números de humedales en diversas especies denotaban el ritmo de acceso a las mismas, que se está produciendo escalonadamente, lo que podría corroborar la sospecha inicial de dispersión y/o escasez en la zona. Las abundancias máximas medias no presentaron diferencias significativas entre especies a lo largo de los cuatro años ($F_{2,8}$ = 2,567; P = 0,137; Fig. 6), siendo *P. perezi* la que alcanzó mayores densidades medias por charca, superando los 25 individuos (Tabla 10).

El número de humedales donde se censaron las poblaciones larvarias también fluctuó entre años. Las de *L. helveticus,* entre 13 y 24, las de *T. marmoratus* entre 1 y 4, las

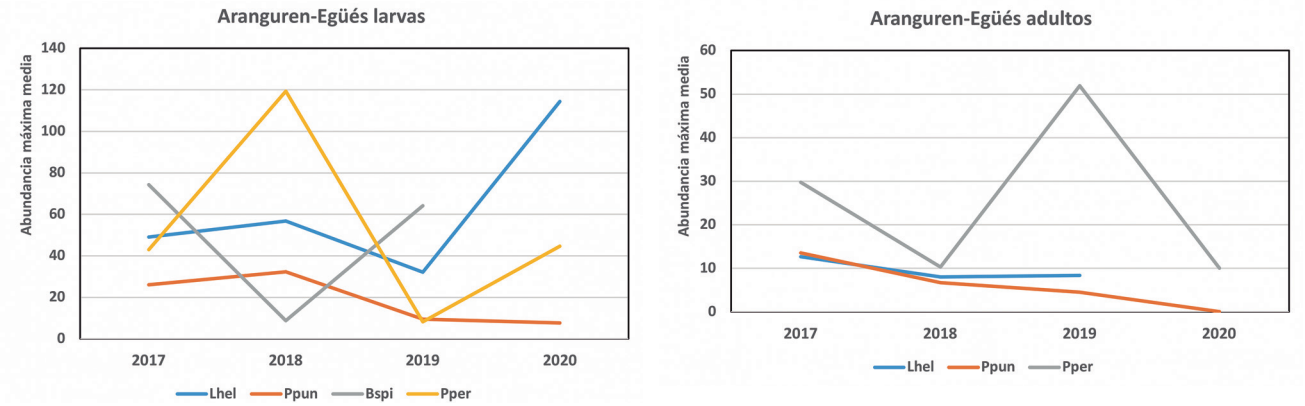

Fig. 6. - Abundancias máximas medias interanuales de las poblaciones adultas y larvarias en los valles de Aranguren y Egüés (20 minutos de muestreo). Lhel: *Lissotriton helveticus*; Ppun: *Pelodytes punctatus*; Bspi: *Bufo spinosus*; Pper: *Pelophylax perezi*.

ADULTOS	Lhel	Ppun	Bspi	Pper
Media	9,69	6,16		25,50
EE	1,48	2,81		9,93
N (años)	3	4		4
Rango	8,05-12,66	0-13,50		10,04-51,90
LARVAS				
Media	63,03	18,87	48,98	53,70
EE	17,84	6,09	20,33	23,40
N (años)	4	4	3	4
Rango	32,1-114,29	7,66-32,33	8,75-74,20	8,1-119,22

Tabla 10. - Abundancias máximas medias de las poblaciones adultas y larvarias para el conjunto de años de seguimiento en los valles de Aranguren y Egüés. Lhel: *Lissotriton helveticus*; Ppun: *Pelodytes punctatus*; Bspi: *Bufo spinosus*; Pper: *Pelophylax perezi*.

de *P. punctatus* entre 3 y 4, las de *B. spinosus* entre 3 y 5 y las de *P. perezi* entre 8 y 14. Los números de humedales utilizados para la reproducción certifican la importancia de la colonización que se está produciendo en estos primeros años de seguimiento, tras la construcción de las masas de agua. No se registraron diferencias significativas entre las respectivas abundancias medias de las especies ($F_{3,11}$ = 1,203; P = 0,354; Fig. 6). Las mayores densidades las alcanzaron las que presentan una mayor capacidad de colonización, como *L. helveticus* y *P. perezi* (Tabla 10).

CONCLUSIONES

Para que los censos poblacionales de anfibios cumplan sus objetivos se requieren series temporales de larga duración en la recogida de datos. No existen plazos prefijados fiables que demuestren la efectividad de los mismos, por lo que poner, por ejemplo, un plazo mínimo de diez años puede resultar insuficiente (véase Montori, 2023), dada la gran variabilidad que incluso de forma natural presentan las poblaciones de muchas especies de anfibios, lo impredecible de los factores ambientales de los que dependen y la intensidad de los efectos de múltiples afecciones que continuamente se están descubriendo, que pueden reducir notablemente cuando no producir errores graves en la interpretación de los resultados. Por todo ello, en sólo diez años de seguimiento muchos de estos fenómenos pueden quedar encubiertos o pasar entera o parcialmente desapercibidos o no suficientemente conocidos, de manera que lo más aconsejable es prolongar los censos durante decenios. Ello conlleva numerosas dificultades, que deberán ser afrontadas por los equipos de seguimiento implicados en el estudio y conservación de las poblaciones. La consecuencia más generalizada de todo esto es que los censos deben ser interpretados, en general, de forma muy prudente, aunque de ellos se deriven las necesarias y posteriores decisiones para la gestión de las poblaciones.

El seguimiento poblacional de anfibios emprendido en Navarra muestra, en términos generales, su juventud. Sólo el de *Rana dalmatina* cuenta, para alguno de sus territorios de colonización, con un par de decenios de actuación, de los que parece extraerse una interpretación de estabilidad para el conjunto de su población. El fundamento de la misma estaría en el abandono de las políticas forestales de gestión de los robledales, que parecen definitivamente eliminadas en cuanto a su sustitución por espacios cultivados, y a la recuperación emprendida con fuerza de los hábitats de reproducción, en forma de charcas de nueva creación diseminadas estratégicamente en buena parte de los territorios de las subpoblaciones regionales de la especie. La línea a seguir ya ha sido abierta, se cuenta con una serie temporal de seguimiento de cierta relevancia, que parece consolidarse desde la administración autonómica. El asentamiento del programa de conservación deberá pasar en el futuro por la conexión espacial de los núcleos poblacionales dispersos, lo que no se antoja tarea fácil, dado el modelo de ordenación territorial vigente, que ha generado extensas áreas de monocultivos que suponen barreras reales al desplazamiento natural de la especie. La recuperación de un hábitat forestal adecuado para sus requerimientos ecológicos, junto con la instalación de humedales en áreas estratégicas de interconexión, deberá ser explorada desde ahora para asegurar la vigencia y consolidación del modelo de gestión emprendido.

El censo poblacional aplicado al conjunto de especies caracterizadoras de los diversos territorios ocupados por los anfibios se encuentra diseminado por zonas de Navarra

que no alcanzan a su totalidad, pero sí al menos a partes representativas de las tres regiones biogeográficas con las que cuenta. De ello pueden extraerse interpretaciones incipientes del estado de sus poblaciones, aunque en estos casos no se cuente con censos tan prolongados como los de la especie anterior. Los censos apenas superan los diez años de edad, por lo que deben afrontarse en términos muy prudentes, por todo lo anteriormente expuesto. Generalmente ofrecen resultados que no detectan modificaciones apreciables en la situación de las poblaciones, desde el inicio de los mismos, tanto en el sentido de crecimiento como en el de decrecimiento. En algunos casos pueden apreciarse descensos significativos, que sólo podrán ser evaluados de forma correcta con la prolongación temporal de los registros. La vía abierta para el seguimiento de comunidades de anfibios en áreas no protegidas y profundamente alteradas, como la que se está poniendo en práctica en la zona de Aranguren-Egüés, necesariamente deberá consolidarse en el tiempo, pudiendo ofrecer resultados contrastables con la situación de esas mismas especies en los espacios protegidos, donde reside el mayor esfuerzo de seguimiento hasta el momento, que hace de ellos los territorios más explorados con ese objetivo.

AGRADECIMIENTOS

Especial mención a compañeros del departamento de Herpetología de la Sociedad de Ciencias Aranzadi, como Vanessa Sarasola y Ariñe Crespo-Diaz, que han colaborado en los censos de *Rana dalmatina*, y a los guardas de Medio Ambiente del Gobierno de Navarra, responsables del registro de datos poblacionales para el programa SARE Anfibios y para el incipiente programa de censos que se está poniendo en práctica en Zonas Especiales de Conservación. La financiación de los seguimientos realizados ha corrido a cargo del Gobierno de Navarra, que ha expedido los oportunos permisos de muestreo, y de su empresa pública Gestión Ambiental de Navarra, S.A., y localmente de ayuntamientos implicados como los de Aranguren y Egüés.

BIBLIOGRAFÍA

Beebee, T.J.C., Griffiths, R.A., 2005. The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology?. Biological Conserv. 125, 271-285.

Cushman, S.A., 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. Biological Conserv. 128, 231-240.

Ficetola, G.F., Rondinini, C., Bonardi, A., Baisero, D., Padoa-Schioppa, E., 2015. Habitat availability for amphibians and extinction threat: a global analysis. Diversity Distrib. 21, 302-311.

Gent, T., Gibson, S. (eds.), 2003. Herpetofauna Workers' Manual. Joint Nature Conservation Committee. Peterborough.

Gosá, A., 1994. Biología reproductiva de la rana ágil, *Rana dalmatina* (Ranidae, Anura), en Navarra. Munibe, Cienc. nat. 46, 97-108.

Gosá, A., 2002. Efectivos poblacionales de la Rana ágil (*Rana dalmatina*) y uso del hábitat reproductor en Navarra. Munibe, Cienc. nat. 53, 205-210.

Gosá, A., 2018. Censo de tritón alpino en la ZEC sierra de Aralar. Campaña 2018. Gobierno de Navarra. Pamplona. Informe inédito, 25 pp.

Gosá, A., 2020. Seguimiento de anfibios en charcas creadas en los valles de Egüés y Aranguren. Campaña 2020. Ayuntamiento del Valle de Egüés y Ayuntamiento de Aranguren. Informe inédito, 29 pp.

Gosá, A., Bergerandi, A., 1994. Atlas de distribución de los Anfibios y Reptiles de Navarra. Munibe, Cienc. nat. 46, 109-189.

Gosá, A., Sarasola, V., 2008. Seguimiento y determinación de la situación de *Rana dalmatina*. Campaña 2008. Gestión Ambiental, Viveros y Repoblaciones de Navarra, S.A. Pamplona. Informe inédito, 26 pp.

Gosá, A., Sarasola, V., Crespo-Diaz, A., 2013. Seguimiento y determinación de la situación de *Rana dalmatina*. Campaña 2013. Gestión Ambiental de Navarra, S.A. Pamplona. Inédito.

Gosá, A., Garin-Barrio, I., Fernández, A., Rubio, X. Cabido, C., 2018a. Estimación de la abundancia poblacional de tritón pirenaico en seis Zonas Especiales de Conservación de Navarra. Gobierno de Navarra. Pamplona. Informe inédito, 63 pp.

Gosá, A., Garin-Barrio, I., Cabido, C., Laza-Martínez, A., Rubio, X., 2018b. Seguimiento de anfibios en espacios protegidos del País Vasco y Navarra. I. Parques Naturales de Izki y Valderejo (Álava). Munibe, Cienc. nat. 66, 129-142.

Gosá, A., Garin-Barrio, I., Rubio, X., Laza-Martínez, A., Cabido, C., Fernández, A., 2019. Seguimiento de anfibios en espacios protegidos del País Vasco y Navarra. II. Parque Natural de las sierras de Urbasa y Andía y Zonas Especiales de Conservación de la sierra de Aralar y Roncesvalles-Selva de Irati (Navarra). Munibe, Cienc. nat. 67, 75-91.

Heyer, W.R., Donnelly, M.A., McDiarmid, R.W., Hayek, L.A., Foster, M.S., 1994. Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for Amphibians. Smithsonian Institution Press. Washington and London.

Montori, A., 2023. Seguimiento de las poblaciones de tritones torrentícolas *Calotriton asper* y *Calotriton arnoldi,* marco conceptual y casos prácticos. Munibe Monographs. Nature Series 5, 61-82.

Sarasola-Puente, V., Madeira, M.J., Gosá, A., Lizana, M., Gómez-Moliner, B., 2012. Population structure and genetic diversity of *Rana dalmatina* in the Iberian Peninsula. Conserv. Genet. 13, 197-209.

Munibe Monographs. Nature Series • 5 (2023) • 61-82 • Donostia-San Sebastián • ISSN 2340-0463 - eISSN 2340-3055

Seguimiento de las poblaciones de tritones torrentícolas *Calotriton asper* y *Calotriton arnoldi*. Marco conceptual y casos prácticos

Monitoring of *Calotriton asper* and *Calotriton arnoldi* stream-dwelling newt populations, a conceptual framework and practical cases

Albert Montori[1]

[1] Life Tritó del Montseny-Diputació de Barcelona - GRENP. Centre de Recerca i Educació Ambiental de Calafell (GRENP-Aj. De Calafell). Segur de Calafell. Barcelona. Correspondencia: amontori@gmail.com

RESUMEN

Existen distintas metodologías para conocer tendencias poblacionales, detectar declives y disponer de los elementos de diagnosis necesarios para la gestión de poblaciones y especies. Hasta hace poco muchos seguimientos sólo valoraban el estado de las poblaciones comparando distribuciones. Sin embargo, es necesario realizar seguimientos a largo plazo teniendo en cuenta que una gran parte de las especies de anfibios tienen una estructura metapoblacional. Estos seguimientos se basan en el censo de ejemplares en los puntos de reproducción por detección de cantos, conteo visual o captura de larvas. Este tipo de metodología es muy útil para especies que habitan fundamentalmente medios lénticos. La dificultad de localizar los ejemplares adultos y sus larvas en medios acuáticos reófilos obliga a realizar seguimientos muy específicos. En este estudio se presentan la metodología empleada en el seguimiento durante 21 años de una población de *Calotriton asper* (Dugès, 1852) en el Parc Natural del Cadí-Moixeró (Barcelona, Girona y Lleida) y la usada para la caracterización de todas las poblaciones del Parque, con el objetivo de determinar las poblaciones clave para realizar seguimientos a largo plazo con costes asumibles. Se describen las distintas tipologías de seguimiento utilizadas en las poblaciones de *Calotriton arnoldi* Carranza & Amat, 2005 dentro del Proyecto Life Tritó del Montseny, y finalmente se exponen los criterios y la metodología de seguimiento utilizados en el proceso de creación de nuevas poblaciones de esta especie catalogada como en peligro crítico.

PALABRAS CLAVE: *Calotriton*, tritones, Urodela, seguimiento, Cadí-Moixeró, Montseny.

ABSTRACT

There are a variety of methodologies to analyse population trends, detect declines in such trends and to obtain the necessary diagnostic elements for the management of populations and species. Until recently, most monitoring methodologies were limited to assessing the species status and comparing distributions. However, long-term monitoring are needed because a large part of amphibian species has a metapopulational structure. These surveys are based on the census of specimens in the reproduction habitats by means of the detection of calls, visual counting or larvae capture. This methodology has proven quite useful for species that mainly inhabit lentic environments. The difficulty of locating adult specimens and their larvae in rheophilic aquatic environments requires very specific monitoring surveys. In this study, we present the methodology used during a 21-year survey of one population of *Calotriton asper* (Dugès, 1852) in the Cadí-Moixeró Natural Park (Barcelona, Girona and Lleida). In addition, we present the methodology used for the characterization of all the populations of the Park in order to determine which streams could be considered key-populations in order to carry out long-term surveys at affordable costs. We then go on to describe the different monitoring surveys designed for *Calotriton arnoldi* Carranza & Amat, 2005 populations within the "Life Tritó del Montseny Project". Finally, we present the criteria and survey methodology used in the process of creating new populations of this species categorized as critically endangered.

KEY WORDS: *Calotriton*, newts, Urodela, survey, Cadí-Moixeró, Montseny.

LABURPENA

Metodologia desberdinak daude populazio-joerak ezagutzeko, gainbeherak detektatzeko eta populazioak eta espezieak kudeatzeko beharrezkoak diren diagnostiko-elementuak edukitzeko. Duela gutxi arte jarraipen askok populazioen egoera baloratzen zuten, soilik banaketak alderatuz. Hala ere, beharrezkoa da epe luzerako jarraipenak egitea, anfibio-espezie askok egitura metapoblazionala baitute. Jarraipen horien oinarria ugaltze-puntuetako aleen errolda da, kantuak hautemanez, aleen zenbaketen bidez edo larbak harrapatuz. Metodologia mota hori oso erabilgarria da, batez ere ingurune lentikoetan bizi diren espezieentzat. Ale helduak eta larbak uretako ingurune erreofiloetan aurkitzea zaila denez, jarraipen oso espezifikoak egin behar dira. Azterlan honetan *Calotriton asper* (Dugès, 1852) espezieko populazio baten 21 urteko jarraipenean erabilitako metodologia aurkezten da, Cadí-Moixeróko Parke Naturalean (Bartzelona, Girona eta Lleida). Horrez gain, parkeko populazio guztien karakterizazioan erabilitako metodologia ere deskribatzen da, epe luzerako jarraipenak kostu onargarriekin egiteko funtsezko populazioak zehazteko helburuarekin. Montsenyko Life Tritó proiektuaren barruan *Calotriton arnoldi* Carranza & Amat 2005 populazioetan erabilitako desberdinak deskribatzen dira. Gainera arrisku kritikoan katalogatutako espezie horren populazio berriak sortzeko prozesuan erabilitako jarraipen-irizpideak eta -metodologia azaltzen dira.

GAKO-HITZAK: *Calotriton*, uhandreak, Urodela, jarraipena, Cadí-Moixeró, Montseny.

https://doi.org/10.21630/mmns.2023.5.05

(cc) BY-NC-ND

INTRODUCCIÓN

Fue en la pasada década de 1980 cuando los investigadores en el campo de la herpetología empezaron a hacerse eco del alarmante descenso de las poblaciones de anfibios a nivel mundial, e incluso de la desaparición de alguna de ellas. El problema de cómo abordar el supuesto declive era que no existían seguimientos a largo plazo de las poblaciones naturales que evidenciaran con datos robustos este aparente declive, ya que eran conocidas las grandes fluctuaciones temporales que de forma natural sufren las poblaciones de anfibios, y aún ahora sigue siendo difícil discernir estas variaciones de las debidas a cambio global (Tejedo, 2003). Si bien es cierto que en la bibliografía científica ya se habían referenciado algunas desapariciones (Wright y Wright, 1949; Bragg, 1960; Jennings y Hayes, 1985), fue necesario que Houlahan *et al*. (2000) y Gardner (2001) recopilaran todos los datos y seguimientos existentes para proporcionar la evidencia científica de que los anfibios estaban desapareciendo en todo el planeta.

El declive generalizado de especies es particularmente grave en los anfibios ya que, actualmente, aproximadamente un 41% de las especies están amenazadas (IUCN, 2020). El estado crítico de los anfibios se debe en gran parte a su vulnerabilidad, como consecuencia de su peculiar ciclo de vida. Con una fase larvaria acuática y una fase terrestre adulta en muchos casos, los anfibios son vulnerables a los impactos que afectan a ambos medios.

No es el motivo central de este artículo desarrollar las múltiples causas que se han aducido para explicar el declive de los anfibios: la alteración, la fragmentación y pérdida de hábitat que causan la fragmentación y el aislamiento de las poblaciones, o la pérdida de calidad ambiental de los ecosistemas, bien sea por la degradación, la contaminación de los sistemas acuáticos y húmedos en general, que dificultan la reproducción, el desarrollo y la supervivencia de los anfibios. A estas causas de disminución de su biodiversidad hay que añadir también otros motivos de origen más reciente, como el aumento de las especies exóticas, la pérdida de conectividad ecológica, el aumento de la radiación ultravioleta, el cambio climático y, últimamente, la aparición de enfermedades emergentes (Galán, 1999; Bosch *et al*., 2001; Pleguezuelos *et al*., 2002; Temple y Cox, 2009; Catenazzi, 2015).

El estudio de los sistemas naturales es muy complejo, debido al gran número de variables que intervienen en los procesos y que dificultan una visión global y temporal de las tendencias o del estado de la biodiversidad (Nicholson y Possingham, 2006). La solución adoptada y aceptada de forma general es la utilización de indicadores (especies, comunidades, grupos taxonómicos, procesos, etc.), como una estrategia para evaluar el estado de la biodiversidad, detectar cambios y el cumplimiento de objetivos de conservación planteados (Rodrigues y Brooks, 2007). Estos indicadores permiten evaluar total o parcialmente los sistemas ecológicos, por lo que pueden ser considerados como estimadores de la biodiversidad de un sistema, actuando a diferentes niveles jerárquicos (genes, especies, poblaciones, comunidades y paisajes) y determinando sus diferentes componentes (composición, estructura y función; Isasi-Catalá, 2011).

