

VARIACIÓN GENÉTICA ADAPTATIVA EN GRADIENTES ALTITUDINALES: EFECTOS SOBRE LA VIABILIDAD DE POBLACIONES SUBDIVIDIDAS EN ESCENARIOS DE CAMBIO CLIMÁTICO

DAVID ÁLVAREZ^{1,2}, MAGDALENA CHODA^{1,2}, LETICIA VIESCA^{1,2},
JOSÉ MANUEL CANO^{2,3}, MARIA JOSÉ BAÑUELOS², CHIKAKO MATSUBA⁴,
SUSANA GARCÍA^{1,2} Y ALFREDO G. NICIEZA^{1,2}

RESUMEN

La biodiversidad es el reflejo de la diversidad genética, que en último término está afectada por un mayor número de factores asociados a la actividad humana que cualquier otro nivel de biodiversidad. La conservación de dicha biodiversidad es por tanto, uno de los objetivos prioritarios en la gestión del medio natural. Los anfibios son el grupo de vertebrados más amenazado actualmente y debido a las características de su ciclo de vida también son uno de los grupos más adecuados para el estudio de los efectos del cambio global sobre la biodiversidad. Durante el desarrollo del presente proyecto hemos identificado los factores climáticos que afectan a la fenología reproductiva de la Rana bermeja (*Rana temporaria*), habiendo caracterizado el sistema de reproducción de esta especie y los factores limitantes que condicionan las dinámicas de extinción-recolonización de sus poblaciones. Mediante los datos proporcionados por más de 30 termómetros de registro continuo, el marcaje individual con microchips y los análisis genéticos realizados en 32 núcleos de reproducción distribuidos a lo largo de todo el gradiente altitudinal (32 – 2200 msnm), hemos confirmado la existencia de dos estrategias reproductoras en esta especie y una fenología condicionada por la altitud. Las poblaciones situadas por encima de los 1500 msnm tienen un grave riesgo de extinción local y una probabilidad de recolonización reducida debido al desacoplamiento entre reproducción y clima, en el caso de que tal como apuntan nuestros resultados, la fenología reproductiva este fijada genéticamente. Asimismo, hemos confirmado la existencia de diferencias significativas, tanto en los mecanismos de selección sexual, como en la tolerancia térmica durante el desarrollo embrionario, entre poblaciones situadas en los extremos del gradiente altitudinal.

Palabras clave: conservación, anfibios, variación genética adaptativa, cambio climático, fenología reproductora, gradientes altitudinales.

¹ Departamento de Biología de Organismos y Sistemas. Universidad de Oviedo. 33071 Oviedo, Asturias Tel: 985 104 772. Fax: 985 104 777. E-mail: dalvarez@gmail.com; magdulka.ch@gmail.com; viescaleticia@uniovi.es; sugarciadiaz@msn.com; agnic@uniovi.es

² Unidad Mixta de Investigación en Biodiversidad (UO-CSIC-PA). Campus de Mieres. 33600 Mieres, Asturias. E-mail: canojose@uniovi.es; mariajo.banuelos@gmail.com

³ Department of Biology & Environmental Sciences. University of Helsinki. FIN-00014 Helsinki. Finland.

⁴ Department of Zoology. University of Florida, Gainesville, Florida 32611-8525. US. Tel : 001 352 392 1175. Fax: 001 352 392 3704 E-mail: matsuba@ufl.edu

SUMMARY

Biodiversity is a reflection of genetic diversity, which is ultimately affected by a greater number of factors associated with human activity than any other level of biodiversity. The conservation of this biodiversity is therefore a main objective in the management of the natural environment. Global change is one of the major threats for biodiversity nowadays, and amphibians are the group of vertebrates more affected for those changes, and thus a perfect model to study their effects on biodiversity. In the present project we studied the population structure and genetics of the Common frog (*Rana temporaria*), having characterized the breeding system of this species and the limiting factors that determine the dynamics of extinction-recolonization of their populations. Using the information provided by more than 30 continuous register thermometers, individual marking of thousands of frogs and genetic analyses of more than 30 reproductive places, we have characterized the breeding system of *R. temporaria* in the whole altitude range in the Picos de Europa National Park (32 – 2200 msnm). Populations located above 1500 m have a high risk of local extinction and reduced opportunities of recolonization due to the decoupling between reproduction and climate, in the case, as our results suggest reproductive phenology is genetically determined. We have also proved that there are significant differences both in the mechanisms of sexual selection, as in the larval thermal tolerance among populations at the limits of the altitudinal gradient.

Key words: conservation, amphibians, adaptative genetic variation, global climate change, breeding cycles, altitudinal gradients.

INTRODUCCIÓN

La conservación de la biodiversidad es uno de los objetivos prioritarios de la gestión del medio natural. La diversidad genética se encuentra afectada por un mayor número de factores asociados a la actividad humana que cualquier otro nivel de biodiversidad. La creciente influencia humana sobre el clima y sobre la fragmentación del hábitat, hace que cada vez sea más necesario caracterizar y monitorizar con la mayor precisión posible aquellos recursos genéticos que presenten un elevado grado de estructuración espacial. Durante las últimas décadas se ha producido un cambio en las estrategias de conservación, aumentando el interés hacia la conservación de poblaciones locales (FRANKHAM 1999), lo que resulta especialmente importante en aquellas especies que presentan un elevado grado de estructuración espacial, ya que la desaparición de estas puede significar una pérdida irreparable de biodiversidad. En el caso de este tipo de especies, una estrategia de conservación basada exclusivamente en criterios numéricos, que proteja exclusivamente aquellos enclaves que aglutinen un

porcentaje significativo de la población de la especie objeto de protección, no es el más adecuado. En este caso, el diseño de una estrategia de conservación debería pasar necesariamente por la identificación de unidades evolutivas significativas (MORITZ 1994), que son entidades poblacionales que presentan una historia evolutiva única y una especificidad genética, contribuyendo significativamente a la diversidad genética global de la especie (PALSBJØL *et al.* 2007; SCHWARZ *et al.* 2007).

El carácter local de muchas poblaciones de anfibios es el responsable de su elevado grado de estructuración y a su vez de su elevada sensibilidad frente a una gran variedad de factores de regresión (GREEN 2003). Durante las últimas décadas se ha podido confirmar un declive generalizado de muchas especies y poblaciones de anfibios que en muchos casos ha incluido procesos de fragmentación, la extinción de poblaciones locales (BEWBEE & GRIFFITHS 2005), e incluso de especies en tiempos recientes (COLOMA *et al.* 2010). Actualmente se considera que los anfibios son el grupo de vertebrados más amenazado, ya

que de las aproximadamente 6000 especies reconocidas, un 43% de ellas presentan algún tipo de declive poblacional y un 33% se encuentran globalmente amenazadas (STUART 2004). Aunque es evidente que podemos hablar de una tendencia global de regresión, la variedad de modos de reproducción, capacidades de dispersión y el grado de conectividad entre las distintas poblaciones hace necesaria la exploración independiente de distintos sistemas modelo (CUSHMAN 2006; MARSH 2001). En cualquier caso, cada vez hay más evidencias de que la estructuración espacial (p.e. aislamiento, conectividad) y las características de las poblaciones (p.e. diversidad genética, tamaño efectivo de población) pueden ser claves para explicar la influencia de los valores externos en la viabilidad poblacional, por lo que el conocimiento de los parámetros poblacionales resulta esencial para valorar la vulnerabilidad de las poblaciones.

Una de las posibles causas del declive de los anfibios a nivel global es el cambio climático, que podría ocasionar un desajuste temporal entre los procesos de reproducción, crecimiento o hibernación y las condiciones adecuadas para esos procesos (CAREY *et al.* 2003). Por otra parte, el aumento de la estocasticidad ambiental, con la aparición de eventos extremos desajustados estacionalmente, como prolongadas sequías o nevadas tardías, puede ocasionar fenómenos de mortalidad masiva que pueden provocar episodios de extinción local. La destrucción y deterioro del hábitat contribuyen en muchos casos a acentuar ese declive, de forma que la persistencia de las poblaciones de anfibios puede vincularse al tamaño del hábitat y a su configuración espacial (CUSHMAN 2006). Resulta por ello necesario caracterizar y cartografiar ese hábitat antes de emprender cualquier estrategia de conservación, de forma que se pueda conocer con precisión aquellas variables que condicionen la presencia de la especie para poder actuar directamente sobre ellas.

Los efectos del cambio climático y del calentamiento global en particular, se hacen más patentes en los hábitats de montaña (KHOLER *et al.* 2010), donde las condiciones son más severas y donde muchas especies, tanto animales como vegetales, se encuentran en su límite de distribu-

ción altitudinal. En estas zonas, un ligero incremento de la temperatura media anual puede suponer una reducción drástica del hábitat disponible y además puede tener efectos muy negativos sobre el ciclo de vida de muchas especies. Por otra parte, en las poblaciones de alta montaña la reproducción y el desarrollo de los huevos y juveniles presenta un grado de sincronización muy elevado, por lo que un desajuste puede ocasionar el fracaso de la reproducción. En el caso de que se encadenaran varios años de fracaso reproductor y bajo reclutamiento, las probabilidades de extinción local de estas poblaciones serían muy elevadas.

En el caso particular del Parque Nacional de los Picos de Europa, las zonas de alta montaña, debido a su naturaleza cárstica, tienen pocos lugares favorables que permitan la acumulación de agua (DURAN *et al.* 2006) necesaria para la reproducción de los anfibios, por lo que estos hábitats acuáticos no son muy numerosos y los que aparecen se encuentran muy dispersos dentro de una matriz de hábitat inhóspito. La existencia de esa matriz, así como la presencia de barreras geográficas como cordales montañosos o grandes desniveles, actúan como barreras a la dispersión, por lo que tienen un papel determinante en la estructura espacial de las poblaciones. En este contexto, conocer cómo la estructura del paisaje puede condicionar la estructura genética y demográfica de una población puede ayudar a predecir el potencial de evolución en diferentes situaciones relativas a la fragmentación o perturbación del hábitat, así como a la pérdida de conectividad entre poblaciones. Otra de las características de las poblaciones de anfibios del PN de Picos de Europa, es la existencia de distintas historias de vida dentro de las mismas especies a lo largo del gradiente altitudinal, ya que aparecen poblaciones con sistemas de reproducción diferenciados, lo que podría condicionar su capacidad de supervivencia a largo plazo. En aquellas poblaciones en las que hay un sistema de apareamiento explosivo, las oportunidades de elección de pareja por parte de las hembras están limitadas temporalmente, y la llegada sincronizada de los dos sexos al sitio de reproducción hace que haya más machos que puedan participar en la reproducción. Por el contrario, en sistemas de reproducción pro-

longada, las hembras tienen más posibilidades de elección de pareja, pero al mismo tiempo, los machos pueden aparearse varias veces a lo largo de la temporada de cría (WELLS 2007). Estos distintos sistemas de apareamiento condicionarán por una parte los mecanismos de selección de pareja de las hembras y por otra parte, la presencia de estrategias de apareamiento diferentes podría hacer que los individuos tuvieran diferentes óptimos en los rasgos espermáticos que favorecen la fertilización (HETTYEY & ROBERTS 2006). A nivel poblacional, la presencia de uno u otro sistema de apareamiento puede tener también importantes efectos genéticos, ya que aquellas poblaciones en las que participe un mayor número de individuos en la reproducción, tendrán mayor variabilidad genética que aquellas en las que el número de machos que se reproduzcan sea más reducido (JONES *et al.* 2004).