La aceptación de los indicadores como herramientas válidas de evaluación de los sistemas se basa en el supuesto de que el análisis parcial de los elementos de un sistema natural y su inclusión en los programas de gestión nos sirven como elementos de monitorización de los cambios del mismo (Noss, 1990; Dale y Beyeler, 2001). Para que esto sea efectivo los indicadores deben cumplir con ciertas características, tales como: proporcionar respuestas tempranas sobre la presencia de una amenaza, detectar su causa, proporcionar información efectiva, eficiente, fácilmente estimable y robusta (Noss, 1990; Dale y Beyeler, 2001; Isasi-Catalá, 2011). Entre los indicadores más ampliamente utilizados se encuentran los seguimientos a nivel de especie, basados en el estudio de las poblaciones y de la dinámica que las caracteriza como elementos de detección de factores de cambio en los sistemas naturales (Noss, 1990; Redford *et al*., 2003).

El presente estudio tiene como objetivo el reconocimiento de la importancia y necesidad de realizar seguimientos de las poblaciones de anfibios, exponiendo distintas metodologías necesarias para poder conocer tendencias, detectar declives y tener los elementos de diagnosis necesarios para elaborar predicciones y planes de gestión de poblaciones y especies en las fases iniciales de la detección de una amenaza o impacto. Sin embargo, no existe una única tipología de seguimiento por lo que la metodología a utilizar dependerá de la especie, la comunidad, el hábitat o de los objetivos que se pretendan conseguir. Lo que sí es evidente es que detectar y actuar en las fases iniciales de la aparición de una amenaza o declive es clave para poder revertir el problema.

Aunque en los párrafos anteriores ya queda clara la importancia de realizar seguimientos, la pregunta que surge siempre, y más en un grupo zoológico tan denostado como el de los anfibios, es: ¿Por qué debemos hacer seguimientos?

Intentaremos responder a esta pregunta en primer lugar y acto seguido focalizaremos el trabajo en las características generales de los seguimientos, para más adelante describir las características especiales de los seguimientos de los anfibios torrentícolas con tres ejemplos prácticos llevados a cabo sobre dos especies de urodelos, el tritón pirenaico (*Calotriton asper*) y el tritón del Montseny (*Calotriton arnoldi*). Estas dos especies precisan seguimientos sustancialmente distintos a los del resto de anfibios, por tratarse de especies que viven principalmente en medios reófilos, aunque el tritón pirenaico pueda ocupar secundariamente ambientes lénticos de alta montaña.

¿POR QUÉ DEBEMOS REALIZAR SEGUIMIENTOS DE ANFIBIOS?

En primer lugar, y apelando al pragmatismo, porque actualmente existe una obligación legal. La legislación europea en materia de medio ambiente y las distintas leyes y normativas a niveles estatal y autonómico obligan a reali-

zar seguimientos de determinadas especies y hábitats, así como planes de gestión y de recuperación de las especies en peligro (Artículo 17 de la Directiva 92/43/CEE, de Hábitats; Catálogo y Listado (Ley 42/2007, Real Decreto 139/2011) e Inventario Español del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad (Ley 42/2007, Real Decreto 556/2011), por ejemplo). Pero es que, además, actualmente el 41% de las especies de anfibios están catalogadas dentro de alguna de las categorías de amenaza consideradas por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2020); y no sólo eso, sino que desde el inicio de sus informes y valoraciones más de 400 especies de anfibios han aumentado su categoría de amenaza, mientras que sólo cinco la han mejorado. Esto hace que tengamos también una obligación ética de realizar seguimientos ya que, por una parte hace unos 350 millones de años que los anfibios modernos (*Lissamphibia*) ocupan nuestro planeta y, por otra, en la mayor parte de los casos este declive o extinción es debido a factores exclusivamente antrópicos.

Por otra parte, los anfibios se postulan como el grupo de vertebrados más adecuado para realizar seguimientos que nos permitan detectar alteraciones del sistema. Son los bioindicadores de cambio más robustos, debido fundamentalmente a tres características propias:

- Son muy vulnerables a los cambios ambientales como consecuencia de la complejidad de su ciclo biológico, a caballo entre el medio terrestre y el acuático. Su particular biología hace que los anfibios sean sensibles a las alteraciones o cambios en los dos sistemas.
- Son elementos clave de la cadena trófica. Ocupan una posición intermedia en las redes tróficas, al ser al mismo tiempo presas y depredadores. Además, las larvas de los anuros se sitúan en la base de la "pirámide trófica", al ser muchos de ellos fundamentalmente consumidores primarios.
- La permeabilidad de su piel los convierte en bioindicadores de la salud de los ecosistemas, especialmente de la calidad de los medios acuáticos e incluso del aire.

Sin embargo, en conservación se tiende a pensar habitualmente en especies de gran talla, de fácil identificación y asumibles por la población, como especies imprescindibles que bajo la excusa de "especies sucedáneas o paraguas" permiten la conservación de grandes áreas. Pero, ¿qué es una "especie paraguas o sucedánea"? Este concepto fue utilizado por primera vez por Wilcox (1984), quien definió una especie paraguas como aquélla cuyos requisitos mínimos de área son al menos tan completos como los del resto de la comunidad para la que se busca protección. O sea, especies cuyos requisitos abarcan un campo amplio que ofrece protección a otras especies que comparten el mismo hábitat y, por tanto, su protección automáticamente se extiende a la de otras especies. Sin embargo, este concepto suele dirigirse casi exclusivamente hacia vertebrados de gran tamaño, en general socialmente aceptados y que cubren un área grande. Y aquí es donde encontraríamos una de las carencias del uso habitual de este concepto. Si consideramos los anfibios como especies sensibles a cambios, tanto en el hábitat acuático como en el terrestre, en muchos casos de amplia distribución y que, por último, ocupan una posición intermedia o basal en las redes tróficas, ¿no deberíamos pensar que las mejores "especies paraguas" se encontrarían en este grupo? Evidentemente es un tema complejo y de discusión mucho más amplia, pero queda claro que las especies de anfibios serían buenas candidatas para lo que hasta ahora se han considerado como "especies paraguas".

OBJETIVOS DE LOS SEGUIMIENTOS DE ANFIBIOS

Los programas de seguimiento tienen como objeto conocer el estado de conservación de las especies mediante la evaluación periódica de sus poblaciones y la cartografía de su distribución a lo largo del tiempo.

La información obtenida en los seguimientos es vital para poder detectar precozmente el declive de una especie, cambios de tendencia poblacional, y definir y priorizar las medidas de conservación a desarrollar. Permiten además detectar los factores de cambio que producen estos declives, debido a que son especies de ciclo de vida corto y, por tanto, con cambios poblacionales rápidos. De todas formas, como se comentará más adelante, los anfibios funcionan en muchos casos como metapoblaciones y presentan de forma natural fluctuaciones poblacionales importantes, que dificultan determinar si los declives son reales o responden a oscilaciones poblacionales naturales. Esto obliga a efectuar seguimientos a largo plazo o comparar amplios períodos alejados en el tiempo, si queremos obtener una información robusta sobre las tendencias de las poblaciones (Skelly *et al*., 2003; Tejedo, 2003; Gascon *et al*., 2007; Campeny y Villero, 2007; Witmer, 2005; Greenberg *et al*., 2018). Este hecho, añadido a la particular biología y ecología de los anfibios, se traduce en que los seguimientos de este grupo tengan unos requerimientos especiales y obliguen a tomar decisiones en cuanto a su tipología, en función de los objetivos que pretendamos alcanzar (Witmer, 2005). La toma de decisiones es fundamental, ya que el plan de seguimiento elaborado en función de los objetivos propuestos nos ha de permitir:

- Estimar los parámetros demográficos y biológicos básicos para la toma de decisiones (madurez sexual, longevidad, estructura en clases de edad o talla, sex-ratio, tamaño poblacional, migraciones o dispersión).
- Detectar los cambios en la distribución o la fenología de las especies con suficiente antelación.
- Estimar tendencias poblacionales a medio y largo plazo (fluctuaciones, declives, incrementos) para poder analizar la causalidad de estas variaciones temporales.
- Detectar y prever amenazas (impactos o riesgos), para poder actuar con suficiente antelación.
- Determinar las estrategias de gestión al nivel requerido (especie, población, área) y ser capaces de modificarlas en función de los indicadores obtenidos en los seguimientos a largo plazo.

Es fundamental que los seguimientos no sean puntuales y se extiendan en el tiempo con una periodicidad que dependerá de los objetivos pretendidos y la escala a la que se quieren realizar, pero que en ningún caso serán inferiores a los 5-10 años. Los seguimientos podrán realizarse tanto a nivel poblacional, específico, de comunidad, a nivel global o de un área geográfica concreta. Los seguimientos en función de la escala no son excluyentes entre sí, pero los objetivos, resultados obtenidos y causalidades sí son distintas (Montori *et al*., 2007).

Un seguimiento a nivel poblacional o específico puede deberse a motivos distintos, pero suele aplicarse cuando existe un gran desconocimiento de la biología, ecología y situación de una especie en una zona determinada. Este tipo de seguimiento puede solaparse con otros de objetivos más generales, pero el conocimiento de los parámetros ecológicos que determinan la dinámica poblacional de los anfibios es básico para entender cómo funcionan las poblaciones, las especies, el sistema y qué elementos del paisaje y de la comunidad juegan un papel importante en su dinámica para tomar decisiones correctas para su gestión. Los ejemplos de seguimientos en anfibios son escasos en nuestro país y los existentes son relativamente recientes, ya que hasta hace pocos años no se consideraba que los seguimientos a largo plazo fueran importantes a nivel de gestión, y la importancia de los anfibios a este respecto estaba muy infravalorada e infrarrepresentada (Tejedo, 2003; Gosá y Sarasola, 2007; Campeny y Villero, 2007; Carrera y Villero, 2008; AHE, 2012; Andreu, 2014; Bosch y González-Miras, 2012; Montori *et al*., 2012, 2014; Bosch y Fernández-Beaskoetxea, 2014; Colomer *et al*., 2014; Galán, 2014; Oliver *et al*., 2014; Minuartia, 2012, 2013, 2016; Campeny *et al*., 2017; Montori y Jordà, 2018; Gosá *et al*., 2013, 2018a y b, 2019; Miró *et al*., 2020; OAPN, 2020). Estos estudios incluyen seguimientos de poblaciones, especies o comunidades durante un periodo prolongado, pero son la excepción y como se ha comentado, muy recientes.

Lo más usual es realizar estudios de un año o poco más, que en realidad no son seguimientos sino análisis de una situación puntual que puede o no compararse con otros estudios existentes. A modo de ejemplo véase OAPN (2020), donde se mezclan bajo el mismo concepto seguimientos a largo plazo con fotografías estáticas de la distribución de los anfibios, que no son más que inventarios sobre cartografía. Skelly *et al*. (2003) revisaron la bibliografía publicada sobre seguimientos y observaron que la mayoría de estudios eran de un año de duración o dos a lo sumo, y que el 80% de éstos se basaban en la comparación con datos históricos. La comparación de distribuciones pasadas y presentes es un análisis que se ha realizado y se realiza frecuentemente, pero que no sería estrictamente un seguimiento, ya que tiene una carencia fundamental de base, al tratarse de fotografías estáticas, que sólo comparan presencias, desconociéndose las ausencias reales pasadas y presentes. Además, los muestreos no son estandarizados para ambos periodos y en muchos casos éstos son fragmentarios. Este tipo de estudios pueden ser una buena herramienta para ver cambios en las distribuciones, si existen bases de datos suficientemente robustas y de largo recorrido temporal (véase por ejemplo Moreno-Rueda *et al*., 2012; Franch *et al*., 2015; Enriquez-Urzelai *et al*., 2019).

Fruto de este interés creciente en la realización de seguimientos es la creación de la red LTER España (Long-Term Ecological Network), que intenta reunir grupos de investigación, cuya finalidad es realizar seguimientos a largo plazo unificando metodologías para disciplinas muy diversas. Aunque a nivel internacional esta red tiene un gran número de miembros, a nivel español la participación es bastante testimonial y está formada por unos pocos espacios protegidos. Además la obtención de información sobre seguimientos es dificultosa y bastante críptica, al menos a nivel español (https://lter-spain.net/).

Volviendo a los seguimientos centrados en anfibios, cabe destacar aquí el programa SARE (Seguimiento de Anfibios y Reptiles Españoles) de la Asociación Herpetológica Española (Ayllón y Gómez-Calmaestra, 2014). El SARE nació en 2008 con la finalidad de obtener series temporales largas que permitieran detectar las tendencias a largo plazo de los anfibios y reptiles en España. Actualmente, la metodología SARE se ha generalizado para la mayor parte de los seguimientos y ha sido recomendada por el Organismo Autónomo de Parques Nacionales en 2015 (https://www.miteco.gob.es/es/ceneam/grupos-de-trabajo-y-seminarios/red-parques-nacionales/resumen-conclusiones_seminarioanfibios_tcm30-168614.pdf). El SARE está basado en los programas de seguimientos de aves de la Sociedad Española de Ornitología (SEO), de mariposas de la Butterfly Monitoring Scheme (BMS) o específicamente de anfibios y reptiles como el "Monitoring Network of Reptile, Amphibian & Fish Conservation" de RAVON y el desarrollado por "Amphibian and Reptiles Conservation" (ARC) en colaboración con "Amphibian and Reptile Groups of de UK-Volunteers working for the conservation of amphibians and reptiles" (ARG UK) en el Reino Unido, y denominado "The National Amphibian and Reptile Recording Scheme" (NARRS, 2013). Actualmente una gran parte de los seguimientos que se realizan o diseñan tienen como referencia el SARE, con algunas modificaciones debidas a la tipología del hábitat, de las especies y a las características y objetivos planteados (Arévalo *et al*., 2015; AHE, 2016). Sin embargo, otras metodologías de seguimiento pueden ser igualmente útiles (Campeny y Villero, 2007; Llorente *et al*., 2007; Carrera y Villero, 2008; Ekos, 2012; NARRS, 2013; Galán, 2014; Arévalo *et al.,* 2015; Montori y Jordà, 2018; Pujol-Buxó *et al.,* en prensa, entre otros), si bien la estandarización de los seguimientos con una misma metodología es lo ideal, ya que permite la comparación y valoración global de los resultados obtenidos en distintas zonas.

Por otra parte la aparición de enfermedades emergentes, que están diezmando las poblaciones de anfibios en todo el mundo, ha obligado a realizar un seguimiento de estas enfermedades y a aplicar criterios de bioseguridad en los muestreos (Fernández-Guiberteau y Montori, 2020; Fernández-Guiberteau *et al.,* 2020; Martínez-Silvestre *et al.,* 2022). Más recientemente se han incluido los análisis genéticos en los estudios demográficos. Sin embargo, no hablaremos de ellos, ya que esta tipología de seguimientos es objeto de otro trabajo más detallado en otro artículo de este volumen (Sánchez-Montes y Martínez-Solano, 2022).

CÓMO DISEÑAR, ESTRUCTURAR O ELABORAR UN SEGUIMIENTO

El primer paso en un programa de seguimiento consiste en definir la escala espacial objeto de estudio y tener bien determinados los objetivos y las especies que van a ser monitorizadas. En función de la dimensión del espacio la elección de los puntos de muestreo deberá estratificarse por tipologías de hábitat, aunque esto suponga una mayor carga de muestreos. Sin embargo, habitualmente no suele estratificarse debido a que los seguimientos se realizan mayoritariamente sobre poblaciones, especies o áreas de tamaño medio. El SARE, debido a su dimensión estatal, sí tiene estratificados los puntos de muestreo para que, de esta forma, todas las unidades bioclimáticas y paisajísticas estén representadas. Por otra parte, es fundamental replicar las tipologías de puntos de muestreo para poder obtener resultados robustos en el análisis de los datos obtenidos. En los seguimientos de anfibios los puntos de muestreo son mayoritariamente los medios acuáticos (charcas, pilones, abrevaderos, fuentes, acequias, embalses) y no suelen incluir parcelas o transectos como habitualmente ocurre en los seguimientos de reptiles o anfibios torrentícolas.

En el caso de los seguimientos de anfibios el conteo o censo de los individuos viene determinado por su doble vida acuática y terrestre y requiere cierta experiencia. Existen muchas técnicas de muestreo, que habitualmente suelen combinarse en un seguimiento. En la tabla 1 se indican algunas de las técnicas estandarizadas de muestreo más utilizadas, el tipo de información que se obtiene y una valoración de los costes. Las características de cada una de estas técnicas están descritas en AHE (2016).

Como vemos, hay varias técnicas de muestreo que suelen combinarse y que requieren un cierto grado de especialización en cuanto al conocimiento de las especies y a su manejo. Habitualmente se combina la detección de cantos con el conteo visual de ejemplares adultos o juveniles y con el de larvas. En el momento de diseñar el seguimiento debe tenerse en cuenta:

- Los objetivos que se pretenden conseguir deben ser claros, concretos y abordables. En función de estos objetivos se seleccionará la o las técnicas de muestreo adecuadas para obtener el tipo de información necesario para cumplirlos.
- La dimensión espacial y temporal del seguimiento es clave. Los anfibios suelen tener una estructura metapoblacional. Un área de estudio reducida puede falsear los resultados llevando a determinar falsos declives. Por otra parte, debido a las fluctuaciones propias del grupo se recomienda que los seguimientos tengan una duración mínima de entre 5 o 10 años.
- El diseño del seguimiento debe tener en cuenta las especies presentes y es imprescindible disponer de un buen conocimiento de su biología y su dinámica poblacional. Por ello debe estar muy claro qué especies van a ser objeto de seguimiento y sobre qué clases de edad se va a actuar. Por otra parte, el diseño debe evidenciar que los resultados se obtendrán a largo plazo y que su objetivo es la detección de tendencias.
- Es importante ajustar los objetivos y la metodología en función del personal técnico disponible. La particular biología de los anfibios y la problemática de su conservación hacen que los seguimientos basados en ciencia ciudadana, aunque puedan resultar un complemento útil, aporten resultados poco robustos, y por ello se recomienda realizar los seguimientos mediante especialistas o personal técnico formado específicamente.
- Se recomienda realizar los muestreos en el período de máxima actividad de cada especie, y preferentemente por la noche. Por ello es importante el conocimiento de su fenología y ajustar los muestreos a los períodos de máxima posibilidad de detección. En el caso de realizar los seguimientos sobre individuos larvarios, los muestreos pueden ser diurnos.
- La valoración de costes y el compromiso con ellos a largo plazo es vital para conseguir los objetivos propuestos.
- Actualmente es imprescindible seguir todos los protocolos de bioseguridad, debido a la reciente aparición y amplia distribución de patógenos productores de enfermedades en los anfibios (Fernández-Guiberteau y Montori, 2020; Fernández –Guiberteau *et al*., 2020).

Es importante resaltar que muchas especies de anfibios presentan un funcionamiento metapoblacional. Una

Técnica	Características	Información obtenida	Tiempo requerido	Coste económico	Coste de personal
Inventario exhaustivo	Nocturno o diurno. Incluye varias técnicas. Muestreo extensivo.	Riqueza específica	Elevado	Medio	Medio
Observación directa	Nocturno o diurno	Abundancia relativa	Bajo	Bajo	Bajo
Muestreo acústico	Nocturno	Abundancia relativa	Medio	Medio	Bajo
Vallado perimetral de charcas	Diurno	Abundancia relativa	Alto o muy alto	Alto	Alto
Conteo de larvas	Preferentemente diurno	Abundancia relativa/densidad	Medio	Medio	Medio
Parcelas de muestreo	Diurno/nocturno	Densidad	Alto	Medio	Medio
Transectos	Nocturno/diurno	Densidad/Abundancia relativa	Alto	Bajo	Medio

Tabla 1. - Técnicas estandarizadas utilizadas en los seguimientos de anfibios de medios acuáticos lénticos. Se indican en negrita las técnicas que suelen combinarse en un mismo tipo de seguimiento. Modificado de AHE (2016).

metapoblación es un conjunto de subpoblaciones próximas (en nuestro caso charcas, por ejemplo) que intercambian individuos de la misma especie, de manera que actúan como una gran población fragmentada, dividida en subpoblaciones (Fig. 1). A lo largo del tiempo se producen procesos de colonización y extinción propios de la dinámica metapoblacional. En el enfoque metapoblacional son las poblaciones locales las unidades de observación, y no los individuos (Rojas-Castro y Araya-Crisóstomo, 2019). El tamaño de la metapoblación es variable según la especie, su capacidad de dispersión, longevidad, demografía, etc. (Fig. 2), y además muchas especies, como es el caso de los tritones del género *Calotriton*, no presentan una dinámica metapoblacional, por lo que el conocimiento de la biología y ecología de las especies es fundamental en el diseño de los seguimientos.