El objetivo principal del presente proyecto fue la identificación de los factores ambientales y genéticos relacionados con la variación en la fenología reproductiva de *Rana temporaria* sobre el gradiente de altitud. Una vez identificados sería posible predecir las posibles dinámicas de extinción de poblaciones de anfibios bajo diferentes escenarios de cambio climático. Para cumplir este objetivo planteamos varias tareas, que incluyeron: (a) la caracterización de los sistemas de reproducción y su relación con las variables ambientales, (b) la exploración de una posible componente genética que fijara la fenología reproductiva de la especie, (c) la caracterización del hábitat a escala de paisaje y a escala local, (d) el estudio de las diferencias entre sistemas de reproducción contrastados en cuanto a tasas de fecundidad y la posible relación con la competencia por las hembras y (e) la evaluación de la resistencia térmica de los huevos y larvas durante el desarrollo embrionario en ambientes con condiciones de desarrollo diferenciadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Especie de estudio

Para el desarrollo de las tareas planteadas en el presente proyecto elegimos la Rana bermeja (*Rana temporaria*) como organismo modelo, ya

que reunía varias características que la hacían especialmente adecuada para este estudio. La Rana bermeja es una especie fuertemente asociada a charcas y humedales de tamaño variable, a menudo efímeras o temporales. En zonas de montaña estos hábitats se encuentran desigualmente repartidos, lo que resulta muy útil para los estudios de los modelos de dispersión. Las poblaciones de *Rana temporaria* de la Cordillera Cantábrica se distribuyen a lo largo de un gradiente altitudinal desde el nivel del mar hasta una altitud superior a los 2200 metros, en una distancia geográfica de unas pocas decenas de kilómetros, casi igual al que se tiene en el PNPE. Otra característica interesante de esta especie es la existencia de una gran variabilidad entre poblaciones en los sistemas de reproducción y en la fenología reproductora dependiendo de la altitud, lo que ofrece un sistema único para investigar los factores que desencadenan el inicio de la reproducción y cómo el cambio climático puede afectar a la viabilidad de las poblaciones según su historia de vida. Nuestro grupo de investigación ha trabajado exhaustivamente con esta especie desde hace varios años, por lo que disponemos de abundante información sobre su distribución, lo que nos ha permitido optimizar el trabajo de muestreo en una zona muy complicada debido a su orografía y conseguir una gran cantidad de datos fenológicos y muestras genéticas que en el caso de trabajar con una especie nueva hubieran sido muy difíciles de obtener.

Desde el punto de vista de las herramientas moleculares, al comienzo del proyecto se disponía de 22 marcadores microsatélites publicados, algunos de los cuales ya habían sido optimizados para las poblaciones cantábricas por nuestro grupo de trabajo. Al final del proyecto ya contamos con más de 150 microsatélites secuenciados por uno de los miembros del grupo.

Por último, es de destacar que la Rana bermeja ha sido intensamente estudiada por otros grupos de trabajo a lo largo de todo su rango de distribución, lo que permitirá contrastar nuestros resultados con los de otros grupos en aspectos relacionados con la variación latitudinal, ya que nuestras poblaciones se encuentran en el límite meridional de distribución de la especie.

Instalación de sensores de temperatura

Con el fin de determinar de forma precisa los periodos de innivación, congelación, deshielo y desecación de las charcas, se instalaron sensores de temperatura de registro continuo Tibdit (Onset Corporation) en varias zonas potenciales de reproducción de *Rana temporaria* dentro del PNPE y en algunas zonas situadas fuera de sus límites que se usaremos como control. Los termómetros se programaron para tomar una medida cada 30 minutos. Durante los dos primeros años de proyecto se instalaron en 33 localidades distintas (Tabla 1), 22 dentro de los límites del PN y 11 en zonas próximas.

Estimación de la componente genética en la fenología de *Rana temporaria*

Se exploró la posibilidad de que alguno de los más de 100 marcadores genéticos putativamente neutrales (i.e. microsátélites) disponibles para *Rana temporaria* estuviera ligado a fenómenos de selección natural. Marcadores con esas características podrían informar sobre la diversidad genética adaptativa entre las poblaciones de *R. temporaria* seleccionadas en el estudio. Para ello se usó la técnica de 'escaneado' o 'mapa de barrido genético' (i.e. gene-scan, hitchhiking mapping). El principio en el que se basa este análisis es determinar patrones de variación alélica que no se corresponden con lo esperado en condiciones neutrales (aleatorias). Se atiende a dos criterios fundamentales: (1) reducción de heterocigosidad en loci específicos (i.e. alta homocigosidad esperada en aquellas poblaciones en las que los loci están bajo fuerte selección), (2) loci para los cuales el grado de diferenciación entre poblaciones es superior al del promedio. Los loci que presentan las mencionadas propiedades se consideran que están ligados a genes afectados por la selección natural (BEAUMONT & BALDING 2004). En otras palabras, la variación en esos marcadores representaría variación genética funcional relacionada con procesos de adaptación a condiciones locales.

Para esta tarea se seleccionaron un par de poblaciones (Áliva 1420 msnm y Viango 467 msnm) que presentan un grado de divergencia genética

neutral moderado y una diferenciación fenotípica elevada (e.g. en tasas de desarrollo y metabólicas; CHODA *et al.* en prep). Individuos de esas poblaciones se genotiparon para un total de 120 microsátélites (MATSUBA & MERILÄ 2009) y los que amplificaron correctamente se analizaron para la búsqueda de marcadores mostrando signos de selección natural usando el programa Fdist (BEAUMONT & BALDING 2004).

Caracterización del sistema de reproducción de *Rana temporaria*

Durante el periodo 2009-2011 se hizo un seguimiento exhaustivo de varias poblaciones de *R. temporaria* a lo largo de todo el gradiente altitudinal (0-2000 msnm) con el fin de estimar la fecha de inicio de reproducción y la duración del periodo de apareamientos. En zonas situadas a baja altitud (0-1000 m) el seguimiento se realizó desde el mes de septiembre, intentando hacer al menos una visita semanal, anotándose todos los indicios de presencia de adultos. Las poblaciones situadas por encima de los 1000 m de altitud se empezaron a visitar desde finales de marzo, anotándose también las condiciones en las que se encontraban las charcas (presencia de hielo, nieve, cantidad de agua, etc.). Una vez que la reproducción hubo comenzado, el seguimiento se hizo más intensivo, anotándose en cada visita el número de machos y hembras, el número de amplexus y el número de masas de huevos, precisando lo más posible el estado de desarrollo de las mismas. De esta forma se pudo estimar la duración del periodo reproductor y caracterizar el sistema de apareamiento de cada población. Los datos de fenología reproductiva se combinaron con los registros obtenidos con los termómetros de registro continuo para establecer una relación entre inicio y duración del periodo reproductor y temperatura.

En la población de Río Color se continuó con el trabajo de marcaje intensivo mediante microchips (AVID©) para estudiar el tiempo de permanencia de los machos en las charcas de reproducción y el posible remplazamiento de los mismos por otros machos nuevos. En cada visita se contó el número de puestas recientes y todos los individuos encontrados fueron capturados y se escanearon con un lector Mini Tracker I

Nº	Núcleo	Rt	PNPE	Zona	Altitud (msnm)	UTM	W	N
1	Aliva	1	sí	Central/Andara	1418	30T	356644	4782272
2	Amieva	1	no	Amieva	738	30T	332640	4790100
3	Amuesa	0	sí	Central	1413	30T	349195	4788692
4	Andara	1	sí	Andara	1773	30T	360386	4785754
5	Candioches	1	no	Ubiña	1727	30T	262707	4764674
6	Color	1	no	Piloña	330	30T	315402	4796290
7	Comeya	1	sí	Cornión	843	30T	338503	4794323
8	Fana	1	sí	Cornión	943	30T	336596	4793912
9	Fte. Espines	1	sí	Cornión	1397	30T	340066	4790845
10	Hibeo	1	no	Onís	870	30T	342459	4803393
11	Hoyos de Vargas	1	no	Fuentes Carrionas	2148	30T	356303	4764056
12	Inhiestu	1	no	Llanes	181	30T	344589	4809423
13	Joulagua	1	sí	Cornión	1681	30T	341439	4789799
14	Joyos-Leñe	1	sí	Cornión	1255	30T	342646	4792032
15	Liordes	1	sí	Central	1838	30T	350060	4779462
16	Llagu Cimeru	0	sí	Central	2048	30T	349501	4781004
17	Llaguseco	1	sí	Cornión	1810	30T	338339	4787680
18	Llamigu	1	no	Llanes	300	30T	341670	4808997
19	Moñetas	0	sí	Central	1742	30T	354698	4783874
20	Orandi	1	sí	Cornión	537	30T	333122	4795396
21	Pandébano	1	sí	Central	1243	30T	354999	4788433
22	Pandecarmen	1	sí	Cornión	1100	30T	336763	4792191
23	Panderrueda	1	sí	Valdeón	1460	30T	339002	4776367
24	Pie de Palo	1	sí	Cornión	1146	30T	338528	4790008
25	Salambre	1	sí	Sajambre	1320	30T	338129	4781431
26	Señales	1	no	Caso-Aller	1638	30T	317143	4772272
27	Teon	1	sí	Cornión	980	30T	337448	4794281
28	Valdeovejas	1	no	Ubiña	1672	30T	263063	4764957
29	Vegabaño	1	sí	Sajambre	1430	30T	336875	4781713
30	Vegamaor	1	sí	Cornión	1248	30T	344998	4791271
31	Vegarredonda	1	sí	Cornión	1460	30T	338218	4788913
32	Fumarea	1	no	Siero-Gijón	566	30T	293261	4813448
33	Bobia	1	no	Oscos	460	29T	663724	4802896

Tabla 1. Lugares de colocación de los sensores de temperatura de registro continuo, altitud, coordenadas geográficas, zona y presencia (1) o ausencia (0) de indicios de reproducción de *R. temporaria* (Rt).

Table 1. Location of the thermometers, altitude, geographic coordinates, geographic area and presence (1) or absence (0) breeding *R. temporaria* (Rt).

(AVID©) para detectar los animales que tenían microchips. Los ejemplares marcados durante la presente estación se liberaron después de finalizar el muestreo y los ejemplares sin marca y los marcados en años anteriores se llevaron al laboratorio donde se pesaron y fotografiaron al día siguiente. Todos ejemplares nuevos fueron marcados con un microchip, pesados y fotografiados y ese mismo día se liberaron en el lugar de captura. En el año 2009 se hizo un seguimiento intensivo de esta población, realizándose un total de 17 visitas desde el 7 de octubre, cuando se detectaron los primeros machos, hasta el 20 de enero, cuando ya no se detectó ninguno.

Caracterización y cartografía del hábitat de *Rana temporaria* en los Picos de Europa

El área de estudio para esta tarea comprende 2916 km², que se enmarcan en el entorno del PNPE, llegando hasta los 2648 m de altitud, y ex-

tendiéndose por el norte hasta el nivel del mar. En este entorno, hemos localizado un total de 70 núcleos reproductores de *Rana temporaria* (Figura 1), situados desde lugares muy próximos a la costa (42 msnm) hasta zonas situadas en alta montaña (2140 msnm).