Otro aspecto muy importante es la selección de los puntos de muestreo según su tipología. Si nos referimos concretamente a masas de agua o charcas, la selección dependerá de muchos factores, entre ellos el hidroperiodo. En las regiones templadas y cálidas las comunidades de anfibios se reproducen en medios acuáticos utilizando el gradiente de hidroperiodo existente en dichas zonas, que va desde medios acuáticos efímeros, pasando por los temporales y llegando hasta los permanentes (Wellborn *et al*., 1996; Babbitt *et al*., 2003; Van Buskirk, 2003; Richter-Boix *et al*., 2006a y b). Los dos extremos del rango hidrológico difieren claramente en sus características abióticas y bióticas. Mientras que en las charcas efímeras y temporales los anfibios se enfrentan al riesgo de la desecación, los medios permanentes suelen presentar comunidades de depredadores bien establecidas, y por tanto limitan la presencia de las especies de anfibios. Es en los medios temporales de media o larga duración donde se da la mayor riqueza de especies y donde aparece otro factor de riesgo, la competencia interespecífica, que debe añadirse a los dos factores de estrés antes comentados, el riesgo de desecación y de depredación (Fig. 3). Por ello, y debido a que la comunidad de anfibios no se distribuye uniformemente a lo largo de este gradiente de hidroperíodo, ni espacial ni temporalmente, los seguimientos deben tener en cuenta este factor e incluir todas las tipologías de charcas en su planificación.

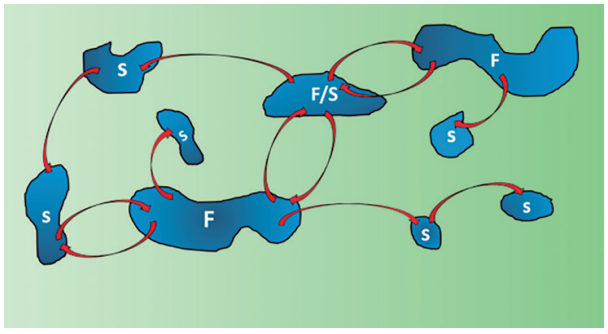

Fig. 1. - Esquema hipotético del funcionamiento metapoblacional, F: fuente, S: sumidero, Las flechas indican la direccionalidad de los intercambios entre subpoblaciones.

Las técnicas de muestreo, la detección y la diagnosis específica requieren de un personal especializado o muy formado para que los seguimientos aporten resultados robustos y comparables. Por ello, para el caso de seguimientos de anfibios se recomienda que estos se realicen de noche, combinando el muestreo visual con el auditivo. El personal que realice los seguimientos debe ser experimentado y formado para este tipo de censos. Deben realizarse en el período de máxima actividad, el cual dependerá del piso bioclimático en el que vayamos a realizar el seguimiento y de las especies presentes en la zona. En la Figura 4 puede observarse la comparación de efectividad de los muestreos nocturnos y diurnos en el Parc del Garraf (Fernández-Guiberteau y Montori, 2019). Como puede apreciarse, al cuarto mes de los muestreos nocturnos ya se han detectado todas las especies reproductoras en una charca, mientras que en los muestreos diurnos una especie queda sin detectar, y además no se alcanza la máxima riqueza específica hasta el sexto mes. En la tabla 2 se dan los valores obtenidos del número de adultos observados según que los seguimientos fueran diurnos o nocturnos, para cuatro charcas distintas del Parc del Garraf (Fernán-

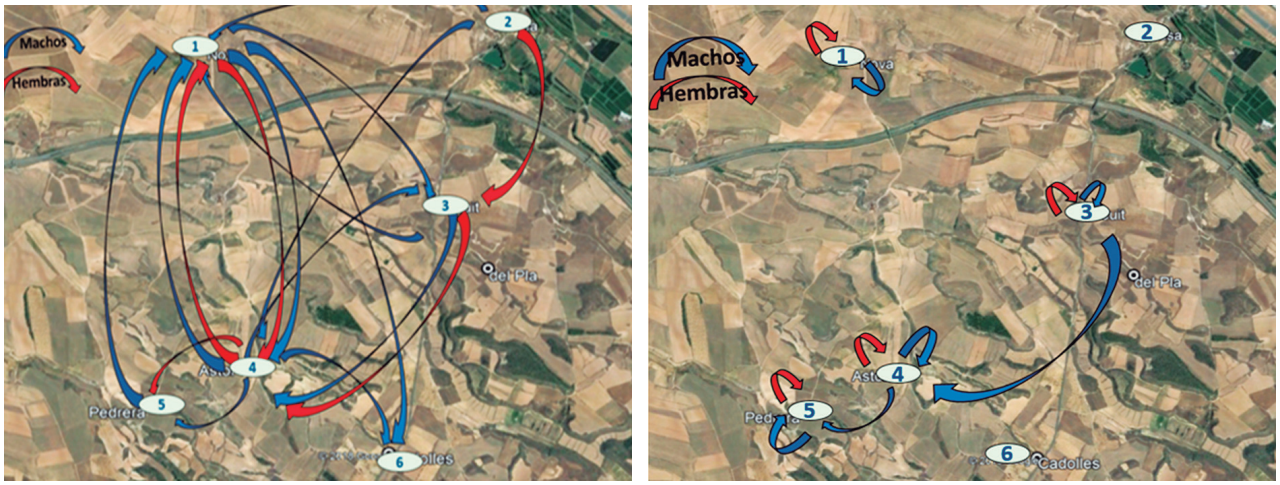

Fig. 2. - Ejemplos de dinámica de dispersión de dos especies en una misma zona, Izquierda: *Epidalea calamita*, Derecha: *Pelobates cultripes*, Las flechas indican la dirección de los desplazamientos entre varios años, Azul: machos, Rojo: hembras. Los números indican las charcas estudiadas (datos de UdL no publicados).

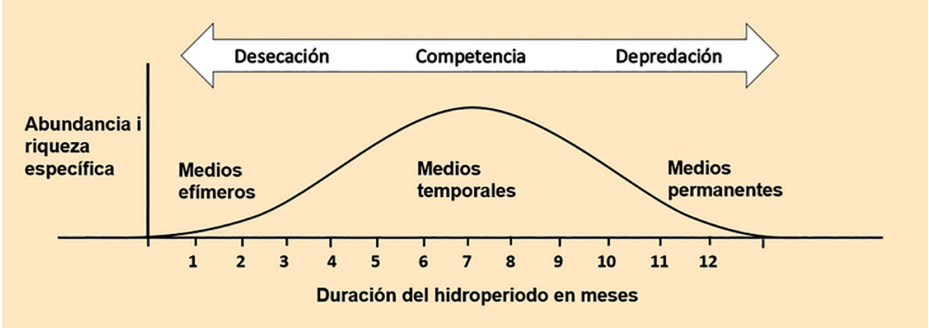

Fig. 3. - Distribución de la abundancia de anfibios según el hidroperíodo.

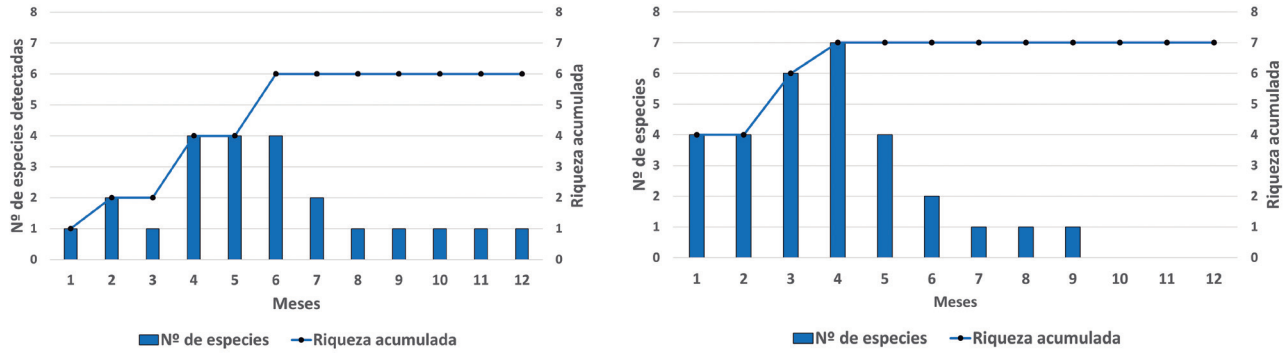

Fig. 4. - Número de especies detectadas y riqueza específica acumulada para una misma charca en el Parc Natural del Garraf a lo largo de un año según se haya realizado el muestreo de noche (derecha) o de día (izquierda).

dez-Guiberteau y Montori, 2019). Aunque las metodologías de muestreo no fueron las mismas queda en evidencia la mayor efectividad de los muestreos nocturnos para las especies de anfibios, si bien las estimaciones de densidades de individuos larvarios pueden realizarse de día. Existen varios ejemplos de seguimientos realizados mediante el conteo de larvas (Bosch y González-Miras, 2012; Oliver *et al.*, 2014; Reques, 2008; Minuartia, 2012; Campeny *et al.*, 2016, entre otros). Sin embargo, los resultados obtenidos a partir del censo de larvas están sujetos a una gran variabilidad intra e interanual. Ésta es mucho mayor que la de los adultos, las larvas son de difícil análisis, aportando con menor frecuencia datos concluyentes en cuanto a tendencias poblacionales. Los estudios basados en contaje de larvas tienen la ventaja de poderse realizar de día, pero requieren metodologías muy estandarizadas de muestreo para que produzcan resultados comparables a largo plazo. Por otra parte, permiten ajustar y conocer la fenología de las especies, son mucho más eficientes para la detección de las especies escasas o más crípticas y aportan los criterios necesarios para la gestión de los hábitats. Por el contrario, requieren de personal muy especializado o

	Charca A		Charca B		Charca C		Charca D	
Técnica	**D**	**N**	**D**	**N**	**D**	**N**	**D**	**N**
Salamandra salamandra	0	0	0	1	0	0	0	0
Alytes almogavarii	0	16	0	15	0	4	0	0
Pelobates cultripes	0	1	0	3	0	0	0	0
Pelodytes punctatus	0	17	0	28	0	5	1	7
Hyla meridionalis	2	81	1	118	0	84	10	28
Bufo spinosus	0	0	0	75	0	14	0	19
Epidalea calamita	0	0	0	5	0	30	1	0
Pelophylax perezi	4	3	15	9	0	4	587	79
Total	**6**	**118**	**16**	**254**	**0**	**141**	**599**	**133**
Nº muestreos	34	11	36	11	31	11	33	11
Nº ind./muestreo	0,18	10,73	0,44	23,09	0,00	12,82	18,15	12,09

Tabla 2. - Número de ejemplares adultos detectados en cuatro charcas del Parc Natural del Garraf en función del período de muestreo. D: diurno. N: nocturno. Los muestreos nocturnos se realizaron siguiendo la metodología propuesta por el SARE de la AHE (AHE, 2016). Los muestreos diurnos se realizaron mediante la metodología de detección de cantos, conteo de larvas, puestas, ejemplares metamórficos, subadultos y adultos (Campeny y Villero, 2007).

formado, dada la dificultad de identificación de los ejemplares, especialmente en estadios tempranos de desarrollo. Por ello se recomienda el muestreo nocturno mediante escuchas y censo visual de adultos, complementado con la captura e identificación de larvas, sin conteo, para completar la información sobre riqueza específica y fenología.

Por otra parte, en áreas geográficas donde la actividad reproductora se produce fundamentalmente durante los primeros meses del año, la extensión al segundo semestre de los muestreos no aporta información relevante y tan sólo se recomiendan si uno de los objetivos del seguimiento es conocer y estimar variaciones en la fenología de las especies. En la Figura 5 se muestra la efectividad de los muestreos según se realicen en el primer o segundo semestre del año para cuatro charcas del Parc Natural del Garraf (Fernández-Guiberteau y Montori, 2019). Evidentemente, el periodo de muestreo deberá variar según el piso bioclimático y la fenología de la comunidad batracológica, eligiendo siempre los períodos de máxima actividad para realizar los seguimientos.

SEGUIMIENTO DE LAS POBLACIONES TORRENTÍCOLAS

Hasta ahora nos hemos centrado en especies de anfibios que habitualmente se reproducen en medios lénticos, como son las charcas, y que acostumbran a estar estructuradas como metapoblaciones. Pero no todos los anfibios ocupan estos medios. Los hábitats reófilos como ríos, regatas o torrentes, entre otros, también presentan comunidades de anfibios cuyo seguimiento no se ajusta a lo explicado hasta ahora.

Especies como *Salamandra salamandra* (Linnaeus, 1758), *Lissotriton boscai* (Lataste, 1879), *Lissotriton helveticus* (Razoumowsky, 1789), *Alytes sp. Wagler,* 1829, *Bufo spinosus Daudin,* 1803, *Pelophylax perezi* (Seoane, 1885) y *Rana temporaria* Linnaeus, 1758 utilizan también los cursos de agua para reproducirse o como hábitat frecuente, y algunas especies como *Calotriton arnoldi, C. asper* y *Rana pyrenaica* Serra-Cobo, 1993 tienen este medio como hábitat preferente o exclusivo. Para estas tres especies sí que podemos hablar de poblaciones individualizadas en cada torrente, ya que su dinámica no se ajusta al funcionamiento metapoblacional. Eso no implica que no haya flujo génico entre poblaciones, pero no se dan los procesos de colonización/extinción con la frecuencia que se ha comentado en el caso de las metapoblaciones.

En el caso de *R. pyrenaica* únicamente se ha publicado un trabajo de conservación que incluye un seguimiento de algunas poblaciones durante el período 2011-2013 (Vieites *et al.*, 2014) y en el Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido se está realizando un seguimiento desde el año 2007 basado en la realización de transectos, en los que se realiza una prospección visual de los diferentes cuerpos de agua, conteo de larvas, juveniles, subadultos y adultos en un tramo de 100 metros de longitud en 31 localizaciones. Adicionalmente se anotan otras especies de anfibios y peces presentes y se caracteriza el medio físico-químico. Sin embargo, la metodología precisa y los resultados de los seguimientos no han sido publicados hasta la fecha, aunque se sabe que se aplican protocolos de bioseguridad (https://www.miteco.gob.es/es/ceneam/grupos-de-trabajo-y-seminarios/red-parques-nacionales/rana-pirenaica-ordesa_tcm30-168605.pdf).

El hábitat utilizado por *R. pyrenaica* es casi exclusivamente torrentícola, por lo que la metodología de seguimiento es muy similar a la utilizada para las especies de *Calotriton*. Este género, formado por dos especies, *C. asper* y *C. arnoldi,* presenta unas características y adaptaciones particulares que de forma general pueden resumirse de la siguiente forma: habitan principalmente ambientes reófilos, tienen hábitos fisurícolas y presentan estereotactismo positivo. Presentan los pulmones reducidos, por lo que necesitan aguas frías y oxigenadas. Son fundamentalmente especies nocturnas, especialmente *C. arnoldi,* y están adaptadas a vivir en ambientes impredecibles sujetos a fuertes variaciones de caudal. En general, presentan una distribución discreta en los torrentes, una movilidad muy baja y bajas tasas de migración. Son especies muy longevas y con poblaciones que pueden mantenerse con pocos efectivos.

Los seguimientos que detallaremos en el presente trabajo son tres estudios con metodologías de seguimiento aplicadas a las características ecológicas diferenciales de estas especies y con objetivos en algunos casos sustancialmente distintos.

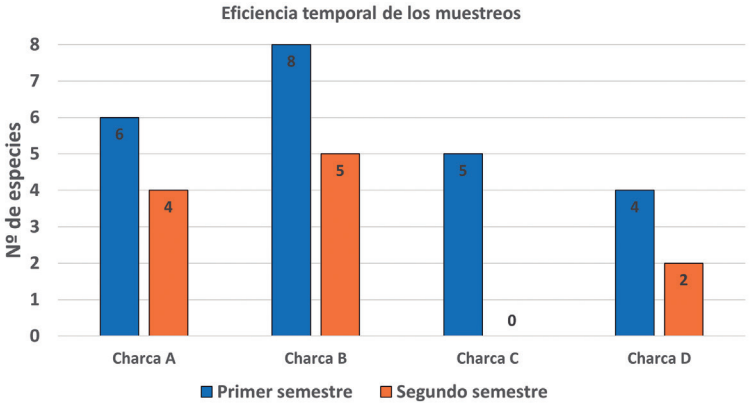

Fig. 5. - Eficiencia temporal de los muestreos nocturnos en cuatro charcas del Parc Natural del Garraf, Barras azules: muestreos realizados en el primer semestre. Barras naranjas: muestreos realizados en el segundo semestre.

Seguimiento a largo plazo de una población de Calotriton asper del Prepirineo catalán (P.N. Cadí-Moixeró) desde 1982 hasta 2002

En este caso debemos situarnos primero en contexto. En el año 1982 se desconocía prácticamente toda la biología y la ecología básica de la especie a pesar del gran número de estudios, realizados sobre todo en la vertiente francesa del Pirineo (Clergue-Gazeau. 1972, 1981, 1982a y b; Clergue-Gazeau y Beetschen, 1966). Estos estudios estaban centrados fundamentalmente en el ciclo reproductor y las alteraciones que producía la adaptación a la vida cavernícola, y, secundariamente, en la distribución y el hábitat de la especie (Clergue-Gazeau y Martínez-Rica, 1978). Sin embargo, no se conocía nada de los aspectos biológicos y ecológicos que intervenían en la dinámica y demografía de la especie. Por ello, en 1982 se inició el seguimiento a largo plazo del tritón pirenaico C. asper, especie considerada *"Casi Amenazada"* por la UICN.

El seguimiento de las poblaciones torrentícolas debe planificarse a partir de la metodología de transecto, adaptada a las características de la especie (Fig. 6) y del medio. En este caso la realización del estudio a largo plazo requirió un período inicial de estudio intensivo y extensivo y un seguimiento de menor intensidad y puntual a partir del cuarto año.

Metodológicamente el seguimiento se estructuró de la siguiente forma:

Primer año:

- Delimitación del tramo a estudiar. 1.500 metros lineales de torrente divididos en segmentos de 50 m de longitud, que a su vez se subdividieron en tramos de 10 m.
- Caracterización de las variables bióticas y abióticas de los segmentos (Tabla 3).
- Realización del transecto diurno mediante búsqueda activa de los ejemplares.

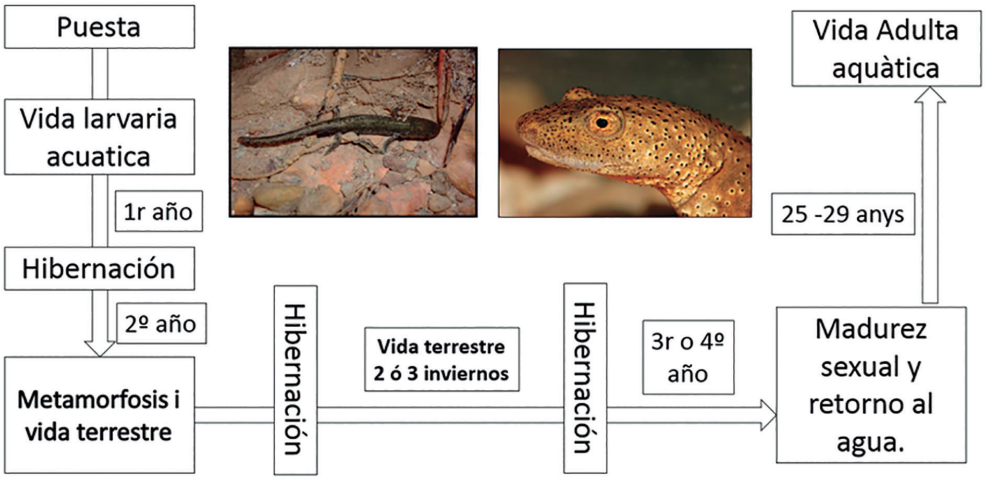

Fig. 6. - Ciclo biológico de *Calotriton asper* para una población torrentícola de montaña media (1200-1500 m,s,n,m,).

Variables	Categorización				Mín.	Máx.	Media
Nº de pozas	1: 1-5	2: 6-10	3: 11-	-	3	14	7,75
Nº de saltos	1: 1-5	2: 6-10	3: 11-15	4: ≥16	1	17	9,25
Nº de refugios	1: 1-50	2: 51-100	3: 101-150	4: ≥151	63	250	158,25
Nº de remansos	1: 1-3	2: 4-6	3: 7-9	-	1	9	5,29
Nº de árboles	1: 1-5	2: 6-10	3: 11-15	4: ≥16	0	27	6,21
Nº de arbustos	1: 1-15	2: 16-30	3: 31-45	4: ≥46	3	63	20,6
% vegetación acuática	1: ausente	2: 0-15%	3: 16-30%	4: >30%	0	35	10,2
% cobertura arbórea	1: 1-15%	2: 16-30%	3: 31-45%	4: ≥46%	0	65	42,7
Estructura del lecho	1: >50% rocas	2: >50% rocas+piedras	3: >50% piedras	4: >50% piedras+grava	-	-	-
Profundidad media cm	Promedio de 10 mediciones en cada tramo				15,7	26	19,2
Anchura media cm	1: <1 m	2: 1-1,5 m	3: 1,5-2 m	4: 2 m	98	240	148,2
Tª del agua	Promedio de 5 mediciones en cada tramo				6,5	12,1	8,26
pH	Promedio de 5 mediciones en cada tramo				5,8	6,7	6,13
O2 disuelto (ppm)	1: 7-9	2: 9-11	3: 11-13	4: >13	3,5	10,7	7,18
Velocidad cm/s	1: 0-5	2: 5-10	3: 10-15	4: 15-20	3,4	16,6	7,49

Tabla 3. - Variables bióticas y abióticas tomadas para la caracterización de los tramos y categorización de las mismas, en un estudio a largo plazo sobre el tritón pirenaico. Mín: Mínimo. Máx: Máximo. Modificado de Montori *et al.* (2008).

- Marcaje individual de todos los ejemplares adultos para permitir la estimación poblacional mediante metodologías basadas en captura-recaptura.
- Toma de variables biométricas de cada ejemplar (sexo, peso, longitud cabeza-cuerpo (CC) y longitud de la cola (Lcola)), referenciando el segmento de captura para el estudio posterior de dispersión.
- Liberación en el mismo lugar de captura.
- Contaje del número de individuos no adultos y su localización (individuos larvarios, metamórficos, juveniles y subadultos).
- Selección de un tramo representativo de la densidad poblacional del torrente (Fig. 7).
- Este recorrido se repitió mensualmente desde julio de 1982 hasta octubre de 1984.

Entre 1985 y 2002:

- Muestreo durante el periodo de máxima actividad (última quincena de agosto- primera de septiembre).
- Muestreo único que dejó de ser mensual para pasar a ser anual y en condiciones meteorológicas e hidrológicas óptimas: no ocurrencia de lluvias torrenciales durante la semana anterior, no previsión de crecidas por tormenta, caudal bajo, día soleado.
- Realización del transecto diurno mediante búsqueda activa de los ejemplares.
- Mantenimiento del esfuerzo de captura (siempre dos personas muestreando).
- Toma de variables biométricas de cada ejemplar (sexo, peso, CC y Lcola), referenciando el tramo de captura para el estudio posterior de dispersión.
- Liberación en el mismo tramo de captura.

Mantener el esfuerzo de captura constante es imprescindible para poder comparar los transectos entre sí. Excepto en el primer año (primera captura y recaptura), que se realizó un muestreo intensivo para marcar el máximo de individuos posibles, el resto de los muestreos fueron realizados por dos personas experimentadas.

Los datos obtenidos durante el estudio permitieron conocer la distribución por tramos de los ejemplares por sexo (Fig.7) y clases de edad, variación temporal de la sex-ratio, actividad, factores abióticos y bióticos que determinaban su abundancia, tasas de crecimiento, longevidad y supervivencia, de migración y dispersión; la dispersión, los parámetros reproductivos como ciclo testicular, ovogénesis, fecundidad, el nicho y la ecología trófica de las distintas clases de edad, el análisis de la competencia y segregación espacial y trófica interespecífica e intraespecífica y el tamaño poblacional y su variación anual (Fig. 8) (Montori, 1988, 1991, 1992, 1997; Montori y Herrero, 2004; Montori *et al*., 2008, 2012; Montori y Llorente, 2014; Sánchez-Hernández *et al*., 2019).

Otros seguimientos por transecto realizados sobre esta especie en Navarra (Gosá *et al*., 2018b) coinciden en las propuestas metodológicas aquí planteadas: seguimiento preferentemente diurno, censo durante el periodo de máxima actividad y menor caudal (de julio a septiembre), siempre en condiciones meteorológicas óptimas y un tramo de muestreo mínimo de unos 150 m siempre que fuera posible, teniendo en cuenta que la especie no presenta desplazamientos importantes en los torrentes (Montori *et al*., 2008). Estos autores también coinciden en la necesidad de mantener los tramos de muestreo fijos a lo largo de los años aunque no siempre es posible debido a la dinámica fluvial. Sin embargo, advierten que esta circunstancia no presenta excesivos problemas siempre que el punto de inicio y final estén bien referenciados (Gosá *et al*., 2018b), ya que para comparar densidades poblacionales y variaciones temporales proponen utilizar el IKA (Índice Kilométrico de Abundancia), estimador muy utilizado ya en otros grupos faunísticos. Estos autores proponen repetir los transectos dos veces durante el mismo periodo aunque con uno pueda ser suficiente. Para realizar los transectos es importante una consideración final. Éstos deben realizarse en sentido ascendente para evitar que la turbidez que los prospectores puedan generar en la búsqueda activa de ejemplares dificulte su detección (Montori, 1988; Gosá *et al*., 2018b).

En la Figura 8 puede observarse que a lo largo de los 21 años de seguimiento de una población de tritón pirenaico

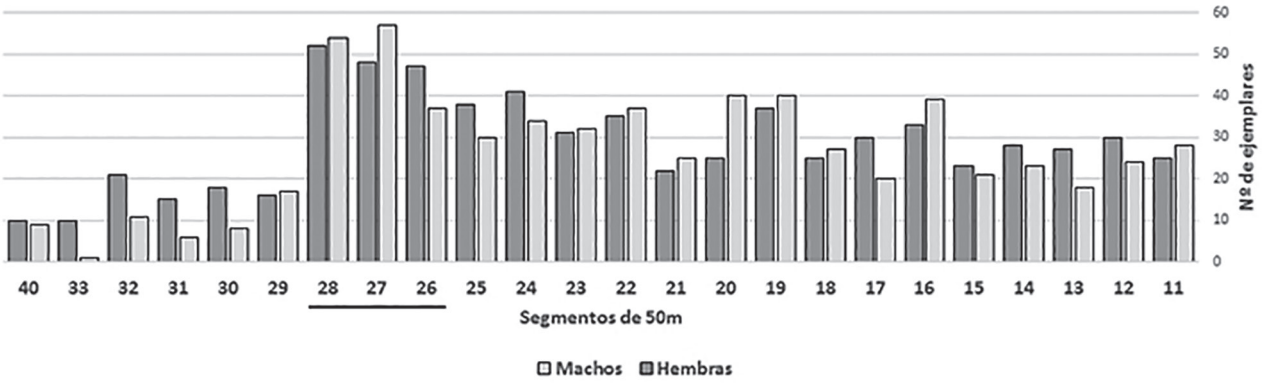

Fig. 7. - Número de machos y hembras de *Calotriton asper* contabilizados por segmento en agosto y septiembre del primer año de seguimiento y utilizados para la estimación poblacional. Los segmentos subrayados indican los tramos seleccionados para realizar el seguimiento anual por transecto a partir del tercer año.

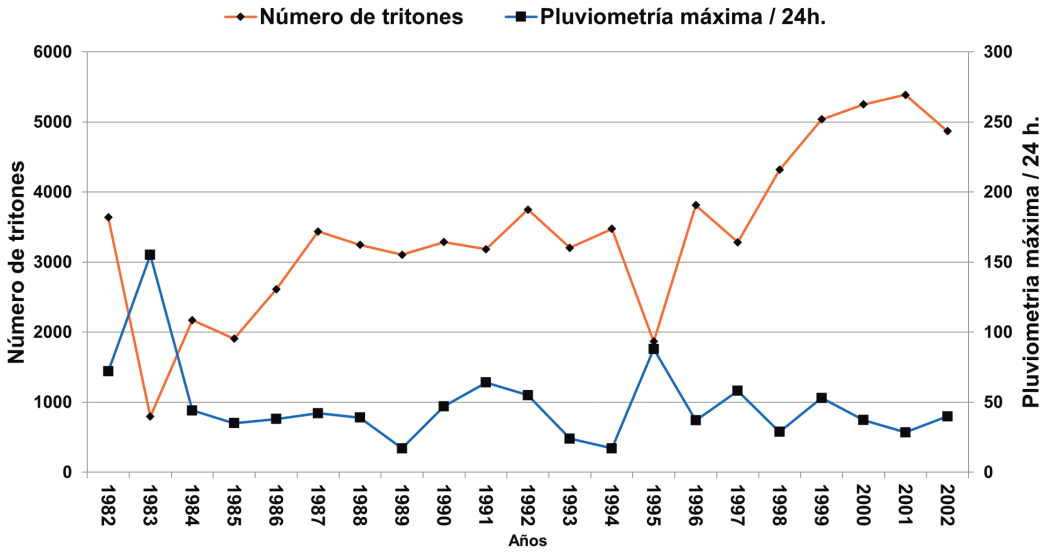

Fig. 8. - Número de ejemplares de *Calotriton asper* estimados en los 1,5 km de torrente delimitados y pluviometría máxima en 24 horas registrada en el período de un año previo al censo del tritón pirenaico en el Parc del Cadí-Moixeró, Datos meteorológicos recogidos por la estación de bomberos de Bellver de Cerdanya y el Servei Meteorològic de Catalunya.

del Parc del Cadí-Moixeró se producen importantes fluctuaciones poblacionales. Durante el primer año de muestreo, el 7 y 8 de noviembre de 1982 se produjo el mayor episodio de lluvia torrencial registrado en la zona y con un periodo de retorno estimado de 100 años (Servei Geològic de Catalunya, 1983). El observatorio de La Molina registró en dos días una pluviometría acumulada de 555 mm y el día 8 algunos observatorios de la cuenca del Segre registraron valores superiores a los 300 mm. En ese momento los tritones se encontraban ya en hibernación, por lo que la avenida producida por las lluvias desgarró los márgenes del torrente donde hibernaban y causó una mortalidad cercana al 60% de la población de *C. asper* (Montori, 1988).

Sin embargo, la continuación del seguimiento durante 1983 y los años sucesivos permitió obtener mucha información sobre cómo es la dinámica de una población que habita medios tan impredecibles como los torrentes de media y alta montaña. En la Figura 8 se muestra la evolución del tamaño de población de 1982 a 2002 y la pluviometría máxima en 24 horas en la zona. Los resultados obtenidos en el estudio intensivo del primer año y el seguimiento posterior de la población hasta 2002 permitieron estimar muchas variables demográficas y biológicas, así como proyectar futuros escenarios de cambio climático para ver cómo respondería esta población a un aumento de la frecuencia de lluvias torrenciales (Colomer *et al.*, 2014).

Existe otro tipo de muestreo para poblaciones torrentícolas de *C. asper,* que sería una modificación del clásico transecto y basado en múltiples observaciones focales a lo largo del torrente (Loras, 2019). En este tipo de seguimiento se propone censar individuos visualmente eligiendo estaciones de muestreo a lo largo de un tramo seleccionado. En este caso concreto se seleccionaron 32 estaciones de muestreo en un tramo de 650 m. En cada punto o estación de muestreo se realizaba una observación focal diurna de cinco minutos contabilizando el número de individuos observados y su actividad a lo largo de todo el año, contabilizando un total de 42 muestreos. También como en el caso anterior se realizaba una caracterización abiótica de cada punto de muestreo (Loras, 2019).

Sin embargo, este tipo de muestreos intensivos y de largo recorrido temporal son insostenibles a nivel de costes si se pretende realizarlos en todas las poblaciones de una especie. El seguimiento desarrollado en el presente trabajo tenía como objetivo conocer los parámetros ecológicos y biológicos básicos, desconocidos hasta el momento, necesarios para poder elaborar planes de gestión o seguimiento, basados en el conocimiento de la especie y que aportaran información veraz y útil para su conservación, así como la del hábitat y del sistema. Por ello, si se decide realizar seguimientos de una especie, en este caso *C. asper,* en una zona amplia debe determinarse qué poblaciones son clave e indicadoras de cambio. Para ello, una vez conocidos los parámetros ecológicos, demográficos y biológicos de la especie, en 2016 se planteó a nivel del Parc Natural del Cadí-Moixeró, área protegida donde se localizaba la población estudiada de forma intensiva, realizar un estudio de caracterización y seguimiento extensivo, con la finalidad de determinar las poblaciones clave cuyo seguimiento nos aportaría información robusta sobre el estado y evolución temporal de las poblaciones de *C. asper* en el Parque. El proyecto también tuvo como objetivo conocer su distribución real, caracterizar el hábitat y realizar pequeños transectos para estimar IKAs que permitieran comparar entre sí poblaciones (San Sebastián *et al.*, 2017, 2018, 2019 y 2020).

Caracterización de las poblaciones de C.asper en el Parc Natural del Cadí-Moixeró, para determinar qué poblaciones son representativas de la especie de cara a maximizar el rendimiento de los seguimientos

Para realizar un estudio de este tipo que pretende caracterizar el hábitat y las poblaciones para el aspecto más importante, la toma de decisiones, debemos tener en cuenta distintos elementos a analizar:

- Es importante conocer la distribución precisa de la especie en la zona de estudio.
- Es imprescindible caracterizar dicha distribución, tanto para la presencia como para la ausencia de la especie en un determinado torrente.
- Realizar estimaciones poblacionales relativas (IKA) mediante transecto.
- Determinar factores de amenaza.
- Valorar las poblaciones representativas e indicadoras de cambio para un seguimiento continuado.

Para ello se determinó la siguiente metodología:

- Se realizó previamente un análisis de cuencas y subcuencas hidrográficas (Modelo de altitud 2 x 2 m del Institut Cartogràfic i Geològic de Catalunya (ICGC)).
- Con los resultados anteriores se seleccionaron las estaciones de muestreo (torrentes, fuentes, abrevaderos) por encima de 800 m de altitud.
- Los muestreos se realizaron de día durante los meses de máxima actividad y facilidad de prospección (julio y agosto).
- Inicialmente se realizaba una prospección intensiva para la detección de la presencia de *C. asper*. En caso de ser positiva se realizaba un transecto mínimo de 50 m (Tabla 4), anotando tanto el número de tritones por clases de edad y actividad como la presencia de otras especies (peces, anfibios, reptiles). En todo momento se intentó mantener el esfuerzo de captura constante. Aunque C. asper tiene actividad nocturna también se activa de día, por lo que es totalmente recomendable realizar los censos diurnos. Los resultados obtenidos mediante transectos diurnos de longitud conocida permiten comparar densidades entre torrentes.
- Es importante realizar la caracterización biótica y abiótica de los torrentes muestreados, tanto si hay presencia como si no. Las ausencias son tan im-

Autores	Zona	Nº de C. asper adultos	Longitud del transecto en km	IKA
San Sebastián *et al.*, 2020.	**PN Cadí-Moixeró (Catalunya)**	2	0,030	66,67
		5	0,126	39,68
		23	0,100	230,00
		3	0,070	42,86
		1	0,030	33,33
		2	0,075	26,67
		1	0,070	14,29
		0	0,125	136,00
		8	0,150	53,33
		4	0,060	66,67
		3	0,035	85,71
		1	0,070	14,29
		1	0,115	8,70
		7	0,065	107,69
Gosá y Bergerandi, 1994	**Navarra**	**72**	**1**	**72**
Olano *et al*,, 2007	**Euskadi**	**-**	**-**	**17,71**
			-	**8,45**
Montori *et al.*, 2012	**PN Cadí- Moixeró**	**133**	**0,150**	**890,5**
Loras, 2019	**Garrotxa (Catalunya)**	**-**	**-**	**58,78**
Gosá *et al.*, 2018b	**Navarra Zonas ZEC**	-	-	76,68
		-	-	35,88
		-	-	5,56
		-	-	16,60
		-	-	9,47
		-	-	76,68
		-	-	35,88
		-	-	48,61
		-	-	112,11
		-	-	50,28

Tabla 4. - Algunos valores de IKA de adultos de *C. asper* publicados. San Sebastián *et al.* (2020): algunos valores de IKAs estimados para distintos torrentes de la vertiente sur del Parc Natural del Cadí-Moixeró. Montori *et al.* (2012): IKA promedio de 21 años de transectos para un torrente de la vertiente norte del Parc Natural del Cadí-Moixeró. Gosá *et al.* (2018b): valores de IKA promedio de varios años de algunas regatas muestreadas en Navarra. Loras (2019): valor promedio estimado en un torrente de La Garrotxa en Catalunya (Loras, com. pers.).

portantes como las presencias para caracterizar los hábitats de las poblaciones. Este factor es extremadamente importante en las poblaciones que se encuentran en el límite de su distribución, ya que es muy difícil la valoración objetiva sin poseer datos de base.

- Deben seguirse a rajatabla los criterios de bioseguridad propuestos por la comunidad científica internacional en relación a la prevención de enfermedades emergentes en anfibios.
- Una vez finalizado el transecto se realizaba una valoración del estado del torrente, características abióticas (caudal, anchura, orientación) y factores de amenaza detectados.

Con los resultados obtenidos se hizo una estimación de densidad IKA (índice kilométrico de abundancia) para comparar los distintos torrentes entre sí. Las localizaciones positivas tipo surgencias, balsas o que no fueran cursos de agua se eliminaron de la estimación de los IKA (Tabla 4). Dichas estimaciones, muy utilizadas en aves y reptiles, también se han empleado en los censos por transecto para esta especie (Gosá *et al*., 2018b, San Sebastián *et al*., 2017, 2018, 2019 y 2020; Loras, 2019) y permiten comparar las densidades de distintas zonas. Como puede observarse la variabilidad interpoblacional de los IKA es muy elevada, pero también lo es la intrapoblacional a lo largo de los años. Otro motivo más para concluir que los seguimientos deben ser a largo plazo.

Proyecto Life Tritó del Montseny (Seguimiento de las poblaciones de C. arnoldi del macizo del Montseny)

El proyecto Life Tritó Montseny (LIFE15 NATO/SE/000757) se inició el 1 de octubre de 2016. Nació de la necesidad de proteger el tritón del Montseny (*Calotriton arnoldi*), que está en estado crítico de conservación. Inicialmente se iba a llevar a cabo en un lugar de interés comunitario de la Red Natura 2000 (cod. SE5110001) durante los años 2016-2020, pero se prorrogó hasta el 2022. Los objetivos pretendidos por este proyecto pueden consultarse en https://lifetritomontseny.eu/es/.

Dos de los objetivos planteados en el proyecto Life-Tritó del Montseny requieren la realización de seguimientos de las poblaciones de *C. arnoldi* del Macizo: incrementar el conocimiento de su biología y desvelar sus requerimientos ecológicos y amenazas, ampliando su área de distribución.

Esta especie, diferenciada de *C. asper* por Carranza & Amat (2005), tiene una biología y una ecología a priori similar a la de su congénere. Sin embargo, hay algunas particularidades que obligan a realizar un tipo de seguimiento distinto al descrito para *C. asper*.

Se estima que *C. arnoldi* tiene una población total de unos 1.500 ejemplares adultos y ocupa exclusivamente ocho torrentes de la cuenca alta de La Tordera, entre los 600 y 1.200 m.s.n.m. Los cursos que habita (Fig. 9) presentan una fuerte pendiente, aguas frías y oxigenadas y discurren sobre un lecho formado fundamentalmente por esquistos y pizarras muy fracturadas, que habitualmente se localizan en áreas de hayedo o encinar culminal. Actualmente estas ocho poblaciones se distribuyen en dos núcleos, oriental y occidental, situados en ambas vertientes de La Tordera y aislados genéticamente desde hace unos 200.000 años (Valbuena-Ureña *et al*., 2013). Esta particularidad ha hecho que se considerara la gestión de la especie como si fueran dos especies distintas, para mantener las características genéticas y morfológicas diferenciales. Evidentemente, la prioridad es la conservación de la especie, pero si pueden mantenerse los procesos evolutivos independientes detectados sin comprometer el futuro de la especie queda justificado tratar el grupo oriental y el occidental como dos unidades distintas de gestión (Valbuena-Ureña *et al*., 2013).

Las diferencias de *C. arnoldi* con *C. asper*, que hacen distintas sus metodologías de seguimiento, se deben al carácter casi exclusivamente nocturno del tritón del Montseny, a la elevada pendiente de los torrentes, que hace que la corriente sea rápida y dificulte la detección durante el día, y a la existencia de una gran parte de la población, que vive en el curso subterráneo donde abundan las fracturas y las fisuras. Por otra parte, la especie presenta un periodo de inactividad estival que puede que realmente no lo sea, ya que durante el estiaje los tritones ocupan el acuífero subterráneo y son indetectables. En la Figura 10 puede verse resumido el ciclo fenológico de la especie. Por otra parte su distribución muy restringida, que ocupa en total 5 km lineales de torrentes en un área de unos 8 km^2, la hace muy susceptible a alteraciones en el medio bien sea por fenómenos climáticos extremos cada vez más frecuentes o por modificaciones del flujo de aguas o de la comunidad vegetal, consecuencia del cambio global (Ledesma *et al*., 2019).