Para caracterizar el hábitat potencial de *R. temporaria*, hemos empleado un conjunto de variables que a priori podrían ser relevantes para la especie, basándonos en datos de otras regiones existentes en la bibliografía así como en la experiencia previa del grupo. Las variables empleadas en nuestro análisis incluían información sobre topografía, cuencas hidrográficas, distancia a cursos de agua, insolación y estructuras humanas (ver Tabla 2). Asimismo se utilizó la cartografía digital temática desarrollada por las CCAA de Asturias y Castilla y León, para añadir información sobre la estructura de la vegetación. Debido a que las cartografías originales de cobertura vegetal diferían entre las dos CCAA, re-

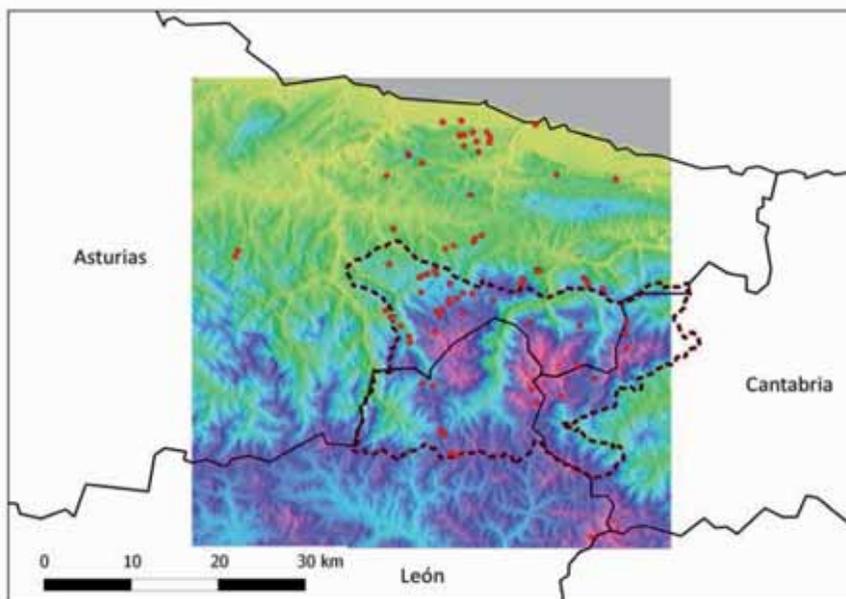


Figura 1. Localización del área de estudio usada para la caracterización del hábitat de *R. temporaria* (enmarcada en el modelo digital de elevación coloreado), y ubicación de los núcleos reproductores de la especie en la zona. La línea punteada delimita el territorio ocupado por el PNPE.

Figure 1. Location of the study area used in the characterization of *R. temporaria* habitat (framed in coloured digital elevation model), and location of the breeding places in this area. The dotted line demarcates the territory occupied by the Picos de Europa National Park.

VARIABLES	Valores medios (\pm SE) en cada rango de altitud (msnm)			
	0-600	>600-1200	> 1200	Todas
Topografía				
Orientación	3,14 \pm 0,41	3,88 \pm 0,50	5,00 \pm 0,58	4,03 \pm 0,31
Pendiente ($^{\circ}$)	11,85 \pm 1,65	9,37 \pm 1,26	9,03 \pm 1,09	10,19 \pm 0,78
Índice de rugosidad (entorno 3x3 celdas) (varianza en la pendiente)	17,49 \pm 4.67	9,02 \pm 1,93	14,83 \pm 3,15	13,67 \pm 1,95
Cuencas hidrográficas				
Drenaje acumulado local (n $^{\circ}$ celdas que vierten en la celda considerada)	17 \pm 5	6 \pm 1	101 \pm 79	42 \pm 27
Drenaje acumulado (entorno 3x3 celdas) (promedio del n $^{\circ}$ celdas que vierten en las celdas consideradas)	911 \pm 385	457 \pm 229	241 \pm 84	526 \pm 148
Distancia a cursos de agua (m)	136 \pm 52	364 \pm 58	269 \pm 66	260 \pm 35
Insolación (J.m-2.hora-1)				
Solsticio de verano (Rad Global)	5930 \pm 56	6300 \pm 70	6667 \pm 47	6310 \pm 49
Solsticio de verano (Rad Directa)	4494 \pm 44	4754 \pm 56	5012 \pm 43	4761 \pm 37
Solsticio de verano (Rad Difusa)	1436 \pm 20	1545 \pm 17	1654 \pm 10.15	1548 \pm 14
Equinoccio (Rad Global)	3167 \pm 86	3319 \pm 87	3471 \pm 66	3323 \pm 48
Equinoccio (Rad Directa)	2266 \pm 89	2335 \pm 80	2403 \pm 66	2337 \pm 45
Equinoccio (Rad Difusa)	900 \pm 13	982 \pm 11	1067 \pm 7	986 \pm 10
Solsticio de invierno (Rad Global)	600 \pm 47	663 \pm 42	642 \pm 34	636 \pm 23
Solsticio de invierno (Rad Directa)	331 \pm 47	354 \pm 40	353 \pm 3	324 \pm 23
Solsticio de invierno (Rad Difusa)	267 \pm 4.64	308 \pm 4	288 \pm 34	310 \pm 4
Actividad humana				
Distancia a vías asfaltadas (m)	696 \pm 155	1043 \pm 142	2555 \pm 253	1452 \pm 146
Distancia a muros (m)	406 \pm 86	218 \pm 49	1372 \pm 231	673.34 \pm 104
Distancia a edificaciones (m)	239 \pm 49	144 \pm 36	574 \pm 105	321 \pm 46

Tabla 2: Valores promedio (\pm SE) en los núcleos de reproducción de *R. temporaria* de las variables empleadas en la caracterización de su hábitat. En aquellas variables en las que se calcularon valores para entornos crecientes (moving windows) se muestra únicamente el valor correspondiente a la celda local (30x30m) y aquel que resultó de mayor relevancia en los análisis preliminares. (Número de núcleos de población utilizados: 0-600 msnm: 22; 600-1200 msnm: 25; > 1200 msnm: 23. Total: 70).

Table 2: Mean values (\pm SE) of the variables used in the characterization of the habitat of *R. temporaria* in the breeding sites used in the analyses. In those variables in which values were calculated for growing environments (moving windows) we shows only the value corresponding to the local cell (30x30m) and the most significant value obtained in preliminary analyses. (Number of breeding sites used: 0-600 m.a.s.l.: 22; 600-1200 m.a.s.l : 25,> 1200 m.a.s.l : 23. Total: 70).

alizamos una reclasificación y extracción de los tipos de hábitats relevantes para *R. temporaria*. A partir de un grid (rejilla) de resolución 30m que engloba toda el área de estudio, hemos extraído para cada celda la información de cada una de

las variables seleccionadas, tanto de forma local como considerando distintos entornos (moving windows), en general entre la celda local (900 m 2) y 0,1 km 2 , aunque para determinadas variables hemos considerado entornos mayores.

Una vez extraída la información y caracterizado el hábitat, hemos comprobado si alguna de esas variables era distintiva del hábitat de *R. temporaria*, y puede por tanto servir para predecir dónde se encuentra un hábitat potencial para la especie. Para ello, hemos empleado uno de los métodos disponibles para evaluar la distribución de las especies en función de variables ambientales, teniendo únicamente en cuenta datos de presencia, dado que disponíamos de pocos datos para realizar comparaciones entre zonas con presencia (n=70) y ausencia (n=8). Usamos la herramienta MaxEnt (PHILIPS & DUDIK 2008), que se basa en el principio de máxima entropía, según el cual se extrae la máxima información posible a partir de la información disponible, haciendo el menor número de asunciones de la información no disponible. MaxEnt emplea un algoritmo que añade sucesivamente información a partir de las distintas variables, que se refleja en un parámetro denominado «ganancia» (equivalente a la «bondad de ajuste» de los modelos generalizados). Finalmente, nos proporciona información sobre cómo influyen las distintas variables en la probabilidad de presencia de la especie.

Competencia espermática en poblaciones de *Rana temporaria* con sistemas de reproducción contrastados (sistemas explosivos vs. sistemas prolongados)

En los anfibios se pueden presentar dos sistemas de reproducción diferenciados, un sistema explosivo, en el que todos los individuos de la población se reproducen durante unos pocos días y un sistema prolongado, en el que la reproducción se extiende en un periodo de varias semanas o incluso meses y en el que la llegada de individuos se produce de manera secuencial. En el caso de *R. temporaria* se ha confirmado la existencia de estos dos sistemas a lo largo del gradiente altitudinal, ya que mientras que las poblaciones de zonas bajas siguen un sistema prolongado, en altitudes por encima de los 1300 metros, la reproducción es explosiva.

La competencia por las hembras es diferente en los dos sistemas de reproducción, ya que mientras en zonas bajas las hembras acuden a las char-

cas poco a poco durante toda la época de cría, por lo que el sex-ratio está muy desbalanceado hacia los machos y la competencia por las hembras es muy alta, en zonas altas machos y hembras se concentran en las charcas al mismo tiempo, por lo que a pesar de que el sex-ratio sigue siendo favorable a los machos, la competencia por las hembras parece ser menor al haber más hembras disponibles al mismo tiempo.

Con el fin de comprobar si el sistema de reproducción afectaba a la capacidad de fertilización de los machos, diseñamos un experimento en el que realizamos cruces entre individuos pertenecientes a una zona alta con sistema explosivo (Áliva, 1420 msnm) y otra de zona baja con sistema prolongado (Río Color, 330 msnm). El 25 de octubre de 2009 se capturaron 6 machos y 3 hembras en un pequeño arroyo en el valle de Áliva con la ayuda de un equipo de pesca eléctrica (Bretschneider Spezialelektronik, modelo EFGI 650) y fueron trasladados al laboratorio. En el momento de la captura, las ranas de esta población se encontraban en periodo de hibernación ya que la vega estaba completamente cubierta de nieve. Con el fin de estimular la espermatogénesis de los machos y la ovulación de las hembras, un día antes del experimento a todos los ejemplares se les inyectaron dos dosis de Gonadotropina Coriónica Humana (GCH) siguiendo el protocolo descrito por BROWNE *et al.* (2006) para *Bufo baxteri*. El 17 de enero de 2010 se capturaron 6 machos y 3 hembras de *R. temporaria* en la población del Río Color. Aunque en el momento de la captura los ejemplares de esta última población ya estaban reproduciéndose, todos los ejemplares fueron hormonados siguiendo el mismo protocolo que el empleado con los ejemplares de la población de Áliva para que las condiciones fueran iguales.

Se extrajeron aproximadamente 100 huevos de cada hembra (media= 88,16 ± 11,64 se) mediante presión abdominal y se depositaron en el centro de una placa de Petri. Cada puesta se fertilizó con el esperma de dos machos (uno de cada población), obtenido también mediante presión abdominal. Una muestra de esperma de todos los machos fue observada al microscopio para asegurarse de que los espermatozoides se movían

normalmente. Para asegurar que cada puesta recibiera el mismo número de espermatozoides de cada uno de los dos machos, previamente se realizó un espermocrito para medir la concentración de espermatozoides en un volumen de esperma dado (HETTYEY & ROBERTS 2006). Para realizar el espermocrito se centrifugó un capilar que contenía una muestra homogenizada de esperma durante 195 segundos a 11.500 rpm mediante una centrífuga Biocem 20 Centrifuge (Orto Alresa). Una vez conocida la concentración de espermatozoides, se ajustó el volumen de esperma necesario para que los dos machos contribuyeran con el mismo número de espermatozoides y se depositó una gota procedente de cada uno en dos extremos opuestos de la placa. Posteriormente se añadieron 50 ml de agua limpia y después de 5 minutos se aclaró la placa y se introdujo la puesta en un tanque de 500 ml con agua limpia a 13°C hasta la eclosión. Este protocolo se repitió hasta obtener 6 cruces mixtos: 3 puestas de Áliva y 3 puestas de Río Color, cada una fecundada con el esperma de dos machos distintos, uno de cada población.