Como ya se ha comentado en el seguimiento a largo plazo de una población de *C. asper* del Prepirineo catalán es imposible realizar un seguimiento intensivo en todas las poblaciones de la especie, debido al elevado coste que precisaría. Y eso incluso tratándose de una especie catalogada como CR (en peligro crítico) por la UICN (Carranza & Martínez-Solano, 2009), reconociendo la propia entidad que son necesarios seguimientos para conocer su biología y ecología, y que existe financiación gracias a un proyecto Life (LIFE15 NAT/ES/000757). Por este motivo se optó por realizar dos tipos de seguimiento que cubrieran todo el rango de distribución de la especie: un seguimiento extensivo y otro intensivo. Además, como uno de los objetivos del programa Life era aumentar el área de distribución de *C. arnoldi* creando nuevas poblaciones, se diseñaron seguimientos específicos para las nuevas poblaciones naturalizadas. Así, el seguimiento en el Montseny quedó estructurado de la siguiente forma:

- Sobre poblaciones naturales:
  - Seguimiento extensivo sobre las ocho poblaciones.
  - Seguimiento intensivo sobre una población natural.
- Sobre poblaciones de nueva creación:
  - Seguimiento de todas las poblaciones.

Fig. 9. - Hábitat de *Calotriton arnoldi.*

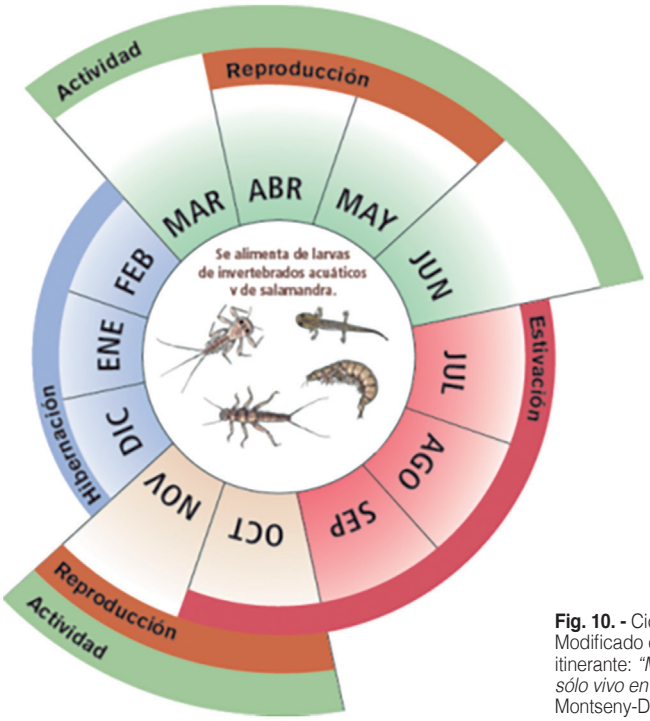

Fig. 10. - Ciclo fenológico de *C, arnoldi*, Modificado del tríptico de la exposición itinerante: *"Mi nombre es Calotriton y sólo vivo en el Montseny"* (Life Tritó del Montseny-Diputació de Barcelona).

Seguimiento extensivo sobre las poblaciones naturales

Aunque los seguimientos extensivos de la especie se iniciaron en 2010, éstos no se regularizaron y extendieron a las ocho poblaciones hasta 2016. La metodología utilizada difiere un poco de lo reseñado hasta ahora, y se resume en los siguientes puntos:

Se realizan dos censos por año en primavera y otoño en cada una de las ocho poblaciones, coincidiendo con los periodos de máxima actividad de la especie. El seguimiento se realiza mediante transecto nocturno en tramos ya delimitados en los estudios previos. Siempre será ejecutado por dos personas, para mantener constante el esfuerzo de captura. La localización de los individuos es visual, sin búsqueda activa en los refugios. Por tanto, lo que se está estimando es la actividad en el acuífero superficial, que se considera representativa de la densidad cuando se comparan los transectos de varios años y torrentes. Las prospecciones se realizan siempre en las condiciones climatológicas óptimas. Todos los ejemplares localizados se georreferencian, determinándose su clase de edad y sexo, así como los datos básicos sobre biometría, estado y actividad. Antes y después de cada censo se aplican las medidas de bioseguridad establecidas para los anfibios y para el proyecto Life.

Como complementario a estos seguimientos, y dada la distribución fragmentada de las poblaciones incluso en el mismo torrente, se están realizando muestreos en los torrentes donde hasta ahora no se ha encontrado la especie, y ensayando técnicas de análisis de presencia mediante metabarcoding de ADN ambiental (Hebert *et al.*, 2003), para conocer ausencias reales o presencias en torrentes en los que hasta la fecha no se ha detectado la especie. Al mismo tiempo se han analizado los parámetros bióticos, abióticos e históricos en todos los cursos, independientemente de que se haya localizado o no la especie, y en los que se conoce su ausencia real. Se ha realizado un análisis geomorfológico estructural, una descripción de las características de los torrentes (altitud, pendiente, orientación, cobertura vegetal, estructura del bosque de ribera, disponibilidad de materia orgánica, disponibilidad trófica, sustrato, hidromorfología, hidrodinámica, físico-química del agua, temperatura, captaciones de agua, usos del suelo actuales y pasados, etc,). Todo ello con la finalidad de caracterizar la distribución de la especie y de poder determinar qué torrentes son óptimos para la creación de nuevas poblaciones.

Seguimiento intensivo sobre una población natural

Como ocurría con *C. asper* en el inicio de su seguimiento, una gran parte de la ecología y dinámica de poblaciones de *C. arnoldi* era conocida de forma muy superficial. Por este motivo se planteó dentro del proyecto Life Tritó del Montseny el seguimiento intensivo de una población situada en el núcleo oriental, teniendo como objeto estimar el tamaño de población, conocer su estructura demográfica, su fenología, la dispersión longitudinal o migración de los individuos y determinar qué factores estructurales, ambientales o antrópicos constituyen un riesgo o una amenaza, para poder proponer medidas correctoras en caso de ser necesarias. Por otra parte, al tiempo que se capturaban individuos para marcarlos se recogieron muestras para su caracterización genética.

La metodología aplicada para este seguimiento no difiere sustancialmente de la utilizada en el primer seguimiento de *C. asper*. Se delimitó un segmento de 150 m subdividido en tramos de 10 m. Las marcas de tramo estaban numeradas del 0 al 15 con un color fluorescente, dado que los seguimientos se realizaban por la noche. Cada prospección fue llevada a cabo por dos investigadores como mínimo, procurando mantener constante el esfuerzo de captura. Sin embargo, dado que el objetivo no era la estimación de IKAs o la comparación de densidades, sino un estudio demográfico, esta variable no se consideró tan importante. Desde abril de 2018 los muestreos se realizaron procurando mantener una periodicidad mínima mensual (Fig. 11) a lo largo de todo el ciclo anual, y se tiene previsto continuar el seguimiento como mínimo hasta más allá del año 2022. Cada prospección se realizó de noche en sentido ascendente y con búsqueda activa, intentando evitar pisar el lecho del torrente. Cuando se localizaba un ejemplar era capturado, marcándose el lugar con una banderola, con el fin de liberarlo en el mismo sitio. Cada individuo capturado fue georreferenciado mediante GPS con una precisión de 1m, y localizado dentro de un tramo. En el momento de indicar el tramo también se anotaban tres localizaciones posibles. Por ejemplo, en el tramo 12-13 el tritón podría estar más cercano al 12, registrándose como 12 · - -13, o bien equidistante a los dos marcadores o más cercano al 13, registrándose como 12- · -13 o 12- - · 13, respectivamente. De esta forma se obtenía un error máximo de 3,3 m, en muchos casos inferior al error del GPS. Se recogieron datos morfométricos, de clase de edad y sexo de todos los ejemplares capturados. Los adultos fueron marcados mediante elastómeros de diferentes colores (azul, amarillo, rojo y verde) en distintas partes del cuerpo (zona gular, vientre y parte inferior de las extremidades), consiguiendo mediante combinaciones individualizar los ejemplares (Fig. 12). Durante el primer año se marcó

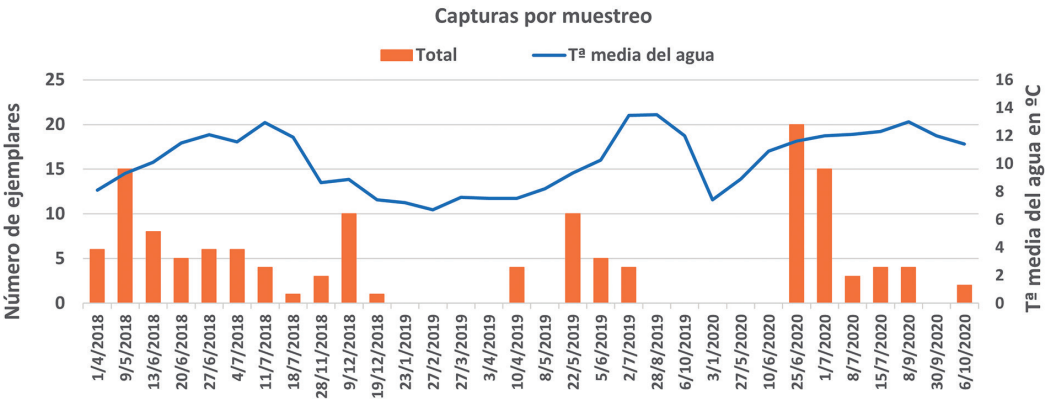

Fig. 11. - Número de ejemplares capturados a lo largo del período de estudio y temperatura media del acuífero superficial durante los muestreos.

Fig. 12. - Zonas de marcado subcutáneo de los tritones adultos capturados y código de lectura actual utilizado (izquierda). Abajo a la derecha: marcaje inicialmente utilizado en la cola pero desestimado posteriormente. Centro: Lectura de las marcas con luz UV (arriba) y con luz normal (abajo). Arriba a la derecha: material utilizado: jeringas de inyección y elastómeros.

también en la parte inferior de la cola, pero se desestimó debido al mayor grosor de la piel en esa zona. El reconocimiento de las marcas es especialmente sencillo si se usa una linterna de luz ultravioleta. Dada la sensibilidad de la especie a la infección por *Batrachochytrium salamandrivorans*, patógeno detectado en una zona cercana (Martel *et al*., 2020), previamente al inicio del muestreo el material de campo era desinfectado con Virkon S®, siguiendo los criterios de bioseguridad existentes (Fernández-Guiberteau *et al*., 2020), y los investigadores llevaban guantes de nitrilo que se cambiaban cada vez que se manipulaba un ejemplar.

Los datos de demografía y dinámica de poblaciones así obtenidos nos permiten conocer las variables biológicas y demográficas necesarias para planificar la naturalización de ejemplares en un torrente donde la especie no está presente y en el que los estudios complementarios comentados en el apartado anterior sugieren que es un hábitat óptimo. De hecho, gran parte de los torrentes analizados en los que no está presente actualmente *C. arnoldi*, dentro de los que componen el área óptima de distribución, presentan condiciones no significativamente distintas a las de los torrentes donde sí está presente. En algunos casos, únicamente la desestructuración del bosque de ribera (desaparición de especies autóctonas o ausencia de éstas), la geomorfología del lecho (sin fisuras o fracturas que permitan la circulación de agua subterránea durante el estiaje) y los usos antiguos del medio (minería y carboneo, por ejemplo) parecen explicar la ausencia de la especie.

Seguimiento de las poblaciones de nueva creación

Existe una gran incertidumbre sobre los criterios a tener en cuenta en el momento de la elección de un torrente como candidato a crear en él una nueva población. Para subsanar esta incertidumbre se han utilizado los resultados obtenidos en los seguimientos anteriores, tanto a nivel de especie como de hábitat, y se ha modelizado a largo plazo cómo evolucionarían las poblaciones a partir de la introducción de un número determinado de ejemplares, la capacidad de carga del medio y la curva de crecimiento poblacional registrada a partir de las estimaciones de los parámetros ecológicos obtenidos en los seguimientos de la especie y el hábitat (Villero *et al*., 2020) (Fig. 13).

En la selección del torrente hay otros parámetros que deben tenerse muy en cuenta. Por una parte, la selección de nuevas poblaciones debe incluir forzosamente una evaluación de costes por parte del proyecto para ver si son asumibles, y una estimación real de la disponibilidad de ejemplares a liberar. Es necesario una coordinación con los centros de cría para poder alcanzar las recomendaciones de liberación y refuerzo propuestos por los estudios de modelización. En todo caso, el número de torrentes que pueden albergar nuevas poblaciones estará siempre determinado por esta disponibilidad de ejemplares y por otro aspecto poco biológico pero muy realista: la propiedad y gestión de la localidad propuesta. Si existen hábitats adecuados es preferible que éstos sean de titularidad pública ya que facilita la gestión. En caso contrario es necesario llegar a acuerdos con el propietario, que pueden ser desde una simple autorización, un acuerdo de custodia, una permuta o incluso una compra. La importancia de las acciones de sensibilización y conocimiento propuestas en el proyecto Life Tritó del Montseny, entre los muchos objetivos, pretende que los propietarios forestales entiendan la importancia de conservar esta especie, y para ello es necesario seducirlos ambientalmente y que ellos mismos entiendan el beneficio, no necesariamente económico, que supone la conservación de las poblaciones de *C. arnoldi* como un acervo cultural, natural, histórico y de futuro sostenible, que debe mantenerse para futuras generaciones.

Una vez seleccionado el torrente es imprescindible determinar el tramo de la liberación y decidir qué protocolo de seguimiento se va a realizar. En el caso de uno de los torrentes en que se ha realizado la liberación de individuos la metodología de seguimiento ha sido la siguiente:

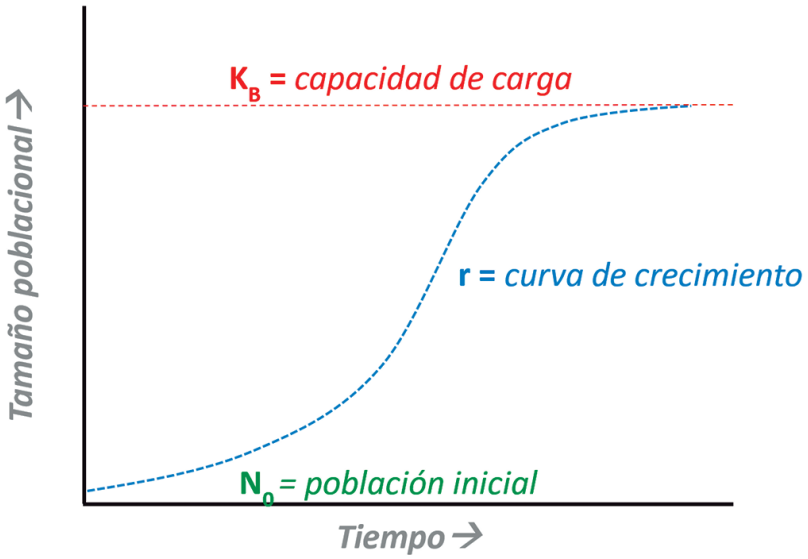

Fig. 13. - Modelo teórico de la evolución de una introducción. Modificado de Villero *et al.* 2020.

- Selección de un tramo de 100 m, aproximadamente, considerado como óptimo.
- Determinación de 21 puntos de liberación georreferenciados.
- Liberación de ejemplares adultos marcados con microchips para identificación individual y estimación de la dispersión en un hábitat nuevo.
- Realización de tres censos nocturnos anuales con búsqueda activa de ejemplares.
- Los transectos se realizan por un número variable de prospectores (entre cuatro y ocho), ya que el objetivo no es evaluar densidades sino capturar el número máximo de ejemplares para determinar el nivel de asentamiento (Fig. 14) y adaptación en función de los desplazamientos realizados, variación de peso, de talla.
- Los individuos recapturados son identificados mediante el lector de microchips, se georreferencian y se realiza la morfometría correspondiente. Posteriormente se liberan en el mismo lugar de captura.
- El seguimiento debe prolongarse hasta el cuarto o quinto año para poder tener confirmación del éxito reproductor, determinar el grado de asentamiento y estimar los parámetros bióticos y abióticos que pueden explicar la distribución de los ejemplares a lo largo del torrente. Es evidente que los tritones liberados, provenientes todos ellos de cría en cautividad, precisan de un tiempo de reconocimiento y elección del microhábitat más adecuado. Esto comportará sin duda dispersiones o agrupaciones en las zonas más favorables para la especie. La liberación de los tritones en tramos evaluados como óptimos por un comité creado al respecto no implica que sea el finalmente elegido por los ejemplares liberados, por mucho que los criterios de elección se hayan elaborado a partir de datos y modelos lo más objetivos posible.
- En los siguientes años debe reforzarse la población en función de los modelos elaborados por Villero *et al*. (2020).

AGRADECIMIENTOS

Este estudio es el resultado de la participación y trabajo de muchas personas y entidades que han generado y colaborado en muchos estudios, memorias y publicaciones, como puede observarse en la bibliografía. Me remito a ellos como copartícipes de la autoría del mismo. Sin embargo, quiero destacar aquí varias instituciones y personas que de una forma u otra son responsables de esta publicación. En primer ligar agradecer a Marc Franch, Olatz San Sebastián, Àlex Richter-Boix y Xavier Santos por la amistad y las muchas horas y años de campo y de redacción de memorias y publicaciones compartidas. A Adrià Jordà por dejarse engañar como alumno desde secundaria, ser un acompañante incondicional en el campo e insistir en convertirse en el experimentado herpetólogo que ya es. A Dani Fernández-Guiberteau por compartir muchas horas de campo y amistad, y gran parte del tiempo del trabajo y estudio del tritón del Montseny y otros anfibios. Su entusiasmo, capacidad de gestión, conocimiento de las comunidades herpetológicas y su habilidad en el campo son difíciles de encontrar. Al personal del Life Tritó del Montseny del Parc Natural-Reserva de la Biosfera del Montseny por su gran entusiasmo, horas y horas de dedicación y colaboración, y por permitirnos participar en este proyecto Life (Dani Guinart, Sonia Solorzano, Jordina Grau), y muy especialmente a los guardaparques del Montseny, Xavier y Lluís, cuyo trabajo, entusiasmo y conocimiento del terreno han sido imprescindibles para llevar a buen puerto estos estudios). Al personal de Torreferrussa: Francesc Carbonell, Mónica Alonso y Raquel Larios por ser parte de este trabajo y estar siempre dispuestos a participar en los seguimientos. A Fèlix Amat por convencernos para realizar el seguimiento de las poblaciones de *C. arnoldi*, ¡Moltes gràcies! También a Jordi-García Petit, Director del Parc Natural del Cadí-Moixeró por priorizar los seguimientos de *C. asper* en dicho parque y por las facilidades dadas para ello. Finalmente, al gran número de compañeros que en un momento u otro han participado de estos estudios: Gustavo Llorente, Xavier Santos, Dani Villero, Núria Garriga y un sinfín de herpetólogos más. Los estudios realizados

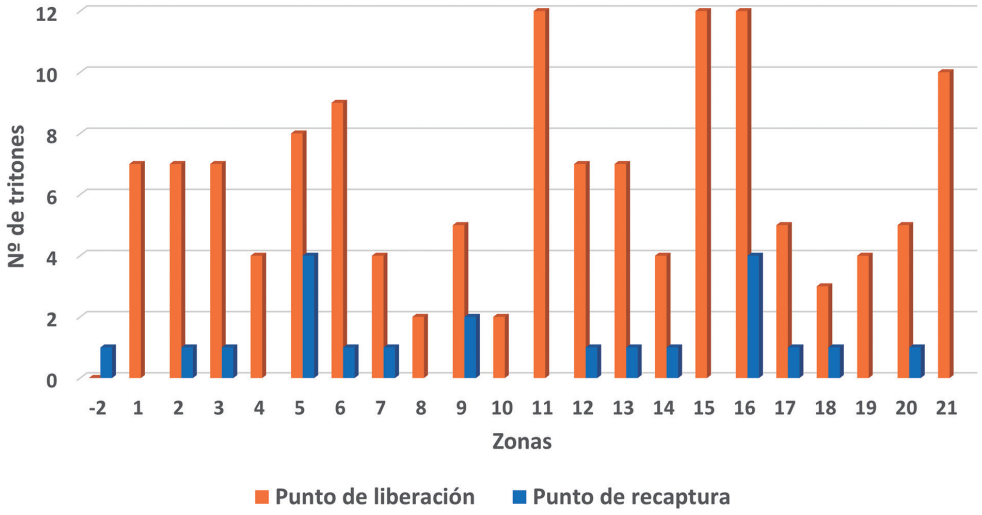

Fig. 14. - Distribución de los ejemplares liberados a lo largo del torrente elegido para el asentamiento de una nueva población y distribución de las recapturas después de seis censos realizados.

fueron autorizados en cada periodo de estudio mediante los correspondientes permisos otorgados por la Conselleria correspondiente de la Generalitat de Catalunya y por la administración de los Parques en los que se ha trabajado.

BIBLIOGRAFÍA

AHE (Asociación Herpetológica Española), 2012. Resultados de los dos primeros años de seguimiento del programa SARE. Informe inédito. 26 pp.

AHE (Asociación Herpetológica Española), 2016. Diseño de un plan de seguimiento de las poblaciones de anfibios en 10 parques nacionales de la red. Asociación Herpetológica Española- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (Magrama). Informe inédito. 96 pp.

Andreu, A.C., 2014. Seguimiento de anfibios y reptiles en Doñana. Bol. Asoc. Herpetol. Esp. 25(2), 65-75.

Arévalo, V., Álvarez, F., Morales, J., Flechoso, M.F., Gosá, A., Lizana, M., 2015. Manual para el muestreo y seguimiento de anfibios. En: MEDWETRIVERS proyecto LIFE 11 NAT/ES/699 MEDWETRIVERS. Programa de gestión y seguimiento de las zonas húmedas y riberas mediterráneas incluidas en la red natura 2000 en Castilla y León. Acción A3: Inventario de especies de interés comunitario de LIC/ZEPA Fluviales y Humedales Mediterráneos en Castilla y León. Universidad de Salamanca. 19 pp.

Ayllón, E., Gómez-Calmaestra, R., 2014. Introducción al programa para el seguimiento a largo plazo de las poblaciones de anfibios y reptiles en el territorio español (Programa SARE). Bol. Asoc. Herpetol. Esp. 25(2), 3-11.

Babbitt, K.J., Baber, M.J., Tarr, T.L., 2003. Patterns of larval amphibian distribution along a wetland hydroperiod gradient. Can. J. Zool. 81, 1539-1552.

Bosch, J., Martínez-Solano, I., García-París, M., 2001. Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of Central Spain. Biol. Conserv. 97, 331-337.

Bosch, J., González-Miras, E. (eds.), 2012. Seguimiento de *Alytes dickhilleni*: Informe final. Monografías SARE. Madrid: Asociación Herpetológica Española, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

Bosch, J., Fernández-Beaskoetxea, S., 2014. Quince años de seguimiento de las poblaciones de anfibios del macizo de Peñalara (Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama, Madrid). Bol. Asoc. Herpetol. Esp. 25(2), 30-37.

Bragg, A.N., 1960. Population fluctuation in the amphibian fauna of Cleveland County, Oklahoma during the past twenty-five years. Southwest. Nat. 5, 165-169.

Campeny, R., Villero, D., 2007. Seguimiento a largo plazo de las poblaciones de anfibios en cinco espacios protegidos de Catalunya. Munibe, Cienc. nat. 25, 224-237.

Campeny, R., Fernández-Bou, M., Carol, Q., 2016. Seguiment de les poblacions d'amfibis al Parc del Garraf 2004-2011. Monografies de la Diputació de Barcelona. Col·lecció Documents de treball. Sèrie Territori 31, 112-120.

Campeny, R., Ferran, A., Fernández, M., Vila-Escarré, M., 2017. Seguiment de les poblacions d'amfibis del Parc del Montnegre i el Corredor 2004-2014: algunes dades sobre les tendències observades. III Trobada d'Estudiosos de la Serralada Litoral Centrals i del Montnegre i el Corredor. Sèrie Territori i Parcs Naturals 2, 199-211.

Carrera, D., Villero, D., 2008. Els amfibis de la conca de la Tordera. En: Boada, M., Mayo, S., Roser, M. [Cur.]. Sistema socioecològics de la conca de la Tordera. Barcelona: Institució Catalana d'Història Natural, pp.375-410.

Carranza, S., Amat, F., 2005. Taxonomy, biogeography and evolution of *Euproctus* (Amphibia: Salamandridae), with the resurrection of the genus *Calotriton* and the description of a new endemic species from the Iberian Peninsula. Zool. J. Linn. Soc. 145, 555-582.

Carranza, S., Martínez-Solano, I., 2009. *Calotriton arnoldi*. En: IUCN 2014 . IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 07 February 2021.

Catenazzi, A., 2015. State of the World's Amphibians. Annu. Rev. Environ. Resour. 40, 91-119. Doi: 10.1146/annurev-environ-102014-021358.

Clergue-Gazeau, M., 1972. L'Euprocte Pyreneen. Conséquences de la vie cavernicole sur son developpement et sa reproduction. Thèse présentée a la Faculté des Sciences de l'Université Paul-Sabatier pour obtenir le grade de docteur ès Sciences naturelles. N° d'ordre 479. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique.

Clergue-Gazeau M., 1981. Cycles sexuels des urodèles pyrénéens à tendance aquatique. Rôle de la température. I. Les mâles (*Euproctus asper* Dugès- *Triturus helveticus* Razoumowsky). Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse, 117, 16-40.

Clergue-Gazeau, M., 1982a. Variation du cycle sexuel des urodèles pyrénéens à tendance aquatique. Rôle de la température. II. Les femelles. (*Euproctus asper* Dugès, *Triturus helveticus* Razoumowski). Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse, 118, 153-159.

Clergue-Gazeau, M., 1982b. Influence de plusieurs facteurs de l'environnement sur la reproduction de l'espèce *Euproctus asper* Dugès (Amphibia, Caudata, Salamandridae). P. Centr. Pir. Biol. Exp. 13, 25-31.

Clergue-Gazeau M., Beetschen J.C., 1966. Contribution à l'étude de la reproduction de l'Urodèle *Euproctus asper* (Dugès) dans les Pyrénées centrales et ariégeoises. Ann. Limnol. 2(1), 217-226.

Clergue-Gazeau, M., Martínez-Rica, J.P., 1978. Les différents biotopes de l'urodèle pyrénéen, *Euproctus asper*. Bull Soc. Hist. Nat. Toulouse 114(3-4), 461-471.

Colomer, M.A., Montori, A., García, E., Fondevila, C., 2014. Using a bioinspired model to determine the extinction risk of *Calotriton asper* populations as a result of an increase in extreme rainfall in a scenario of climatic change. Ecol. Model. 281 (2014), 1–14. https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2014.02.018.

Dale, V.H., Beyeler, S.C., 2001. Challenges in the development and use of ecological indicators. Ecol. *Indic*. 1, 3–10.

Ekos Estudios Ambientales, 2012. Seguimiento de los anfibios y reptiles de la CAPV. Memoria inédita. Gobierno Vasco. Departamento de Medio Ambiente y Política Territorial. 49 pp.

Enriquez-Urzelai, U., Bernardo, N., Moreno-Rueda, G., Montori, A., Llorente, G.A., 2019. Are amphibians tracking their climatic niches in response to climate warming? A test with Iberian amphibians. *Climatic Change* 154, 289–301. https://doi.org/10.1007/s10584-019-02422-9

Fernández-Guiberteau, D., Montori, A., 2019. Projecte de seguiment dels batracis al Parc del Garraf (2019). Memòria técnica. Memoria Inédita. Diputació de Barcelona-GRENP. 70 pp.

Fernández-Guiberteau, D., Montori, A., 2020. Les malalties infeccioses en amfibis. Manual de bones pràctiques en les activitats educatives de descoberta. Gemma Pascual, Narcís Vicens i Daniel Guinart (Coord.). Life Tritó del Montseny. 20 pp. https://lifetritomontseny.eu/documents/107349215/342993610/Bones_PractiquesWEB.pdf/11a7c63b-cd53-0e37-0cf5-737c18dade-d8?t=1602242474228.

Fernández-Guiberteau, D., Montori, A., Pérez-Sorribes, L., Carranza, S., 2020. Bioseguretat: Protocols sanitaris per a les activitats que impliquin la interacció directa o indirecta amb les poblacions d'amfibis al medi natural. Parc del Montnegre-Corredor-Parc Natural i Reserva de la Biosfera del Montseny. Diputació de Barcelona. 14 pp. https://lifetritomontseny.eu/documents/107349215/129237140/Protocol_Bioseguretat_2020+esp.+medi+aqu%C3%A0tic.pdf/088814f9-03bd-4749-8bc8-ece5c97a9e3b

Franch, M., Montori, A., Sillero, N., Llorente, G.A., 2015. Temporal analysis of *Mauremys leprosa* (Testudines, Geoemydidae) distribution in northeastern Iberia: unusual increase in the distribution of a native species. Hydrobiologia 757, 129–142. https://doi.org/10.1007/s10750-015-2247-8

Galán, P., 1999. Conservación de la herpetofauna gallega. Situación actual de los anfibios y reptiles de Galicia. Universidade da Coruña. Monografía 72. A Coruña. 286 pp.

Galán, P., 2014. Seguimiento de las poblaciones de anfibios y reptiles en Galicia. Bol. Asoc. Herpetol. Esp. 25(2), 43-51

Gardner, T., 2001. Declining amphibian populations: a global phenomenon in conservation biology. Anim. Biodiv. and Conserv. 24.2(2), 25-44.

Gascon, C., Collins, J.P., Moore, R.D., Church, D.R., Mckay, J.E., Mendelson, J.R. III. (eds.), 2007. Amphibian Conservation Action Plan. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.

Gosá, A., Bergerandi, A., 1994. Atlas de distribución de los Anfibios y Reptiles de Navarra. Munibe, Cienc. nat. 46, 109-189.

Gosá, A., Sarasola, V., 2007. Seguimiento de una población costera de rana bermeja (*Rana temporaria*). Munibe Suplemento25, 88-93,

Gosá, A., Sarasola, V., Crespo-Diaz, A., 2013. Seguimiento y determinación de la situación de *Rana dalmatina*. Campaña 2013. GAN. Gobierno de Navarra. Memoria inédita. 32pp.

Gosá, A., Garin-Barrio, I., Cabido, C., Laza-Martínez, A., Rubio, X., 2018a. Seguimiento de anfibios en espacios protegidos del País Vasco y Navarra. I. Parques Naturales de Izki y Valderejo (Álava). Munibe, Cienc. nat. 66, 129-142.

Gosá, A., Garin-Barrio, I., Fernández, A., Rubio, X., Cabido, C., 2018b. Estimación de la abundancia poblacional de tritón pirenaico en seis zonas especiales de conservación de Navarra. Gobierno de Navarra, 63 pp.

Gosá, A., Garín-Barrio, I., Rubio, X., Laza-Martínez, A., Cabido, C., Fernández, A., 2019. Seguimiento de anfibios en espacios protegidos del País Vasco y Navarra. II. Parque Natural de las sierras de Urbasa y Andía y Zonas Especiales de Conservación de la sierra de Aralar y Roncesvalles-Selva de Irati (Navarra). Munibe, Cienc. nat. 67, 75-91.

Greenberg, C., Zarnoch, S., Austin, J., 2018. Long-term amphibian monitoring at wetlands lacks power to detect population trends. Biological Conservation 228, 120–131.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., DeWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. Royal Soc. B: Biol. Sci. 270(1512), 313–321. https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218.

Houlahan, J.E., Findlay, C.S., Schmidt, B.R., Meyer, A., Kuzmin, S.L., 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. Nature 404, 752-755.

Isasi-Catalá, E., 2011. Los conceptos de especies indicadoras, paraguas, banderas y claves: su uso y abuso en ecología de la conservación. Interciencia 36(1), 31-38.

IUCN, 2020. The IUCN red list of threatened Species. https://www.iucnredlist.org/ [Consulta: 21 noviembre 2020].

Jennings, M.R., Hayes, M.P., 1985. Pre-1900 overharvest of California red-legged frogs (*Rana draytonii*): the inducement for bullfrog (*Rana catesbeiana*) introduction. Herpetologica 41(1), 94-103.

Ledesma, J.L.J., Montori, A., Altava-Ortiz, V., Barrera-Escoda, A., Cunillera, J., Àvila, A., 2019. Future hydrological constraints of the Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*) under changing climate and vegetation cover. Ecol. Evol. 2019, 00, 1–12. https://doi.org/10.1002/ece3.5506.

Llorente, G.A., San Sebastián, O., Franch, M., Richter-Boix, A., 2007. Seguiment d'amfibis de Catalunya (SAC). Informe tècnic. Barcelona: Departament de Medi Ambient i Habitatge. Generalitat de Catalunya. 25 pp.

Loras, F., 2019. Seguiment per observació focal d'una població perifèrica de Calotriton asper (Dugès, 1852) a la Garrotxa. Butll. Soc. Cat. Herpet. 27, 14-25.

Martel, A., Vila-Escarré, M., Fernandez-Guiberteau, D. *et al*., 2020. Integral chain management of wildlife diseases. Conservation Letters 2020,13, e12707. https://doi.org/10.1111/conl.12707.

Martínez-Silvestre, A., García-Salmerón, A., Pujol-Buxó, E., Baena, O., Loras, F., Maluquer-Margalef, J., Thumsová, B. y Bosch, J. En prensa. Anàlisi de les malalties emergents dels amfibis dins de 7 parcs de la Xarxa de Parcs Naturals de la Diputació de Barcelona. Butlletí de la Societat Catalana d'Herpetologia 29.

Minuartia, Estudis Ambientals, 2012. Seguiment de les poblacions d'amfibis del Parc del Garraf / 2011. Diputació de Barcelona. Oficina Tècnica de Parcs Naturals. Document inèdit. 46 pp + 1 annex.

Minuartia, Estudis Ambientals, 2013. Tractament de les dades de seguiment de les poblacions d'amfibis del Parc de Sant Llorenç del Munt i Serra de l'Obac. Any 2012. Document inèdit. Diputació de Barcelona. 48 pp.

Minuartia, Estudis Ambientals, 2016. Tractament de les dades de seguiment de les poblacions d'amfibis al parc del Garraf. 2015 i 2016. Document inèdit. Diputació de Barcelona. 60 pp.

Miró, A., O'Brien, D., Tomàs, J., Buchaca, T., Sabás, A., Osorio, V. Lucatia, F., Pou-Rovirae, Q., Ventura, M., 2020. Rapid amphibian community recovery following removal of non-native fish from high mountain lakes. Biol. Conserv. 251, 108783.

Montori A., 1988. Estudio sobre la biología y ecología del tritón pirenaico Euproctus asper (Dugès 1852) en la Cerdanya. Ph.D. thesis, University of Barcelona.

Montori, A., 1991. Alimentación de los adultos de tritón pirenaico Euproctus asper (Dugès, 1852), en el prepirineo de la Cerdanya (España). Rev. Esp. Herp. 5, 23-36.

Montori, A., 1992. Alimentación de las larvas de tritón pirenaico, Euproctus asper, en el prepirineo de la Cerdaña, España. Amphibia-Reptilia 13, 157-167.

Montori A., 1997. Trophic segregation between the Pyrenean Newt (*Euproctus asper*) and the Brown Trout (*Salmo trutta fario*). En: W. Bohme, W. Bischoff, and T. Ziegler (eds.), Herpetologia Bonnensis, Societas Europaea Herpetologica, Bonn, Germany, pp. 273 – 278.

Montori, A., Herrero, P., 2004. Caudata. En: Amphibia, Lissamphibia. Fauna Ibérica, Vol. 24, pp. 43-275. Ramos, M.A., Ed. Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, Madrid.

Montori, A., Llorente, G.A., Richter-Boix, À., 2008. Habitat features affecting the small-scale distribution and longitudinal migration patterns of *Calotriton asper* in a Pre-Pyrenean population. Amphibia-Reptilia 29, 371-381.

Montori, A., Llorente, G.A., Carretero, M.A., Santos, X., Richter-Boix, A., Franch, M., Garriga, N., 2007. Bases para la gestión forestal en relación con la herpetofauna. Camprodon i Subirach, J., Plana Bach, E. (Eds.). Conservación de la biodiversidad, fauna vertebrada y gestión forestal. 2ª edición revisada y ampliada. Universitat de Barcelona.

Montori, A., Richter-Boix, A., Franch, M., Santos, X., Garriga, N., Llorente, G.A., 2012. Natural fluctuations in a stream dwelling newt as a result of extreme rainfall: A 21-year survey of a *Calotriton asper* population. Basic and Applied Herpetology 26, 43–56. https ://doi. org/10.11160/ bah.12001.

Montori A., Llorente G. A., 2014. Tritón pirenaico — *Calotriton asper*. En: Salvador, A., Martínez-Solano,I. (eds.). Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, pp. 1 – 28.

Montori, A., Llorente, G.A., Villero, D., 2014. Recursos SARE: AHEnuario y base de datos. Utilización del SIARE para la incorporación de observaciones de anfibios y reptiles de España. Bol. Asoc. Herpetol. Esp. 25(2), 112-117.

Montori, A., Jordà, A., 2018. Seguiment de les poblacions d'amfibis adults al Parc del Garraf, període 2009-2018. Programa SARE de l'AHE. VIII Trobada d'Estudiosos del Garraf i d'Olèrdola. Sèrie Territori i Parcs Naturals 6, 153-164.

Moreno-Rueda, G., Pleguezuelos, J.M., Pizarro, M., Montori, A., 2012. Northward shifts of the distributions of Spanish reptiles in association with climate change. Cons. Biol. 26, 278–283.

NARRS, 2013. Amphibian Survey Protocols (v. 2013). Amphibian and Reptile Groups of the United Kingdom.

Nicholson, E., Possingham, H., 2006. Objectives for multiple-species conservation planning. Cons. Biol. 20, 871-881.

Noss, R., 1990. Indicators for monitoring biodiversity: A hierarchical approach. Cons. Biol. 4, 355-364.

Olano, I., Ruiz De Azua, N., Fernández, J.M., Arrayago, M.J., Bea, A., 2007. Estado de conservación de poblaciones periféricas de anfibios: tritón pirenaico *Euproctus asper* y sapo de espuelas *Pelobates cultripes* en la Comunidad Autónoma del País Vasco. Munibe. Suplemento 25, 66-73.

Oliver, J.A., Manzano, X., Pinya, S., 2014. Contando ferrerets. Veinticinco años de recuentos visuales de una especie en peligro de extinción. Bol. Asoc. Herpetol. Esp. 25(2), 37-43.

OAPN. Organismo Autónomo de Parques Nacionales, 2020. Conservación y seguimiento de anfibios en la Red de Parques Nacionales. Adaptándonos al cambio. Boletín de la Red de Parques Nacionales 64. 51 pp.

Pleguezuelos, J.M., Márquez, R., Lizana, M. (eds.), 2002. Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza –Asociación Herpetológica Española. Madrid.

Pujol-Buxó, E., Martínez-Silvestre, A., García-Salmerón, A., Baena, O., Valera, J., Loras, F., Bosch, J., Maluquer-Margalef, J. En prensa. Resultats del primer any de seguiment estandarditzat d'amfibis al Parc Natural de Sant Llorenç del Munt i l'Obac. X Trobada d'Estudiosos del Parc Natural de Sant Llorenç del Munt i l'Obac. Sèrie Territori i Parcs Naturals. Diputació de Barcelona.

Redford, K., Coppolillo, P., Sanderson, E., Da Fonseca, G., Dinerstein, E., Groves, C., Mace, G., Maginnis, S., Mittermeier, R., Noss, R., Olson, D., Robinson, J., Vedder, A., Wrigth, M., 2003. Mapping the conservation landscape. Cons. Biol. 17, 116-131.

Reques, R., 2008. Seguimiento de las comunidades de anfibios del río Guadiamar. En: Montes, C., Carascal, F. (Coord.). La restauración ecológica del río Guadiamar y el proyecto de corredor verde. La historia de un sistema socioecológico emergente. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Junta de Andalucía. Capítulo 13, 251-262.

Richter-Boix, A., Llorente, G.A., Montori, A., 2006a. Breeding phenology of an amphibian community in a Mediterranean area. Amphibia-Reptilia 27, 544-559.

Richter-Boix, A., Llorente, G.A., Montori, A., 2006b. A comparative analysis of the adaptive developmental plasticity hypothesis in six Mediterranean anuran species along a pond permanency gradient. Evol. Ecol. Res. 8, 1139-1154.

Rodrigues, A.S.L., Brooks, T.M., 2007. Shortcuts for biodiversity conservation planning: The effectiveness of surrogates. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 38, 713-737.

Rojas-Castro, H., Araya-Crisóstomo, S., 2019. Medidas de conservación ex situ: Un enfoque metapoblacional a partir del modelo clásico de Levins. Gayana 83(1), 46-56. http://dx.doi.org/10.4067/S0717-65382019000100046.