Asignación de paternidades

Para conocer cual de los dos machos había fecundado los huevos de cada hembra, una vez que se produjo la eclosión, los renacuajos se fijaron en alcohol absoluto para su posterior genotipado. De cada uno de los progenitores se tomó una muestra de tejido después de realizar los cru-

ces. Para asignar la paternidad de cada uno de los renacuajos eclosionados se utilizaron 4 microsatélites: BFG072, BFG093, BFG183 y BFG241 (MATSUBA & MERILÄ 2009; Tabla 3).

El DNA de las muestras se extrajo mediante el protocolo estándar Chelex-100, añadiendo 500 µL de solución Chelex (Chelex-100, Bio-Rad) al 10% e incubando con 7 µg de Proteinasa K a 55°C durante 60 min y posteriormente a 100°C durante 20 minutos más. El genotipado de los parentales se hizo mediante una PCR multiplex en la que se analizaron los cuatro microsatélites conjuntamente. Para esta multiplex se usaron 6-20 ng de DNA, 0.3-0.7 µM de primer para cada uno de los micros y 5 µl de Qiagen Multiplex PCR Master Mix (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Los ciclos de PCR se iniciaron con 15 minutos a 95°C; 38 ciclos que consistieron en 30 s de desnaturalización a 94°C seguidos de 30 s de hibridación a 55°C y finalmente 30 s de elongación a 72°C. Tras el genotipado de todos los parentales para los cuatro microsatélites seleccionados, se comprobó que los micros BFG093 y BFG193 tenían alelos diferentes para las poblaciones de Áliva y Color, por lo que se genotiparon todas las larvas para estos dos microsatélites. En este caso se usaron 6-20 ng de DNA, 0.3-0.7 M de primer, 250µM de dNTPs (PROMEGA, USA) y 0.5U de Polimerasa Go Taq® Flexi DNA (Promega, USA), 2.0-2.5mM de Mg²⁺, 2 µl de 5x colorless Go Taq Flexi Buffer y 2 µl de 5x Green Go Taq Flexi Buffer. Los ciclos de PCR comenzaron con 5 minutos a 94°C, seguidos de 40 ciclos (30 s de desnatu-

Locus	Motivo de repetición	Tamaño de los alelos (bp)	Secuencia de los primers (5'- 3')	Código de Genbank
BFG072	(TGTA) ₁₃	104-132	F: AACTTTGCCACACCTGAAATG R: AATGTTTGTATCAGAGAGACCTG	EU334947
BFG093	(TG) ₂₁	118-138	F: GTCCATCTTCTGTTGCGTAT R: TGAACAAAATGTATGACCAGCC	EU334958
BFG183	(TG) ₉	129-215	F: AGCCTGAAATGTGGCAGAAG R: GTCCCATAGAAGTCGCTGATT	EU335004
BFG241	(CATA) ₈	107-152	F: TCTGCGCTATCCCTGTGTATAA R: GGTTTATGGGACTGCACGTIT	EU335033

Tabla 3. Marcadores usados en el análisis de paternidad, incluyendo los motivos de repetición, el tamaño de los alelos, la secuencia de primers y el código del Genbank.

Table 3. Markers used in paternity tests, including repeat motifs, size of alleles, sequence of primers and Genbank code.

realización a 94°C, 30 s de hibridación a 56°C y 30 s de extensión a 72°C). Después de los 40 ciclos se dejaron las muestras 20 minutos adicionales a 72°C. Todas las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal (Applied Biosystems, Inc.).

Para analizar las posibles diferencias en la concentración de espermatozoides entre los machos de las dos poblaciones estudiadas se realizó un test no paramétrico de Mann Whitney, siendo la variable dependiente el volumen de espermatozoides en cada capilar y la variable independiente la población de origen de cada macho. Para el análisis de paternidades se usó una ecuación lineal generalizada de medidas repetidas (GEE) con una distribución de Poisson con logaritmo como función de enlace, siendo la variable dependiente el número de hijos de cada macho, la variable repetida la hembra y las variables categóricas la población de origen de los machos y de las hembras. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS v.19.

Capacidad de resistencia térmica durante la fase embrionaria y larvaria

Se usaron cuatro poblaciones situadas en los extremos del gradiente altitudinal: Señales y Áliva (zona alta) y Río Color y Viango (zona baja). En un principio se había previsto realizar cruces entre poblaciones de distinta altitud, para ello se hormonaron los machos y las hembras de zonas altas para adelantar la vitelogénesis y la espermatogénesis y de esta forma poder ajustar su época de reproducción con los de zonas bajas. A pesar de que conseguimos que los machos maduraran, varias hembras no llegaron a poner huevos en un estado de desarrollo adecuado, por lo que tuvimos que prescindir de los cruces mixtos en el experimento y realizar los cruces de esta población en marzo, cuando habían madurado naturalmente. Los reproductores de Río Color se capturaron en la cuneta donde se reproducían en enero de 2010 y los de la población de Viango en marzo del mismo año, en la charca de reproducción. Una vez capturado un mínimo de 6 machos y 6 hembras por población, los reproductores se trasladaron al laboratorio para realizar los cruces.

Los cruces se realizaron artificialmente, para ello cada hembra se desovó mediante presión abdominal y la puesta fue fecundada con el espermatozoides de un solo macho, hasta completar un total de 5 familias de hermanos completos por cada población. Al capturarse todos los ejemplares durante la época natural de reproducción no fue necesario hormonarlos. Una vez obtenidas las puestas fertilizadas se mantuvieron a una temperatura de 5°C durante 3 horas hasta que comenzaron a hidratarse y posteriormente se separaron 24 huevos por cada puesta que se individualizaron en placas (1 huevo por pocillo y 24 pocillos por placa). De cada familia se obtuvieron 4 placas de 24 huevos y cada placa se colocó en una cubeta distinta con agua a cuatro temperaturas de desarrollo (16°C, 20°C, 24°C y 28°C). Las placas fueron revisadas diariamente anotando los huevos no fertilizados, las larvas muertas y los individuos deformes. Una vez que alcanzaron el estado de desarrollo 25 según la escala de GOSNER (1960) se sacaron de los pocillos y se pasaron a recipientes de 500 ml de capacidad en grupos de 4-5 ejemplares. Todos los recipientes se colocaron en una cámara de temperatura controlada a 13°C hasta el final de la metamorfosis.

La mortalidad y la velocidad de desarrollo para las tres temperaturas (16, 20 y 24°C) se analizó mediante un ANOVA anidado, para lo cual se usó como variable dependiente la mortalidad a las tres temperaturas de incubación y como variables independientes, la zona (alta o baja) y la población anidada dentro de la zona a la que pertenecían. La velocidad de desarrollo se analizó de la misma manera, usando en este caso los días de desarrollo hasta el estado 25 (GOSNER 1960) como variable dependiente.

RESULTADOS

Caracterización del sistema de reproducción de *Rana temporaria*: efectos de la temperatura y la altitud

Los resultados obtenidos confirmaron la existencia de dos sistemas de reproducción contrastados y dependientes de la altitud. En zonas bajas (< 500 msnm) las poblaciones de *R. temporaria* tienen un

sistema de reproducción prolongado, que comienza a finales de verano o principios de otoño, prolongándose durante 4 meses o incluso más tiempo, por el contrario, a medida que se asciende en altitud el inicio de la reproducción comenzó más tarde, hasta algunas poblaciones situadas por encima de los 2000 msnm, en las que la reproducción no comienza hasta el mes de mayo o incluso de junio (Figura 2). Se encontró una relación significativa entre altitud e inicio de la reproducción ($r = 0,90$; $F_{1,17} = 77,02$; $p < 0,0001$).

En zonas bajas, a lo largo del periodo reproductor la presencia de reproductores no es constante, sino que se observaron varios picos de entrada de adultos, condicionados por la precipitación y la temperatura ($> 4^{\circ}\text{C}$). Por el contrario, en zonas altas ($> 1200\text{-}1500\text{ m}$) la reproducción comenzó

en primavera y duró tan sólo unos pocos días o semanas, lo que es característico de sistemas explosivos.

El análisis de los registros de temperatura confirmó que en las poblaciones situadas por encima de los 1300 metros la reproducción no comenzó hasta que se retiraba el hielo de las charcas, como ocurrió en la charca de Llaguseco, situada a 1840 msnm (ver Figura 3). Asimismo, en muchas de estas poblaciones, los adultos podían pasar un periodo de hibernación bajo la nieve, de hasta 6 meses o más, como se observó en las poblaciones de Liordes y Llaguseco.

La amplitud térmica es mayor en zonas de alta montaña, donde la cubierta vegetal es prácticamente nula y las diferencias entre el día y la

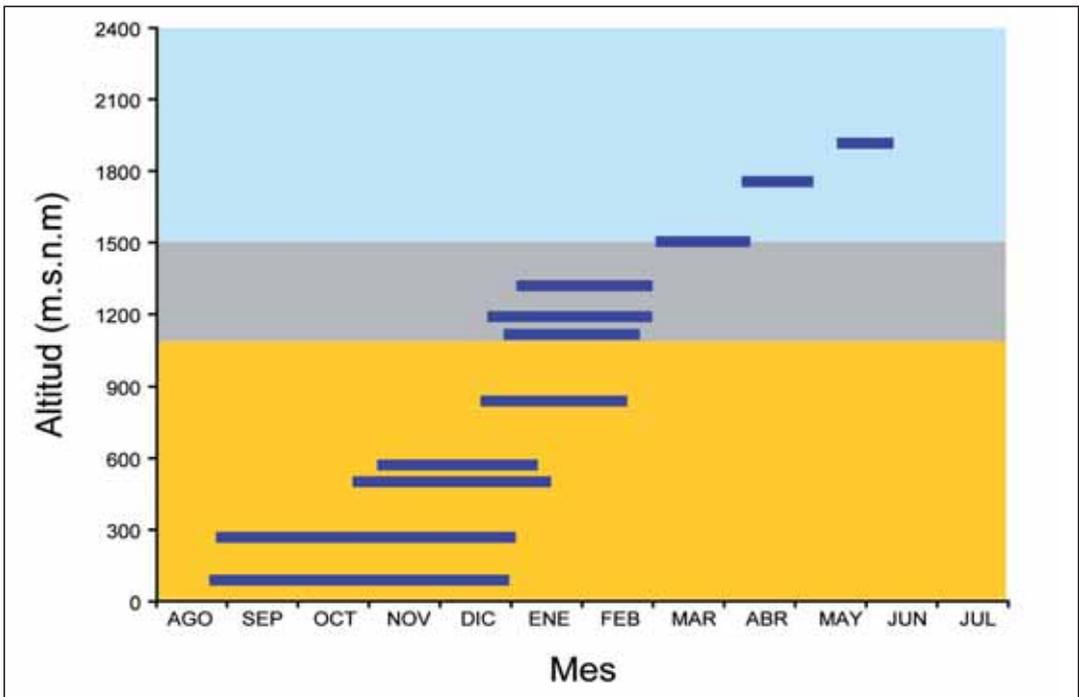


Figura 2. Variación temporal observada en la reproducción de *Rana temporaria* a lo largo del gradiente de altitud. Se indican tres franjas de altitud en relación con la frecuencia de nevadas y la persistencia de cobertura nival (naranja: cobertura nival poco frecuente, espesor reducido y fusión rápida; gris: nevadas frecuentes y cobertura nival intermitente, mayor espesor; azul: cobertura nival prolongada). Cada línea horizontal azul representa el periodo de puesta en un núcleo de reproducción.