San Sebastián, O., Franch, M., Richter-Boix, A., Montori, A., 2017. Situació del tritó pirinenc (Calotriton asper, Dugès, 1852) en el Parc Natural del Cadí-Moixeró. Estudi preliminar de l'estat de conservació a la vall de Pi i Ingla – 2017. Memòria Inèdita. AHE-PNCM. 12 pp.

San Sebastián, O., Montori, A. , Franch, M., Richter-Boix, A., 2018. Situació del tritó pirinenc (Calotriton asper, Dugès, 1852) al Parc Natural del Cadí-Moixeró. Segona fase: 2018. Memòria Inèdita. AHE-PNCM. 104 pp.

San Sebastián, O., Montori, A. , Franch, M., Richter-Boix, A., 2019. Situació del tritó pirinenc (Calotriton asper, Dugès, 1852) al Parc Natural del Cadí-Moixeró. Tercera fase: 2019. Memòria Inèdita. AHE-PNCM. 89 pp.

San Sebastián, O., Montori, A. , Franch, M., Richter-Boix, A., 2020. Situació del tritó pirinenc (Calotriton asper, Dugès, 1852) al Parc Natural del Cadí-Moixeró. Quarta fase. Memòria Inèdita AHE-PNCM. 114 pp.

Sánchez-Hernández, J., Montori, A., Llorente, G.A., 2019. Ontogenetic Dietary Shifts and Food Resource Partitioning in a Stream-Dwelling Urodela Community: Mechanisms to Allow Coexistence Across Seasons. Russ. J. Herpet. 26(3), 135 – 149. DOI: 10.30906/1026-2296-2019-26-3-135-149.

Servei Geològic de Catalunya, 1983. Efectes geomorfològics dels aiguats del novembre de 1982. Publicacions del servei Geològic de Catalunya. Informes 1. 246pp.

Skelly, D.K., Yurewicz, K.L., Werner, E.E., Relyea, R.A., 2003. Estimating Decline and Distributional Change in Amphibians. Cons. Biol. 17(3), 744–751.

Tejedo, M., 2003. El declive de los anfibios. La dificultad de separar las variaciones naturales del cambio global. Munibe Suplemento 16, 20-43.

Temple, H.J., Cox, N.A., 2009. European Red List of Amphibians. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities-IUCN. 33pp. ISBN 978-92-79-11356-7.

Valbuena-Ureña, E., Amat, F., Carranza, C., 2013. Integrative phylogeography of *Calotriton* newts (Amphibia, Salamandridae), with special remarks on the conservation of the endangered Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*). PLoS ONE 8, e62542. DOI:10.1371/journal.pone.0062542.

Van Buskirk, J., 2003. Habitat partitioning in European and North American pond-breeding frogs and toads. Div. Distrib. 9, 399-410.

Vieites, D.R., Peso, M., Nieto, S., 2014. Bases para la conservación de las ranas pardas, *Rana pyrenaica* y *Rana temporaria*, en el Pirineo. En: Proyectos de investigación en parques nacionales: 2011-2014. MITECO, 231-256.

Villero, D., Amat, F., Canesa, S., Guinart, D., Hermoso, V., Salgado-Rojas, J., Solórzano, S., Brotons, L., 2020. Avaluació de l'estratègia per ampliar l'àrea de distribució del tritó del Montseny: Planificació de la creació de noves poblacions. InForest JRU CTFC-CREAF, Diputació de Barcelona. Document inèdit. 19 pp.

Wellborn, G.A., Skelly, D.K., Werner, E.E., 1996. Mechanisms creating community structure across a freshwater habitat gradient. Annu. Rev. Ecol. Syst. 27, 337-363.

Wilcox, B.A., 1984. In Situ Conservation of Genetic Resources: Determinants of Minimum Area Requirements. Conference: National Parks, Conservation and Development. Proceedings of the World Congress on National Parks. J.A. McNeely and K.R. Miller, Smithsonian Institution Press. Pp. 18-30.

Witmer, G.W., 2005. Wildlife population monitoring: some practical considerations. Wildl. Res. 32(3), 259.

Wright, A.H., Wright, A.A., 1949. Handbook of Frogs and Toads of the United States and Canada. Comstock, Ithaca, New York. 670 pp.

Munibe Monographs. Nature Series • 5 (2023) • 83-93 • Donostia-San Sebastián • ISSN 2340-0463 - eISSN 2340-3055

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.
*Correspondencia: 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_b y N_e) 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_b and N_e) 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 gehienen populazio-dinamiken ezagutza-egoera urria eta zatikatua da, eta ia ez dago hutsune horiek bete ditzakeen ikerketarik. Lan honetan, 2009an Guadarrama mendilerroan (Madril) hasi eta gaur egun arte etenik gabe mantendu den anfibio-komunitate baten epe luzerako jarraipen-programaren emaitza nagusiak laburbiltzen dira. Programa hau PIT-tag markaketaren bidez bildutako erregistro-historialen eta datu molekularren integrazioan oinarritzen da. Emaitzek erakusten dutenez, azterturiko 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

https://doi.org/10.21630/mmns.2023.5.06

(cc) BY-NC-ND

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 espezietan (*P. waltl, E. calamita, P. cultripes, H. molleri eta P. perezi*), *P. perezi* nabarmentzen delarik. Ugalketa-puntuen arteko migrazio-tasak asimetrikoak dira, hots, espezieek preferentzia desberdinak dituzte. Emaitza hauetan anbifioen 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 endémicas (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 (ranavirosis y quitridiomicosis) (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* Boscá, 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.*

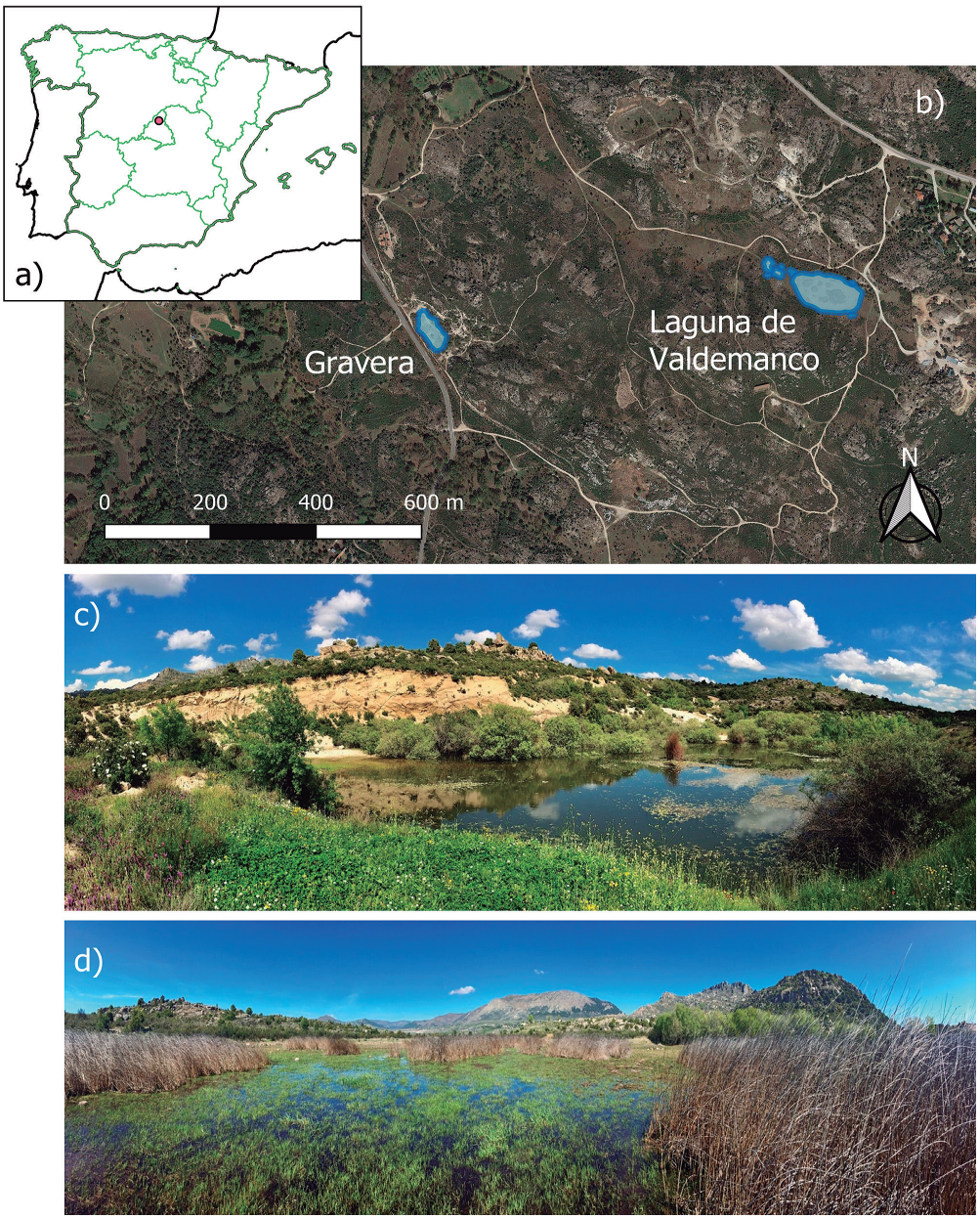

Fig. 1. - a) Localización del área de estudio al norte de la Comunidad de Madrid. b) Imagen de satélite en la que se marcan los dos principales humedales de estudio: la Gravera (fotografiada en detalle en c) y la Laguna de Valdemanco (fotografía d).

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)
Pleurodeles waltl	Macho	12,08	1,5	13,58
	Hembra	11,78*	1,5	13,28
Triturus marmoratus	Macho	3,08	4,17	7,25
	Hembra	7,42	4,4	11,82
Alytes cisternasii	Macho	10,64	2	12,64
	Hembra	7,16	2	9,16
Epidalea calamita	Macho	10,18	3	13,18
	Hembra	9,90	4	13,90
Pelobates cultripes	Macho	9,88	3	12,88
	Hembra	10,95	3	13,95
Hyla molleri	Macho	3,12	1	4,12
	Hembra	3,14	2	5,14
Pelophylax perezi	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.

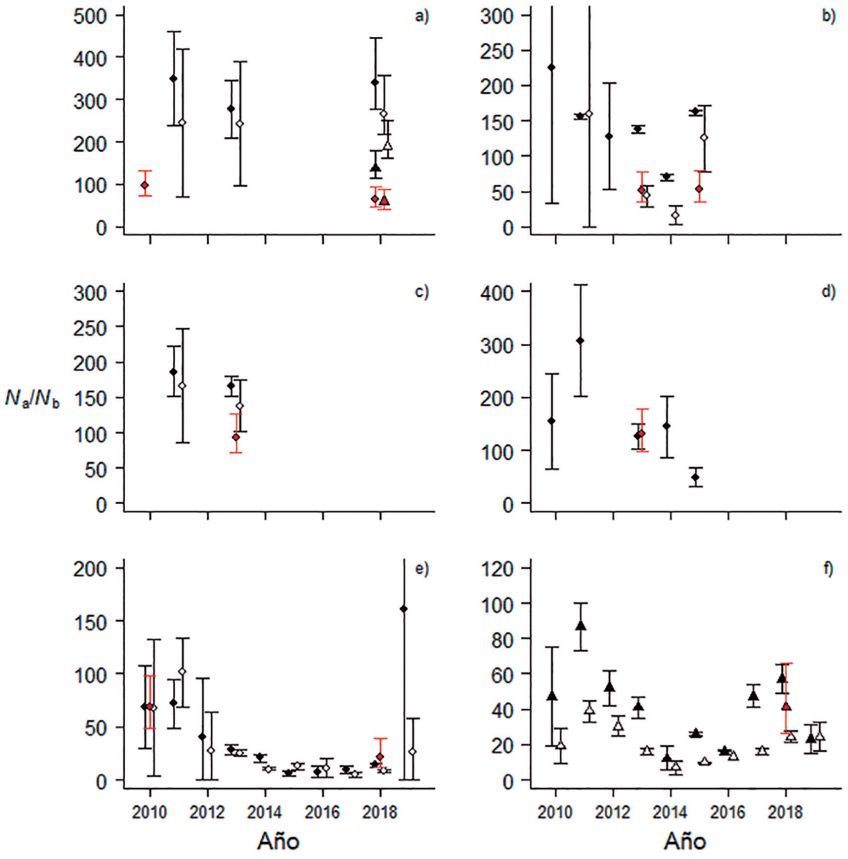

Fig. 4. - Estimaciones de abundancia (número de adultos de cada sexo, N_a; machos: símbolos negros, hembras: símbolos blancos) y número efectivo de reproductores (N_b, símbolos rojos; las estimaciones de *P. waltl* en 2018 corresponden al tamaño efectivo poblacional, N_e) para las poblaciones de la Laguna 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. cultripes* 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).

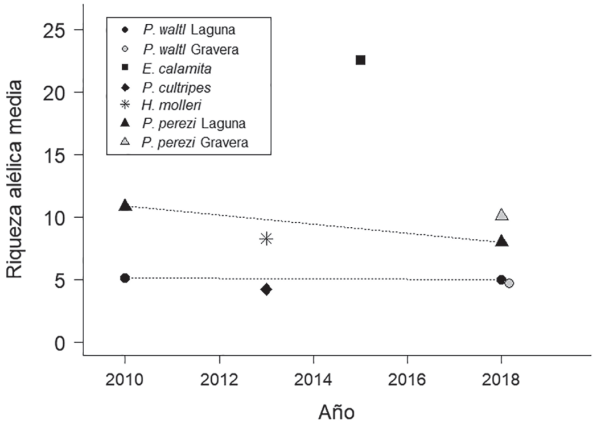

Fig. 5. - Estimaciones de diversidad genética (medida como riqueza alélica media) en las poblaciones de estudio.

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. cultripes, 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. cultripes* 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; $TMG_{Laguna\text{-}Gravera}$ = 31,8% $TMG_{Gravera\text{-}Laguna}$ = 5,2%, Fernández de Larrea *et al*., 2021) como en *P. perezi* (G_{ST} = 0,082; $TMG_{Laguna\text{-}Gravera}$ = 16,2% $TMG_{Gravera\text{-}Laguna}$ = 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. cultripes* 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. cultripes* (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;

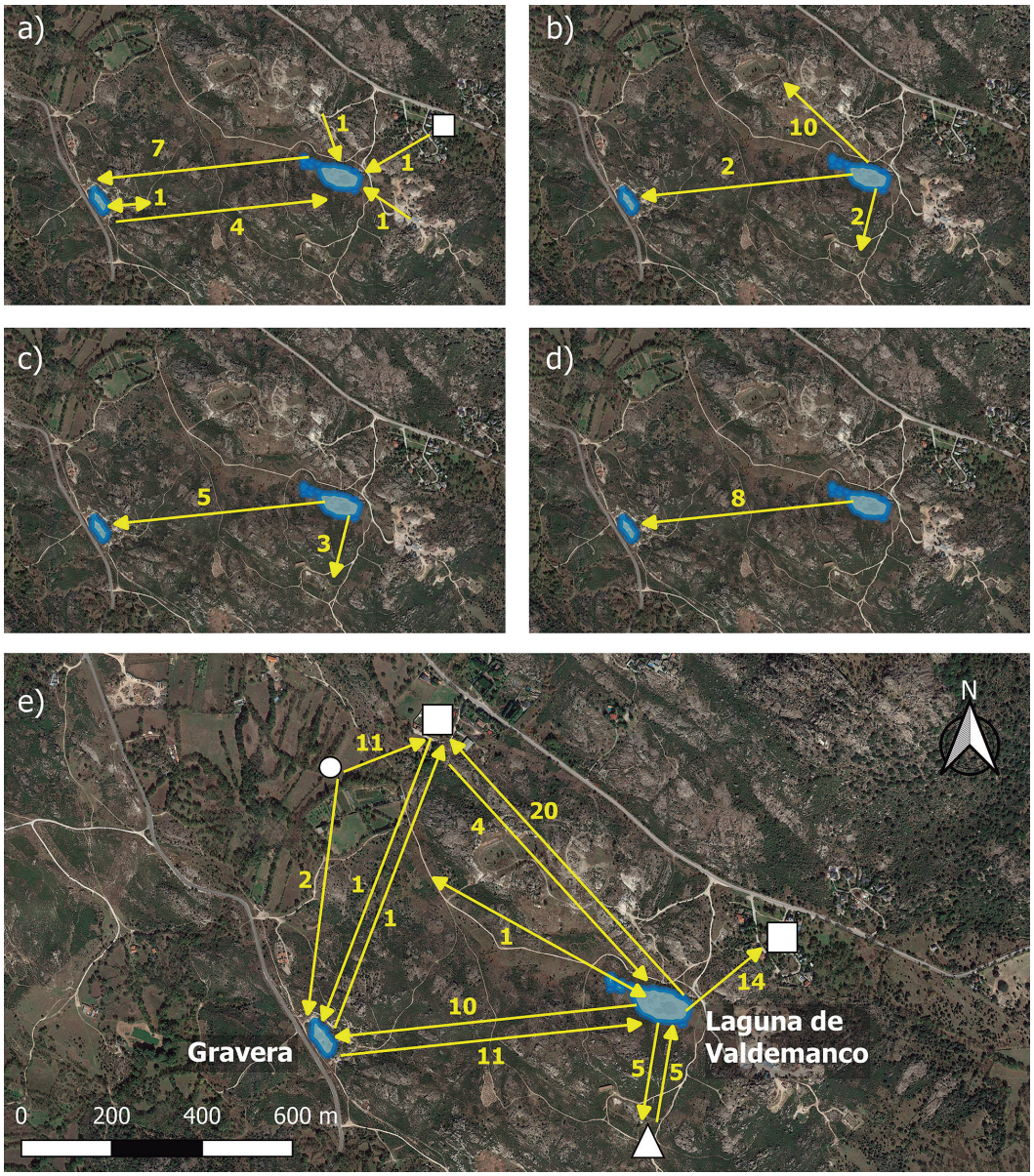

Fig. 6. - Número de desplazamientos (algunos individuos han realizado más de un desplazamiento) observados para cada especie a través de los diferentes puntos muestreados en el área de estudio. Se indica la localización de los dos puntos de reproducción principales del área de estudio (Laguna de Valdemanco 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. cultripes* 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. cultripes* 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 congenérica *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 Iranzo, 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. Heredity 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 squelettochronologie. 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.

Cruickshank, 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., Antoł, 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 syntopic 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.