Figure 2. Observed temporal variation in *Rana temporaria* breeding along the altitudinal gradient. Three bands of altitude related to the frequency of snowfall and persistence of the snow cover were show (orange: rare snow cover, reduced thickness and rapid melting; grey: frequent snow and intermittent snow cover, small snow thickness; blue: prolonged snow cover). Each blue horizontal line represents the breeding period in a breeding place.

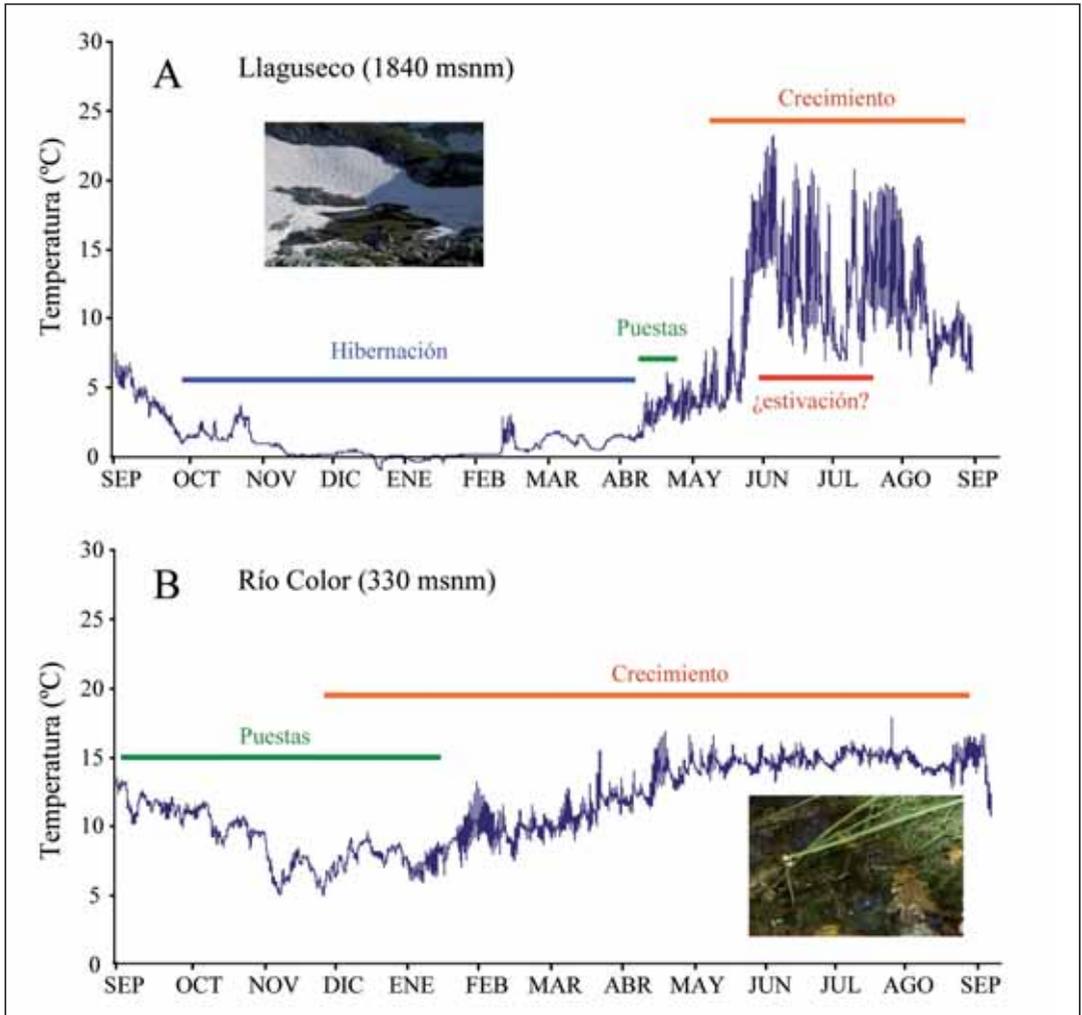


Figura 3. Temperatura diaria en las charcas de reproducción de *R. temporaria* a lo largo del año en dos de las poblaciones en las que se siguió la reproducción. A: Llaguseco, B: Río Color.

Figure 3. Daily temperatures in the ponds throughout the year in two of the populations in which *R. temporaria* reproduction was followed. A: Llaguseco, B: Río Color.

noche durante los meses de mayo a junio pueden superar los 15°C. En zonas bajas, la amplitud térmica es mucho menor y las diferencias anuales no fueron tan acusadas como en zonas altas (Figura 3).

Los análisis de los individuos marcados en la población de zona baja de Río Color durante la

temporada 2009-2010, confirmaron un reemplazamiento de los machos a lo largo de la estación reproductora. Los primeros reproductores aparecieron en la charca el 7 de octubre y los últimos el 17 de enero de 2010, no encontrándose más indicios en posteriores visitas. La duración total del periodo reproductor en 2009 fue de 102 días, produciéndose durante este periodo un reemplaza-

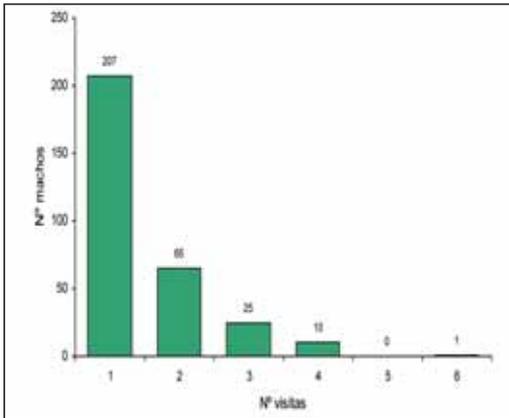


Figura 4. Número de visitas realizadas por los machos de la población de Río Color a las charcas de reproducción. Sobre cada barra se indica el número de machos que visitaron la charca de 1 a 6 veces.

Figure 4. Number of male visits to the breeding ponds in the «Río Color» population. The number of males who visited the pond from 1 to 6 times was show on each bar.

miento de los machos. La estancia media fue de $7,3 \pm 0,67$ (media \pm se) días, encontrándose diferencias significativas entre el tiempo de permanencia de los machos durante los 4 meses que duró la reproducción (Kruskall-Wallis test: $\chi^2 = 24,172$; $gl = 3$; $P < 0,001$), siendo mayor durante octubre y noviembre ($9,1 \pm 1,0$ y $9,1 \pm 1,8$ días respectivamente), que durante diciembre y enero ($7,9 \pm 1,4$ y $3,2 \pm 0,5$ días respectivamente).

El número de visitas de los machos a la zona de reproducción durante la estación de cría de 2009 osciló entre 1 y 6 (media = $1,48 \pm 0,05$ se), aunque el 67,2% de ellos sólo estuvieron presentes durante una jornada y el 21,1% sólo acudieron 2 días (Figura 4).

Estimación de la componente genética en la fenología de *Rana temporaria*

Del total de 120 marcadores iniciales solo 50 amplificaron correctamente. De los cincuenta marcadores ninguno mostró una desviación significativa del grado de deriva génica promedio entre las dos poblaciones ($F_{ST} = 0,076$).

Caracterización y cartografía del hábitat de *Rana temporaria* en los Picos de Europa

En un primer análisis se incluyeron todas las localizaciones para las que disponíamos de información ($n=70$), considerando las siguientes variables predictoras: pendiente, orientación, distancia a cursos de agua, distancia a edificaciones y/o muros, distancia a vías asfaltadas, insolación global, difusa y directa en el equinoccio, solsticio de verano y solsticio de invierno, acúmulo de flujo de agua (Tabla 2). Las variables se consideraron en distintos entornos, desde la celda local (900 m^2) a entornos de 11×11 celdas ($0,1 \text{ km}^2$).

La ganancia total del modelo fue 1,621, es decir, las celdas con poblaciones de *R. temporaria* tienen una probabilidad de presencia $e^{1,621} \approx 5,06$ veces mayor que cualquier celda al azar a partir de las variables introducidas.

Un 25% de las celdas con presencia de *R. temporaria* se han empleado para la validación del modelo, como muestras independientes. El poder predictivo del modelo, estimado a partir del análisis de las curvas ROC (receiver operator curve), fue relativamente bueno, con un área bajo la curva (area under the curve, AUC) de $0,891 \pm 0,025$.

La variable que resultó más relevante, tanto en modelos univariados como en combinación con otras variables fue la pendiente, con un coeficiente negativo (Tabla 4). En el modelo presentado, supone un 28,1% de la ganancia total. La distancia a edificaciones, también con coeficiente negativo, contribuye un 19,9% a la ganancia total del modelo. Seguidamente, entraron en el modelo el acúmulo de flujo en un entorno de 3×3 celdas (8100 m^2), que contribuye con un 7,6% a la ganancia total del modelo, y la distancia a muros y a vías asfaltadas, con un 7,4% y 6,1% de contribución a la ganancia total del modelo.

El resto de variables, incluyendo todas las relacionadas con la vegetación así como con la insolación y orientación, tuvieron poco o ningún impacto en el modelo ($<5\%$). Análisis similares, considerando únicamente las poblaciones en los distintos rangos de altitud (0-600 m, 600-1200 m,

Variable	% Contribución al modelo
Pendiente (-)	28,1
Distancia a edificaciones (-)	19,9
Acúmulo de drenaje (entorno 3x3 celdas) (+)	7,6
Distancia a muros (-)	7,4
Distancia a vías asfaltadas (+)	6,1

Tabla 4. Contribución de las variables más relevantes al modelo de presencia de *R. temporaria* (sólo se representan aquellas que pusieron una contribución >5% a la ganancia total del modelo).

Table 4. Contribution of the most important variables to the presence model of *R. temporaria* (only those contributed > 5% to the total gain of the model were represented).

>1200 m) se encuentran en desarrollo. El objetivo último es la elaboración de un mapa predictivo de distribución, para los distintos rangos de altitud.

Competencia espermática en poblaciones de *Rana temporaria* con sistemas de reproducción contrastados (sistemas explosivos vs. sistemas prolongados)

La concentración de espermatozoides en el esperma de los machos usados en el experimento fue muy variable, oscilando entre el 1,77 y el 21,75% del volumen total (media \pm se = 6,92 \pm 1,75%). A pesar de esto, no se encontraron diferencias significativas entre los machos de Áliva y Río Color (Mann-Whitney test: $Z = -0,8006$; $p = 0,42$). Después de ajustar el volumen de esperma

de cada macho para asegurar que cada puesta recibiera el mismo número de espermatozoides de cada uno, se esperaron 10 días hasta que los renacuajos alcanzaron el estado 25 (GOSNER 1960). En todas las puestas hubo eclosiones salvo en la de una hembra de Río Color en la que el 100% de los huevos no se desarrollaron, por lo que fue desechada en los análisis posteriores. El porcentaje de fecundación en el resto de puestas osciló entre el 27,1% y el 91% (Tabla 5).

Después del genotipado de cada uno de los parentales se comprobó que con el microsatélite BFG183 se podían distinguir todos los posibles hijos de los cruces de dos hembras de Áliva y dos hembras de Color y con el BFG093 los de la hembra de Áliva restante (Tabla 6). Teniendo en cuenta estos resultados, se genotiparon todas las larvas de cada uno de los cruces para el microsata-

Hembra	Nº huevos	Eclosionados (%)	Macho	
			Río Color (%)	Áliva (%)
Áliva 1	129	35 (27,1)	27 (77,1)	8 (22,9)
Áliva 2	60	47 (78,3)	32 (68,1)	15 (31,9)
Áliva 3	109	51 (46,8)	39 (76,5)	12 (23,5)
Color 1	100	0 (0)		-
Color 2	67	61 (91,0)	54 (88,5)	7 (11,5)
Color 3	64	43 (32,8)	20 (95,2)	1 (4,8)

Tabla 5. Número de huevos de cada hembra usados en los cruces, número de huevos eclosionados (entre paréntesis porcentaje sobre el total) y número de renacuajos asignados a cada uno de los machos según su población de origen (entre paréntesis porcentaje sobre el total de huevos eclosionados).

Table 5. Number of eggs per female used in the crosses, number of eggs hatched (in brackets percentage from the total) and number of tadpoles assigned to each of the males according to their population of origin (in brackets percentage from total hatched eggs).

Nº	Hembra	Locus	Alelos ♀ (pb)	♂ Alelos Áliva (pb)	♂ Alelos Color (pb)	Alelos hijos (pb)	Padre
1	Áliva 1	BFG183	133 165	149	169	133-149 133-169 165-149 165-169	Áliva Color Áliva Color
2	Áliva 2	BFG093	118 120	123 138	120 122	118-123 118-138 118-120 118-122 120-123 120-138 120-120 120-122	Áliva Áliva Color Color Áliva Áliva Color Color
3	Áliva 3	BFG183	129 135	139 151	133 215	129-139 129-151 129-133 129-215 135-139 135-151 135-133 135-215	Áliva Áliva Color Color Áliva Áliva Color Color
5	Color 2	BFG183	175 215	139 145	141 161	175-139 175-145 175-141 175-161 215-139 215-145 215-141 215-161	Áliva Áliva Color Color Áliva Áliva Color Color
6	Color 3	BFG183	129 149	133	149 165	129-133 129-149 129-165 149-133 149-149 149-169	Áliva Color Color Áliva Color Color

Tabla 6. Microsatélites genotipados en el análisis de paternidades de las cinco familias usadas en el experimento. Tamaño de los alelos (pb) para cada hembra y cada uno de los dos machos usados en cada cruce, genotipo de los posibles hijos de cada cruce y población del padre de los posibles hijos de cada genotipo.

Table 6. Genotyped microsatellites used in the paternity analyses of the five families used in the experiment. Size of alleles (bp) for each female and two males used in each cross, genotype of the possible in each cross, and population of the father of the possible sons of each genotype.

télite correspondiente, pudiendo asignar la paternidad de todos ellos (Tabla 5).

Los resultados del análisis GEE confirmaron la existencia de un efecto significativo de la población de origen del macho (Wald $\chi^2 = 85,368$; gl = 1; $p < 0,0001$), mientras que el efecto de la población de la hembra no fue significativo (Wald $\chi^2 = 0,036$; gl = 1; $p < 0,85$), lo que indica que independientemente de la población de origen de la

hembra, los machos de la población de río Color fueron los padres de la mayoría de los hijos en todos los cruces (Figura 5).

Capacidad de resistencia térmica durante la fase embrionaria y larvaria

De las cuatro temperaturas a las que se incubaron los huevos, se produjeron eclosiones en todas

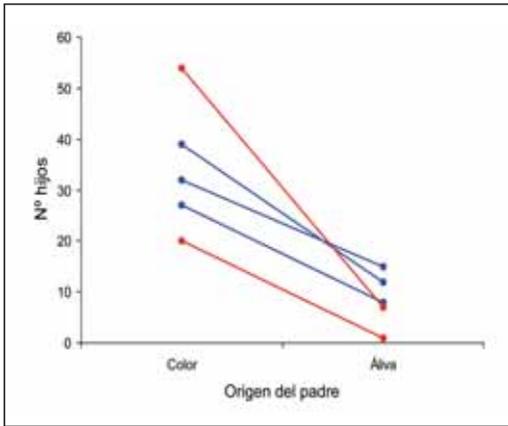


Figura 5. Experimento de competencia espermática. Número de hijos de cada uno de los padres según su población de procedencia (Color y Áliva) en los cinco cruces en los que se produjo fertilización. Líneas rojas: hembras de Río Color; Líneas azules: hembras de Áliva.

Figure 5. Sperm competition experiment. Number of sons assigned to each parent according to their population (Río Color and Áliva) in the five crosses in which fertilization occurred. Red lines: of the «Río Color» females, Blue lines: Áliva females.

excepto a 28°C, donde los huevos de todas las poblaciones ni siquiera pasaron el estado de mórula. A 24°C, aproximadamente el 50% de los huevos tampoco superaron este estado de desarrollo y un elevado porcentaje de los que eclosionaron mostraron importantes deformidades.

El análisis de los datos confirmó la existencia de diferencias significativas entre zonas en el número de huevos que no se desarrollaron a las 3 temperaturas (Wilk's $\lambda = 0,53$; $F_{3,14} = 4,042$; $p = 0,029$; Figura 6), mientras que las diferencias entre poblaciones dentro de cada zona no fueron significativas (Wilk's $\lambda = 0,64$; $F_{6,28} = 1,166$; $p = 0,35$). El análisis de las cuatro poblaciones por separado confirmó la existencia de diferencias significativas en mortalidad sólo para 16°C ($F_{3,16} = 3,5004$; $p = 0,04$), aunque para 20°C ($F_{3,16} = 2,766$; $p = 0,07$) resultaron marginalmente no significativas, no encontrándose diferencias a 24°C ($F_{3,16} = 2,512$; $p = 0,095$). En cuanto a la velocidad de desarrollo, no se encontraron diferencias significativas entre zonas (Wilk's $\lambda = 0,65$; $F_{3,14} = 2,425$; p

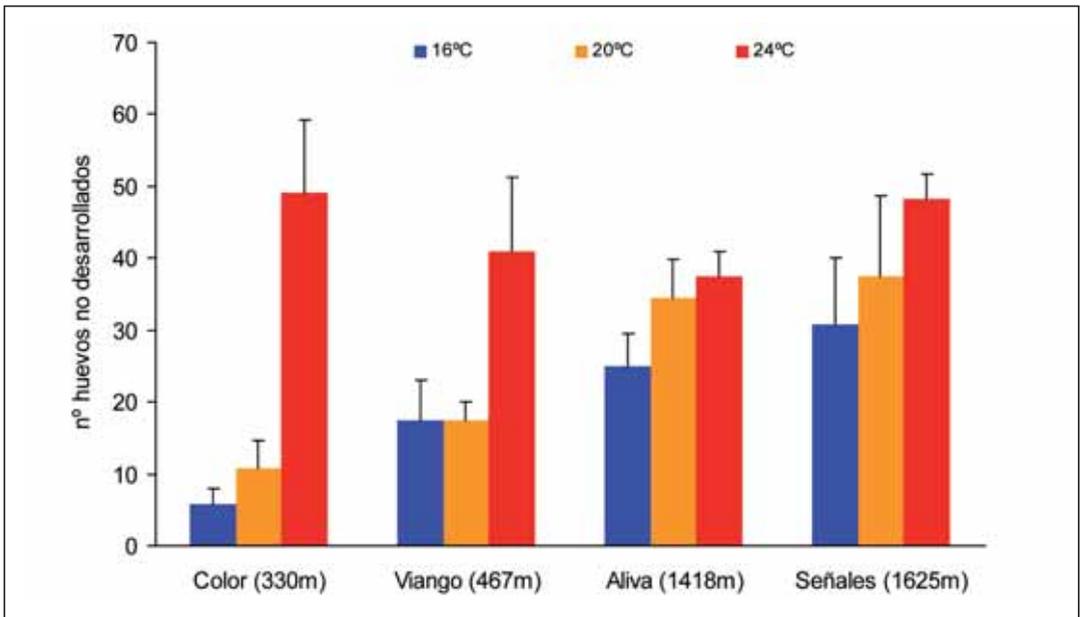


Figura 6. Número medio de huevos por familia que no alcanzaron el estado de mórula en las 4 poblaciones estudiadas y para las 3 temperaturas de incubación en las que hubo supervivencia.

Figure 6. Mean number of eggs per family that did not reach the morula stage in the four studied populations or the three incubation temperatures in which there was survival.

= 0,11), pero si entre poblaciones dentro de zonas (Wilk's $\lambda = 0,42$; $F_{6, 28} = 2,508$; $p = 0,045$).

DISCUSIÓN

En este trabajo se han analizado los posibles efectos del calentamiento global sobre la estructura poblacional y la historia de vida de la Rana bermeja (*Rana temporaria*) en el Parque Nacional de los Picos de Europa. La distribución casi continua de esta especie a lo largo de todo el gradiente altitudinal y su distribución fragmentada, nos ha permitido estudiar de forma sincrónica y en una distancia geográfica muy pequeña, la variación en las historias de vida y los posibles efectos del calentamiento global sobre la viabilidad de las poblaciones.

Caracterización del sistema de reproducción en *R. temporaria* y posibles efectos del cambio climático sobre la viabilidad de las poblaciones

Los anfibios anuros presentan dos sistemas de reproducción diferenciados, uno explosivo, en el que todos los apareamientos tienen lugar durante unos pocos días y otro prolongado en el que durante varios meses o incluso durante todo el año pueden tener lugar eventos reproductivos. En realidad estos dos sistemas se pueden considerar dos estrategias extremas de un sistema continuo, desde especies que se reproducen durante una sola noche a especies que se reproducen durante todo el año, como ocurre en algunas especies tropicales (WELLS 2007). En el caso de *Rana temporaria*, nuestros resultados han confirmado la existencia de estos dos sistemas de reproducción dependiendo de la altitud a la que se encuentran las distintas poblaciones y de las condiciones climatológicas que soportan. En zonas situadas por debajo de los 600 metros, la reproducción sigue un sistema prolongado, pudiendo comenzar a mediados o finales del mes de septiembre y terminar en el mes de enero. A lo largo de estos meses los machos acuden a las charcas de reproducción por la noche y sobre todo en días de lluvia cuando la temperatura supera los 4°C. Durante todo el periodo reproduc-

tor, las hembras sólo acceden a las charcas para hacer la puesta mientras que los machos pueden acceder durante varios días seguidos en busca de pareja, siendo la estancia media en las charcas de aproximadamente una semana, aunque a final de la temporada el tiempo de estancia se reduce. Por el contrario, en zonas situadas por encima de los 1300 o 1500 metros, donde la nieve se mantiene durante varios meses al año sobre las charcas, la reproducción sigue un patrón explosivo, concentrándose todos los individuos durante unos pocos días a partir del momento en el que las charcas son accesibles tras retirarse el hielo de las orillas.