ONDORIOAK

2020ko urriaren 16 eta 17an, Aranzadi Zientzia Elkarteak Donostian duen Zorroagako egoitzan ***Anfibioen kontserbaziorako III. jardunaldiak: populazio mehatxatuen jarraipena*** ospatu ziren. Bileran parte hartu zuten ikerketa zentro desberdinetako eta elkarte zientifikoetako hainbat herpetologo, Espainiako estatuko hainbat erkidegoetatik etorritakoak eta Aranzadiko zenbait kide. Programak 11 hitzaldi eta bi mahai inguruz osatuta egon zen, lehen egunean populazioen jarraipena jorratu zelarik eta, aldiz, bigarrengoan anfibioak erasaten dituzten mehatxuen gaia landu zen. Orokorrean jardunaldietan parte hartu zuten kide guztiek nabarmendu zuten anfibioen mehatxuak aztertu behar direla epe luzeko populazioen jarraipen lanetan, haien kontserbazio-egoeraren azterketa balioztatzeko. Jarraian, Jardunaldietako ekarpenetatik bildutako ondorioak adierazten dira, euren difusioa ahalbidetzeko:

1. Anfibioen jarraipenerako plan batean, gune desberdinak barneratu behar dira, populazioetan eragina duten faktoreak aintzat hartuz. Adibidez, espezie batek hartzen dituen estai-klimatiko desberdinetatik bildutako datuak barneratu behar dira, estai bakoitzean aldaketa klimatikoaren edo beste aldagai batzuen eragina desberdina izan daiteke eta. Era berean, babes maila duten guneak barneratzeaz gain (KBEak, Natura 2000 sarea) babestu gabeko zonaldeak ere. Izan ere, eremu horiek habitaten antropizazioan, kutsaduran edota plagiziden erabileran desberditasunak azaldu ditzakete.
2. Talde moduan anfibioek mundu mailan bizi duten mehatxu egoera aintzat hartuz, komenigarria litzake erkidego, estatu edota Europa mailako espezie mehatxatuez gain, jarraipen lanetan espezie arruntak barneratzea. Espezie bakan edo arraroak, berez, banako kopuru baxua izaten dute eta bere jarraipena gertakari estokastikoei lotuta egon daiteke, datu oso zatikatuak emanez. Espezie arruntek, ordea, epe ertainean populazio urrietan hauteman ezin diren murrizketak adierazi ditzakete.
3. Espezie bakoitzaren populazio joeraren informazioa biltzeko, erabiliko diren datuak desberdinak izan daitezke, espeziearen egoeraren (mehatxatua/arraro edo arrunta) arabera. Lehen kasuan, ugaritasun erlatiboko datuekin lan egingo da, populazioaren bilakaera ondorioztatuz, urtez urteko serie tenporalak konparatuz. Banaketa area zabala duten espezie arrunten kasuan, aurrez adierazitako prozedura posible izango ez balitz, populazioen egoeraren inguruko ondorioak atera daitezke, aurreko urteetan eta gaur egun hartutako lauki-sare kopuruen konparaziotik abiatuta, betiere aurreko datuak eskura izango balira. Halaber, ingurumen DNA teknika baliatuz, aurkitzeko errazak ez diren espezieen egungo banaketa sortu daiteke. Nolanahi ere, ahal den kasuetan, aukera nagusia ugaritasun erlatiboa neurtzeko jarraipena izango da.
4. Ugaritasun erlatiboko datuen bilketa urtero gauzatu beharko litzateke, anfibioen dinamika demografikoen berezko denbora-gorabeherak behar bezala adierazten dituzten denbora-serieak eta populazio-joerak ezarri ahal izateko. Zenbat eta urte gehiago izan, orduan eta fidagarriagoak izango dira ateratzen diren ondorioak, hamar urteko aldia optimoa izanik, eta bost urtekoa minimoa, ondorio adierazgarriak lortzeko bidean.
5. Datuak biltzeko aukeratutako eremua, urtean zehar bi edo hiru aldiz lagintzea gomendatzen da, eta espezie bakoitzaren aktibitate maximoaren garaian (espezieen artean aldakorra izan daiteke eta), laginketa aldien artean gutxienez astebete pasa beharko litzake.
6. Metodologia eta laginketa esfortzua estandarizatzearen garrantzia azpimarratzen da, bildutako datuak alderagarriak izan daitezen, bai laginketa puntuen artean edo zonaldeen artean, bai denboran zehar.
7. Datu-bilketa diseinatzean, laginketa puntu bakoitzeko ahaleginaren eta laginketa puntuen kopuruaren arteko arrazoiari dagokionez, lehena lehenestea gomendatzen da. Hala ere, ahal den neurrian, gertuko laginketa-puntu desberdinak barne hartu beharko litzake, anfibio askok duten funtzionamendu metapoblazionala dela eta. Espezie bakoitzeko laginketa-puntu independenteen kopurua 10 eta 15 artekoa izan beharko litzateke gutxienez. Nolanahi ere, estrategia bikoitza gomendatzen da: espezie mehatxatuen edo lokalizatuen kasuan, datuen kalitatea lehenestea eta laginketa-puntuen hautaketa egokia egitea; eta espezie arruntenen kasuan, laginketa-puntu gehiago dituzten lurralde-azalera handiagoa hartzea.
8. Aurreko puntuan azaldutakoaren arabera (datuen fidagarritasuna, datuen lurralde- eta espazio-alderaketa, etab.), boluntariotzatik edo herritarren zientziatik datozen datuak sartzea gomendagarria da espezie arrunten kasuan.
9. Ugaritasun erlatiboaren datuak biltzerakoan, helduen laginketak egitea gomendatzen da, larbenak baino. Hain zuzen ere, helduek populazioaren egoera hobeto adierazten baitute: larbek ez diete modu homogeneoan erantzuten beren garapena okertu dezaketen ingurumen-baldintzei. Nolanahi ere, erruteen zenbaketek, populazioaren indibiduo ugaltzaileen ugaritasuna estimatu dezakete.

10. Gaueko laginketak, orokorrean, anfibio helduak hautemateko metodologia eraginkorrena da, horrez gain, egunez hezeguneetan salabardo bidez gauzatutako laginketak, urodelo heldu eta anfibio espezie guztien larbak zenbatzeko balio dezakete. Laginketak udaberrian zehar gauzatu beharko lirateke, espezie bakoitzaren fenologia aintzat hartuz, betiere populazioaren zonaldea ere kontutan hartuz, ahal dela. Nahiz eta espezie batzuk bigarren aktibitate piko bat izan arren, udazkenera laginketak atzeratzea saihestu beharko litzateke, izan ere bertako zenbaketak eskasagoak izango dira.
11. Populazioek pairatzen duten estresaren parametro adierazgarriak, ugaritasun erlatiboko informazioarekin osatzea komeni da. Alde horretatik, datu bilketan populazioaren erantzun immunearen bilketa gomendatzen da. Izan ere, populazio baten egoera inmulogikoak afekzio kriptiko batez ohartarazi gaitzake, populazio horrek gainbehera esanguratsu bat jasan baino lehen. Informazio hau batez ere garrantzitsua da, espezie mehatxatu edo urrien kasuan.
12. Era berean, aldizkakotasun batekin, gaixotasun emergenteen errudun diren patogenoen presentzia neurtu beharko litzateke. Gainera, ingurune urtarretan plagizida zein elementu kutsakorren neurketa, prozedura estandarizatu baten bidez laginen bilketa eta bidalketa antolatuz. Azkenik, datu horiek laborategi espezializatuetara bidali beharko lirateke.
13. Espezie desberdinen biologia eta demografiaren inguruko oinarrizko alderdien inguruko informazio gehiago lortzeko beharra azpimarratzen da, hala nola ekologia espaziala, habitaten arteko konektagarritasuna, desplazamendu gaitasuna, populazioen tamaina minimo efektiboa, etab. Horretarako harrapaketa eta markaketa ikerketa batean barneratua egon beharko litzateke, edo diseinu esperimentalen bitartez dinamika demografiko lokalen edota portaera mailakoak ikertu.
14. Mehatxu nabarmenen artean, gero eta ohikoagoak diren gaixotasunen garrantzia nabarmendu da. Gaixotasun horiek berriak ez diren arren, azken hamarkadan anfibioen bigarren mehatxurik handiena bilakatu dira, habitat galeraren ondoren.
15. Euskal Autonomia Erkidegoan gaixotasun emergenteak eragiten dituzten patogenoen presentziari buruz egindako azterlan bakarrak egiaztatu zuen zenbait naturgunetan bazirela, baina orain arte ez da hauteman haiei egoitz dakizkiekeen anfibioen hilkortasun masiborik. Interesgarria litzateke horien hedadura eta anfibioen populazioetan izan dezaketen eragina aztertzea, eta azterketa gehien kaltetutako hiru espezieetan zentratzea: salamandra arrunta (*Salamandra salamandra*), txantxikua (*Alytes obstetricans*) eta apo arrunta (*Bufo spinosus*).
16. Katalunian *Batrachochytridium salamandrivorans*-en lehen kasua hauteman da. Iberiar Penintsulako sarrera bide nagusiak Europatik Pirineotako bi ertzetan kokatzen direnez, Euskadin prebentzio neurriak bultzatu beharko lirateke sarrera oztopatzeko. Bi alderdietan bereziki arreta jarriz: anfibio exotikoen salmenten kontrola eta ingurunean onddo patogenoaren propagazioa eragozteko desinfekzio protokoloa. Desinfekzio protokolo horren barruan, gaixotasun emergenteen problematika adierazten duen dibulgazio kanpaina martxan jarri nahi da. Kasu guztietan, anfibio exotikoen komertzializazio bideen kontrol zehatza gauzatu beharko litzateke, bai salmenta zuzeneko dendetan, bai internet bidez gauzatutakoan.
17. Kontserbazioaren zentzutik, gizartea bi alorretan hezitzen saiatu beharko ginateke. Alde batetik, anfibioen manipulazioa ekidin beharko litzateke eta, bestetik, translokazioak eragotzi errute, zapaburu, gazte zein helduen kasuan.
18. Anfibioak ornodun talderik mehatxatuena izateaz gain, hagitz ezezagunak dira. Hortakotz, anfibioen eta euren gainbeheraren inguruko dibulgazio kanpainak bultzatu beharko lirateke, egun gizarte mailan inpaktu handiko bi gairekin lotuz: bioaniztasunaren galera eta klima aldaketa.
19. Hezkuntza zentroek eta komunikabideek anfibioen gainbeheraren transmisioan berebiziko garrantzia izan dezakete, eta momentua zinez interesgarria suerta liteke, izan ere gizarteak ingurumen krisi eta aldaketa globalaren inguruko sentsibilizazioa jasotzen ari baita.
20. Hedapen zabaleko zuhaitz-landaketa monoespezifikoak, bereziki eukalipto landaketak, inguruko bioaniztasunaren galeran frogatutako eragina du, bai eta inguruko habitatetan ere. Ingurune naturalaren kudeatzaile eta erakunde publikoei eskatzen diegu zuhaitz landaketa monoespezifikoek estalitako azaleraren murrizketa. Europako Agenda 2030 (Garapen Jasangarrietako 15. Helburua: bizitza ekosistema lurtarrean) lerroekin bateragarria den legedia aplikatu beharko litzake, landaketa monoespezifiko exotikoei mozketa-tasa batzuk inposatuz eta bertako basoen errekuperazioa sustatuz, edo gutxienez, bertako espezieen landaketa.

CONCLUSIONES

El 16 y 17 de octubre de 2020 se celebró en la sede de Zorroaga de Donostia-San Sebastián de la Sociedad de Ciencias Aranzadi la III edición de las ***Jornadas de conservación de anfibios: seguimiento de poblaciones amenazadas.*** En ellas participaron herpetólogos de distintos centros de investigación y sociedades provenientes de diferentes comunidades del estado, así como miembros de Aranzadi. El programa incluía 11 conferencias y dos mesas redondas, habiéndose tratado el seguimiento de poblaciones durante el primer día, y las amenazas sobre los anfibios durante el segundo. En general, todos los participantes pusieron en evidencia la necesidad de integrar estudios de seguimiento de las poblaciones de anfibios a largo plazo, que consideren los principales factores de amenaza de cara a poder evaluar el estado de conservación de una especie o de sus poblaciones. A continuación, se detallan las conclusiones principales desprendidas de las Jornadas, para su difusión:

1. En un plan de seguimiento de anfibios se deben incluir distintas zonas atendiendo a factores que pueden afectar a la evolución de las poblaciones. Por ejemplo, se deben incluir datos procedentes de los distintos pisos climáticos que ocupa cada especie, ya que, según éstos, el efecto del cambio climático o de otros factores podría variar. Del mismo modo, se deben incluir zonas con un grado de protección (ZECs, Red Natura) y zonas no protegidas, que diferirán, por ejemplo, en la incidencia de la antropización del hábitat, contaminación o uso de plaguicidas.
2. Dada la situación de amenaza a nivel mundial en la que se encuentran los anfibios como grupo, sería conveniente realizar no sólo seguimientos de las especies incluidas en catálogos autonómicos, estatales o comunitarios, sino también de las especies comunes. Las especies escasas o raras, por definición, presentan números muy bajos y su seguimiento está mucho más sujeto a fenómenos estocásticos, aportando datos muy fragmentarios, mientras que las especies comunes pueden evidenciar procesos de disminución de población no apreciables a medio plazo en poblaciones escasas.
3. Para obtener información de la tendencia poblacional de cada especie, los datos usados pueden variar dependiendo de si se trata de especies amenazadas/escasas o comunes. En el caso de las primeras, se trabajará con datos de abundancia relativa, extrayendo la tendencia de la población de la comparación anual de series temporales. En el caso de las especies comunes o más extendidas territorialmente, de no ser posible lo anterior, también pueden extraerse conclusiones sobre la situación de sus poblaciones a partir de la comparación del número de cuadrículas ocupadas en años anteriores y en la actualidad, cuando existieran datos pretéritos que lo permitan. Asimismo, el uso de ADN ambiental puede ser útil para establecer la distribución actual en el caso de especies difíciles de localizar. En todo caso, los seguimientos con abundancias relativas serán la opción principal cuando sea posible.
4. La toma de datos de abundancia relativa debe realizarse anualmente, para poder establecer series temporales y tendencias poblacionales que representen adecuadamente las fluctuaciones temporales propias de las dinámicas demográficas de los anfibios. A mayor número de años, más fiables serán las conclusiones que se extraigan, siendo óptimo un periodo de diez años, y mínimo mínimo de cinco años para poder extraer conclusiones.
5. Es recomendable realizar, al menos, dos o tres muestreos anuales en cada punto de toma de datos, separados entre sí por un plazo de al menos una semana, durante los periodos de máxima actividad de cada especie (que pueden variar entre especies).
6. Se recalca la importancia de estandarizar la metodología y el esfuerzo de muestreo para que los datos recogidos sean comparables, tanto entre puntos de muestreo o zonas como a lo largo del tiempo.
7. Al diseñar la recogida de datos, en cuanto a la razón entre esfuerzo en cada punto de muestro y número de puntos de muestreo, se recomienda priorizar lo primero, pero incluyendo, cuando sea posible, diferentes puntos de muestreo cercanos, debido al funcionamiento metapoblacional que presentan numerosos anfibios. El número de puntos de muestro independientes por especie debería ser de, al menos, entre 10 y 15. En todo caso, se recomienda una doble estrategia: para especies amenazadas o más localizadas, priorizar la calidad de los datos y una buena selección de los puntos de muestreo, frente a su número; para especies más comunes o ubicuas, priorizar el abarcar mayor superficie de territorio, con un número mayor de puntos de muestreo.
8. La incorporación de datos procedentes de voluntariado o ciencia ciudadana, atendiendo a lo expuesto en el anterior punto (fiabilidad de los datos, comparación territorial y espacial de éstos, etc.), es recomendable para el caso de especies comunes para las que, por su ubicuidad, merece la pena abarcar mayor superficie territorial con un mayor número de puntos de muestreo.
9. Se recomienda, cuando sea posible, recoger datos de abundancia relativa de adultos, mejor que de larvas. En los anfibios, la fracción de adultos de la población representa mejor el estado de ésta que la fase larvaria, ya que las larvas responden de manera menos homogénea a circunstancias ambientales que pueden malograr su desarrollo e incorporación a la población efectiva. En todo caso, los conteos de puestas, cuando es posible realizarlos, también aportan una estimación de la abundancia de individuos reproductores en la población.

10. Los muestreos nocturnos son, en general, más efectivos para la detección de adultos de anfibios, y los mangueos exhaustivos diurnos en puntos de agua son aptos para el recuento de larvas o urodelos adultos en fase acuática. Los muestreos deben realizarse a lo largo de la primavera, atendiendo a la fenología de cada especie y población en cada zona concreta, evitando posponerlos al otoño incluso en aquellas especies que pueden presentar un segundo pico de actividad en esta estación, ya que los recuentos siempre serán menores.
11. Es recomendable completar la información sobre la abundancia relativa con parámetros indicativos del estrés al que esté sometida la población. En este sentido, se recomienda considerar la toma de datos sobre la respuesta inmune poblacional. Variaciones relativas en cuanto al estado inmunológico de una muestra de la población pueden alertar de una afectación críptica antes de que ésta se traduzca en una menor abundancia constatable. Esta información es especialmente importante en el caso de especies amenazadas o poco abundantes.
12. Del mismo modo conviene examinar, con cierta periodicidad, la presencia de patógenos responsables de enfermedades emergentes o la presencia de plaguicidas y contaminantes en los medios acuáticos, para lo cual pueden diseñarse procedimientos estandarizados de toma de muestras y envío a los laboratorios especializados en su análisis.
13. Se señala la necesidad de obtener más información sobre aspectos básicos de la biología y demografía de las distintas especies, como su ecología espacial, conectividad entre hábitats, capacidad de desplazamiento, tamaños poblacionales mínimos efectivos, etc., para lo cual son necesarios estudios integrados basados en captura-marcaje y recaptura, o diseños experimentales que aporten información acerca de las dinámicas demográficas locales y el comportamiento.
14. Entre las amenazas más destacadas se ha resaltado la importancia creciente de las enfermedades emergentes que, si bien no son nuevas, en la última década se han situado como la segunda mayor amenaza para los anfibios, tras la pérdida de hábitat.
15. El único estudio realizado en el País Vasco sobre la presencia en el medio de patógenos causantes de enfermedades emergentes comprobó su presencia en algunos espacios naturales, sin que hasta la fecha se hayan detectado mortalidades masivas de anfibios atribuibles a los mismos. Sería interesante evaluar su extensión y posible incidencia sobre las poblaciones de anfibios, centrando el estudio en las tres especies comúnmente más afectadas: salamandra común (*Salamandra salamandra*), sapo partero común (*Alytes obstetricans*) y sapo común ibérico (*Bufo spinosus*).
16. Recientemente se ha detectado el primer caso de *Batrachochytrium salamandrivorans* en Cataluña. Dado que las principales vías de entrada a la Península Ibérica desde Europa se sitúan en ambos extremos de los Pirineos, en Euskadi se deberían impulsar medidas de prevención para impedir en lo posible su entrada, incidiendo en dos aspectos: el control en la venta de especies exóticas de anfibios y la puesta en marcha de un protocolo de desinfección efectivo para evitar la propagación del hongo en el medio, que debería acompañarse con una campaña de divulgación sobre la problemática de las enfermedades emergentes. En cualquier caso, se debería realizar un control mucho más exhaustivo de las vías de comercialización de los anfibios exóticos, tanto de venta directa en tienda como de la realizada vía internet.
17. Hay que intentar educar a la ciudadanía en dos aspectos conductuales: evitar en la medida de lo posible la manipulación de los anfibios, e impedir su captura y traslocación en cualquiera de sus formas; es decir, de puestas, renacuajos, juveniles o adultos.
18. Los anfibios son el grupo vertebrado más amenazado del planeta, pero también el menos conocido. Por tanto, es necesario impulsar campañas de divulgación sobre los anfibios y su declive, ligándolas con dos de los temas de más impacto social en la actualidad: la pérdida de biodiversidad y el cambio climático.
19. Las escuelas y los medios de comunicación tienen un papel clave en la transmisión de la problemática de los anfibios, y el momento puede resultar muy oportuno por la sensibilidad que está adquiriendo la sociedad ante la crisis medioambiental y el cambio global.
20. Las plantaciones forestales de monocultivo en grandes extensiones, en especial las de eucalipto, suponen un enorme impacto probado en la biodiversidad y en los hábitats circundantes. Proponemos a los gestores del medio natural y administraciones públicas la reducción de la superficie ocupada por este tipo de plantaciones forestales. Se debería aplicar una legislación más acorde a las líneas europeas de la Agenda 2030 (Objetivo de Desarrollo Sostenible número 15: vida de ecosistemas terrestres), imponiendo tasas a las plantaciones de monocultivo alóctonas e incentivando la recuperación de bosques autóctonos o, al menos, la plantación de especies nativas.

Liburu honetan, Aranzadi Zientzia Elkarteko egoitza nagusian (Donostian) gauzatu zen ***Anfibioen Kontserbaziorako III. Jardunaldiak: populazio mehatxatuen jarraipena*** bilgunean aurkeztutako lanak biltzen dira. Lan guztiek azken urte, edota hamarkadetan, anfibio espezie zein populazioen ikerketa eta kontserbazioan gauzatutako emaitzak agerian uzten dituzte. Biltzarrak, gainera, testuinguru egoki bat eskaini zuen klima aldaketaren aurrean anfibio zein euren habitaten kontserbazioaren erronkari aurre egin nahian, egitasmo berriak eta elkarlanerako zubiak sortzeko.

Este libro recoge los trabajos presentados en la ***III edición de las Jornadas para la conservación de anfibios: seguimiento de poblaciones amenazadas,*** celebrada en la Sede de la Sociedad de Ciencias Aranzadi (San Sebastián). Todos estos trabajos reflejan los resultados obtenidos por investigadores a lo largo de los últimos años, última década, sobre el estudio de especies y poblaciones de anfibios. Además, este coloquio ofreció un contexto adecuado para la creación de nuevos proyectos y puentes de colaboración de cara a afrontar el reto de la conservación de anfibios y sus hábitats preferentes, en la lucha ante el cambio climático.

This book comprises research studies presented at ***the 3rd Symposium on the Conservation of Amphibians: monitoring threatened populations,*** that took place at Aranzadi Society of Science (Donostia-San Sebastián). These works showcase the results obtained by numerous researchers over recent years and past decades in the study of amphibian species and populations. Within this context, this Symposium offers a suitable forum for creating new projects and fostering collaborative efforts to address the challenges confronting amphibians and the conservation of their preferred habitats in the ongoing fight against climate change.

aranzadi

ZIENTZIA ELKARTEA · SOCIEDAD DE CIENCIAS
SCIENCE SOCIETY · SOCIÉTÉ DE SCIENCES

Gipuzkoako Foru Aldundia
Diputación Foral de Gipuzkoa

Asociación Herpetológica Española

MIKROKLIMA

kutxa FUNDAZIOA

AGENDA 2030

Euskadi, auzolana, bien común
EUSKO JAURLARITZA GOBIERNO VASCO