Las diferencias intraespecíficas en fenología reproductiva y en los sistemas de reproducción han sido observadas en varias especies de anfibios a lo largo del gradiente latitudinal, por ejemplo en *Bufo calamita* (TEJEDO 1988) o en *Bufo bufo* (DAVIES & HALLIDAY 1977, 1979). Esta variación geográfica parece ser un hecho frecuente en especies de zonas templadas de distribución amplia, en las que la estación reproductora se hace más corta a medida que aumenta la latitud, la altitud o la aridez del hábitat (WELLS 2007).

Las diferencias fenológicas existentes entre las distintas poblaciones de *Rana temporaria* tienen importantes implicaciones que afectan a la viabilidad de las mismas. Mientras que en poblaciones bajas los individuos disponen de un importante margen temporal para reproducirse, a medida que aumenta la altitud, los límites temporales de cada una de las fases de la reproducción (apareamiento, crecimiento larvario y crecimiento juvenil) se hacen más estrechos (Figura 7A). En poblaciones situadas por encima del nivel de permanencia de las nevadas invernales (1200-1500 msnm), se pueden establecer tres momentos críticos: fusión de la cubierta de hielo, desecación y congelación de las charcas. Estos tres momentos delimitan temporalmente cada una de las fases de la reproducción, de forma que las variaciones anuales pueden condicionar el éxito de la cría y el reclutamiento posterior. Estas restricciones temporales plantean dos posibles escenarios, si la fenología reproductiva de *Rana temporaria* está fijada genéticamente, la maduración de las gónadas y el inicio de la reproducción

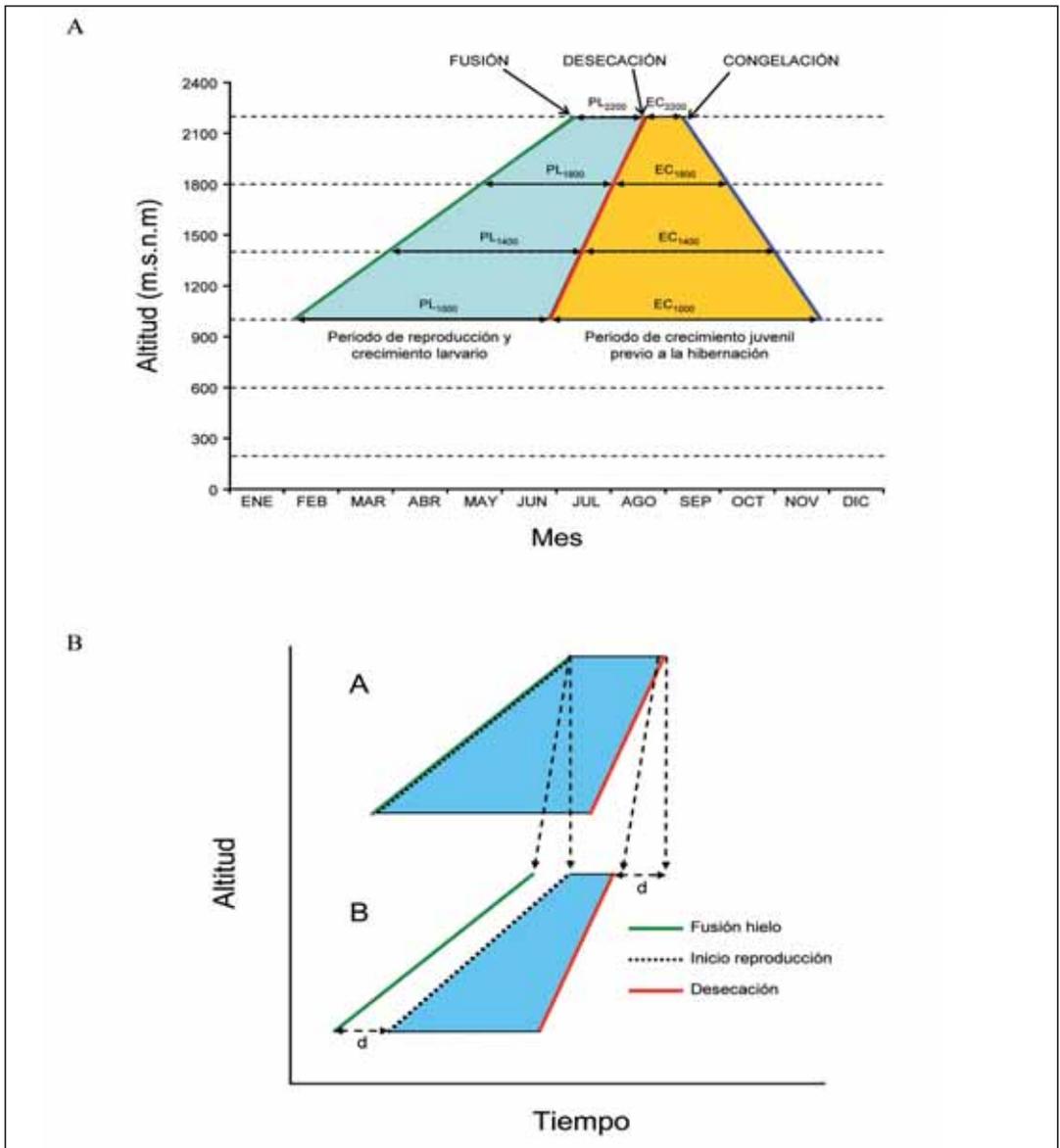


Figura 7. (A) Representación esquemática de la variación altitudinal de la disponibilidad temporal de hábitat acuático y la estación de crecimiento juvenil para *Rana temporaria* en la zona de influencia nival. PL: periodo larvario; EC: estación de crecimiento.

(B) Desacoplamiento entre el inicio del hidroperiodo (fusión de la cubierta de hielo: línea verde, continua) y el inicio de la reproducción (línea de trazos) en un escenario de fenología reproductiva 'fijada' genéticamente. A) La reproducción se inicia cuando las charcas quedan descubiertas. B) Adelanto de 'd' días en los tiempos de fusión y desecación. Si no hay respuesta de adelanto en la reproducción el periodo efectivo para desarrollo larvario se reduce en 'd' días.

Figure 7. (A) Schematic representation of altitudinal variation of seasonal availability in aquatic habitat and growing season for juvenile *Rana temporaria* in the zone of snow influence. PL: larval period; EC: growing season.

(B) Decoupling between the onset of hydroperiod (ice melting: continuous green line) and the onset of reproduction (dashed line) in a scenario of reproductive phenology genetically 'fixed'. A) Breeding starts when the pools are free of ice. B) Advance of 'd' days in the melting time and drying time. If breeding does not advance, the effective breeding period is reduced 'd' days.

comenzará siempre en la misma época, de forma que un adelanto o un retraso en la desaparición de la cubierta de hielo podría provocar un desacoplamiento entre la ventana temporal para la reproducción y el desarrollo larvario y el periodo reproductor, con efectos directos sobre la dinámica poblacional, bien a través de un efecto negativo sobre la supervivencia larvaria y el reclutamiento de los juveniles (Figura 7B), o por mortalidad masiva de adultos y destrucción de puestas (MONTORI *et al.* 2011). Si por el contrario, el inicio de la reproducción tiene una componente genética débil o no significativa, la población podría responder al acortamiento del periodo invernal adelantando el momento de la reproducción.

Los resultados de las observaciones realizadas durante el presente proyecto sugieren la existencia de un componente genético en el inicio de la reproducción, ya que se comprobó que algunos años en los que las precipitaciones en forma de nieve fueron muy escasas durante el invierno y las charcas permanecieron descubiertas a mediados de enero, la reproducción no comenzó hasta finales del mes de febrero, como en años de nevadas normales. Asimismo, se observó que la ocurrencia de fenómenos estocásticos, como nevadas tardías, ocasionaron mortalidades catastróficas de adultos que ya habían acudido a reproducirse y aplastamiento de puestas. La sucesión de varios episodios de mortalidad seguidos, con una importante reducción del reclutamiento posterior, podría ocasionar la extinción de la población. Estos fenómenos de extinción serían especialmente graves en poblaciones de alta montaña, en los que el hábitat se encuentra muy fragmentado y las posibilidades de recolonización desde poblaciones vecinas son muy bajas debido a la matriz inhóspita en la que se sitúan los lugares de reproducción.

Según estos resultados, son previsibles unos efectos muy importantes sobre la dinámica de las poblaciones de anfibios si tal como predicen los modelos climáticos se espera una tendencia al aumento de las temperaturas y en la ocurrencia de eventos climáticos extremos a medio plazo (HARPER *et al.* 2008).

Estimación de la componente genética en la fenología de *Rana temporaria*

Con el fin de confirmar la existencia de esa posible componente genética que gobernaría la fenología reproductiva, se realizó un barrido genético con el fin de cubrir la mayor porción posible de genoma para encontrar posibles polimorfismos raros ligados a adaptación a ambientes térmicos.

Nuestros resultados ponen de relevancia una elevada falta de especificidad en las secuencias de los cebadores de los marcadores neutrales entre poblaciones de *R. temporaria* con un origen geográfico distante. Los marcadores disponibles están desarrollados en su mayoría para poblaciones escandinavas (MATSUBA & MERILÄ 2009) y tan solo alrededor del 40% amplificaron con éxito en las poblaciones del Parque Nacional de Picos de Europa. Usando únicamente marcadores neutrales anónimos, se espera encontrar una proporción de ~1-2% de marcadores bajo selección en poblaciones de ambientes selectivos fuertemente contrastados. Esta previsión se basa en estudios publicados con especies de genomas relativamente pequeños (MÄKINEN *et al.* 2008). Teniendo en cuenta el gran tamaño del genoma de *R. temporaria*, 50 marcadores anónimos proporcionan una cobertura genómica tan baja que no es de extrañar no encontrar ningún marcador ligado a un gen bajo selección direccional divergente.

Estos resultados nos muestran que el camino a seguir pasa por desarrollar marcadores específicos para las poblaciones del Parque Nacional y, preferiblemente, con una elevada proporción de marcadores no-anónimos ligados a genes funcionales. Gracias a la accesibilidad y evolución de las técnicas de secuenciación masiva y transcriptómica (WHEAT 2010), actualmente es posible desarrollar este tipo de recursos moleculares para especies silvestres como *R. temporaria*. El trabajo en esta línea está actualmente en progreso dentro del ámbito de un proyecto en curso en el Parque Nacional de Picos de Europa, financiado por la Red de Parques Nacionales (ref:428/2011).

Caracterización y cartografía del hábitat de *R. temporaria* en el PN de Picos de Europa

Los resultados del modelo predictivo de selección de hábitat confirmaron que la variable más relevante fue la pendiente del terreno: *R. temporaria* selecciona positivamente aquellas zonas relativamente llanas dentro del espacio disponible. Esas zonas son aquellas en las que es mayor la probabilidad de que se acumule nieve o agua de lluvia que den lugar a charcas temporales de reproducción.

Así mismo se encontró cierta relación entre la presencia de infraestructuras humanas y áreas de reproducción de *R. temporaria*. Esta relación puede estar condicionada a que en pistas forestales y caminos poco transitados son frecuentes los acúmulos de agua en cunetas y baches, que en muchos lugares, sobre todo en zonas bajas, pueden llegar a constituir los únicos lugares apropiados para la reproducción de la especie. Pero además de este efecto positivo de ciertas infraestructuras, hay otras, como por ejemplo carreteras asfaltadas y autopistas, que pueden suponer barreras infranqueables para los anfibios además de una importante fuente de mortalidad.

Una de las conclusiones que podemos extraer de los análisis realizados es que debido a las importantes diferencias existentes entre las poblaciones de *R. temporaria* a lo largo del gradiente altitudinal, un modelo conjunto para todas ellas no es demasiado informativo, por lo que es necesario realizar tres modelos independientes para tres rangos de altitud: < 600 m, 600-1300m y > 1300 m. Por ejemplo, la presencia de pistas forestales, que pueden favorecer la presencia de hábitat adecuado para la reproducción en zonas bajas, es prácticamente nula por encima de los 1300 metros de altitud, donde las variables relevantes son otras. Así mismo, en altitudes elevadas, la ausencia de cobertura vegetal y la orografía complicada, limitan en gran medida los desplazamientos entre zonas favorables.

Competencia espermática en poblaciones de *R. temporaria* con sistemas de reproducción contrastados

Los rasgos espermáticos muestran una gran variabilidad, tanto entre especies como dentro de la misma especie. Varios de estos rasgos tienen una importancia crucial en el proceso de fecundación, entre los que destacan la morfología de los espermatozoides, la motilidad y la viabilidad a lo largo del tiempo (CAMERON *et al.* 2007). En el caso de los anfibios, en los que la competencia por las hembras depende en gran medida del sistema de apareamiento, es esperable que los rasgos espermáticos que favorezcan la fertilización varíen según la intensidad de esa competencia (PARKER *et al.* 1996). Como medida indirecta de la intensidad de la competencia por las hembras se suele usar la relación de sexos operacional (normalmente conocida por sus siglas en inglés OSR, Operational sex-ratio), que es la relación entre el número de hembras «fertilizables» y el número de machos activos en el lugar y el tiempo en el que ocurren los apareamientos (EMLEN & ORING 1977). De esta forma, el OSR será más alto en sistemas prolongados que en sistemas explosivos. La Rana bermeja nos brinda la oportunidad de estudiar si esos rasgos varían dentro de la misma especie dependiendo de si la reproducción sigue un patrón prolongado, con una competencia muy intensa, o explosivo, en el que OSR será menor y la competencia supuestamente también será menor al haber más hembras disponibles al mismo tiempo.

Los resultados del experimento llevado a cabo confirmaron que los machos procedentes de una población con un sistema prolongado tenían una tasa de fertilización mayor que la de machos de poblaciones con un sistema explosivo. La capacidad del esperma para fertilizar los huevos y competir con el esperma de otros machos no se puede definir solo por rasgo espermático, sino por una combinación entre cantidad de esperma y calidad del mismo (e.g. LEVITAN 2000). En algunas especies con fertilización externa, como el pez *Lepomis macrochirus*, se encontró una mayor concentración de espermatozoides en los machos de la población con un sex-ratio operacional más alto (LEACH & MONTGOMERIE 2000).

En nuestro caso, no se encontraron diferencias en la concentración de esperma entre las dos poblaciones y por otra parte, al haber añadido la misma cantidad de espermatozoides de cada macho, la mayor tasa de fertilización de uno de ellos sólo podía ser atribuida a alguna característica de los espermatozoides: tamaño, motilidad o longevidad (HETTYEY & ROBERTS 2006). A pesar de que la variación intra-específicas en las características espermáticas no son fáciles de interpretar (MORROW & GAGE 2001), algunos autores han propuesto que una importante fuente de variación entre distintas poblaciones puede ser la presencia de más de una estrategia evolutivamente estable para la inversión en diferentes características del esperma, posiblemente vinculadas con sistemas de apareamiento alternativos (HETTYEY & ROBERTS 2006; LEACH & MONTGOMERIE 2000), lo que podría explicar nuestros resultados.

Capacidad de resistencia térmica durante la fase embrionaria y larvaria en *R. temporaria*

Uno de los efectos más importantes del cambio climático es el cambio en la distribución de las especies a lo largo de gradientes geográficos. En el caso de los anfibios, las poblaciones que viven en los límites de distribución (extremos altitudinales y latitudinales) pueden ser muy sensibles a los cambios en la temperatura y los patrones de lluvia, ya que estas variables pueden influir de una manera bastante compleja, tanto en las tasas de desarrollo, las fenologías de cría y la disponibilidad hídrica o temporal del hábitat acuático. Los resultados obtenidos en el experimento de ambiente común, en el que varias puestas de varias poblaciones de *R. temporaria* situadas a lo largo del gradiente altitudinal se incubaron a distintas temperaturas, confirmaron la existencia de diferencias en resistencia térmica entre poblaciones situadas en los extremos del gradiente. Aunque a temperaturas muy altas (24°C y 28°C) la mortalidad durante el desarrollo fue total o muy elevada en todas las poblaciones, a temperaturas más moderadas, la mortalidad fue significativamente más alta en las poblaciones situadas por encima de 1400 metros de altitud.

En animales ectotermos, la temperatura es un importante agente selectivo que es capaz de causar variación genética adaptativa a lo largo de los gradientes altitudinales (JUMP *et al.* 2008). Nuestros resultados confirman que la temperatura durante el desarrollo larvario podría ser un factor limitante para la supervivencia de las poblaciones situadas en zonas de alta montaña. Una subida de unos pocos grados durante el periodo de desarrollo temprano, que según los modelos actuales de cambio climático no es algo descabellado, podría contribuir a la extinción de las poblaciones situadas en el límite del gradiente de altitud.

Propuestas de conservación de los anfibios del PNPE

El primer problema que se plantea a la hora de aplicar políticas de conservación, tanto de especies como de espacios naturales, es el de definir geográficamente las unidades a conservar, ya que en último término habrá que llegar a un equilibrio entre el nivel de conservación deseable y el posible desde el punto de vista práctico. Debido a esto, es necesario identificar la unidad mínima que se debe proteger para que el esfuerzo de conservación sea realmente efectivo. Para ello resulta imprescindible conocer la dinámica poblacional de las especies que queremos conservar, con el fin de que se permita el flujo de individuos entre poblaciones y de esta forma evitar el aislamiento y consecuentemente la posible extinción de poblaciones locales.

Las políticas de conservación se han basado históricamente en criterios numéricos, protegiéndose aquellos enclaves que aglutinaban un porcentaje significativo de la población de la especie objeto de protección. Este tipo de estrategias pueden tener validez en el caso de especies sésiles o de limitada movilidad, pero tendrán una escasa efectividad en el caso de especies con una estructura metapoblacional, en la que los individuos se agrupan en unidades reproductivas con un cierto grado de conexión entre ellas. En este caso, podrían resultar más efectivas unas políticas de conservación dirigidas a la protección de una red de enclaves que aseguraran la conectivi-

dad entre los distintos núcleos de población, de forma que no se cortara el flujo de individuos entre ellos y por ende, el flujo génico.

Los resultados obtenidos en el presente proyecto han confirmado la existencia de varias Unidades Evolutivas Significantes en la población de *Rana temporaria* del PNPE, que están genéticamente diferenciadas entre sí. En el caso de estas poblaciones, que es extensible al de otras poblaciones de anfibios como por ejemplo el Sapo partero (*Alytes obstetricans*), la escasa conectividad entre algunas poblaciones, debido sobre todo al hábitat inhóspito de la matriz en la que se encuentran las charcas de alta montaña, hace que sea muy improbable la recolonización por individuos de poblaciones cercanas en el caso de que se produjeran fenómenos de extinción local.

Asimismo, hemos confirmado la existencia de grandes diferencias entre poblaciones tanto en los sistemas de apareamiento y selección sexual, que podrían afectar a la variabilidad genética poblacional, como en resistencia térmica larvaria a lo largo del gradiente altitudinal. Estos resultados confirman la elevada sensibilidad de las poblaciones de anfibios de alta montaña y la amenaza de extinción a medio plazo en caso de un aumento de los fenómenos meteorológicos adversos ligados al cambio climático. Por ello, en base a los resultados obtenidos, se recomiendan las siguientes medidas de conservación de las poblaciones de *R. temporaria* y por extensión de otras especies de anfibios, en el seno del Parque Nacional de Picos de Europa:

1) *Protección integral de los núcleos de reproducción de Rana temporaria y Alytes obstetricans situados por encima de los 1300 metros de altitud.* Los hábitats de reproducción de la *R. temporaria* suelen ser humedales someros, pequeños y frecuentemente temporales, por lo que suelen recibir menor atención y protección que humedales de mayor tamaño como lagos y lagunas. Muchos de estos humedales se encuentran situados en zonas de intenso aprovechamiento ganadero, por lo que es frecuente el acceso de vacas a las charcas. El uso que hace el ganado de estos pequeños humedales puede provocar su desecación temprana

y el incremento de la eutrofización de sus aguas al aumentar la concentración de nitratos y de amonio procedente de los excrementos. La presencia de nitratos procedentes de los excrementos del ganado se ha confirmado que puede reducir la supervivencia de las larvas de algunas especies de anfibios en un 70% (SCHMUTZER *et al.* 2008) o producir importantes cambios en su comportamiento (MIAUD *et al.* 2011).

Algunas charcas como por ejemplo la charca de Pandecarmen, la de Fana o la de Bobias han sido valladas con estructuras de madera permanentes, que aunque en principio pueden cumplir el objetivo de impedir la entrada de ganado, no han resultado eficientes. En primer lugar, este tipo de vallados tiene un elevado impacto visual y un elevado coste económico, por otra parte en algunos casos, como en las charcas de Andara, al instalarlas en zonas de alta probabilidad de aludes primaverales, han sido destruidas, permaneciendo en la zona los restos de madera. Por último, estas estructuras necesitan de un mantenimiento regular y caro. Estos costes podrían reducirse si en vez de vallados permanentes se colocaran estructuras disuasorias temporales, como los pastores eléctricos. Estos pastores se colocarían exclusivamente durante los meses de mayor riesgo de desecación y en los que la presión del ganado es más alta. En un principio sería suficiente con tenerlos colocados desde mayo hasta julio, siendo retirados el resto del año. De esta forma se abarataría los costes y reduciría el impacto visual, por lo que con el presupuesto necesario para la instalación de estructuras permanentes de madera se podrían colocar gran cantidad de pastores eléctricos en un mayor número de charcas. Sería muy importante colocar estos pastores en algunas charcas de alta montaña en las que se reproducen poblaciones aisladas y muy sensibles, como la de Llaguseco y las charcas de la Vega de Liordes y que actualmente no tienen ningún tipo de protección.

2) *Mantenimiento de termómetros y toma de datos de temperaturas y muestras de tejido.* Durante el presente proyecto se ha realizado un impor-

tante esfuerzo para la colocación de termómetros de registro continuo en gran cantidad de humedales de interés para los anfibios. Aunque algunos de esos termómetros se han retirado después de obtener la información de dos o tres años, se han dejado colocados varios en algunas localidades de interés especial, sobre todo en algunas situadas en el límite altitudinal de distribución de *R. temporaria* que corrían un alto riesgo de extinción local. Sería necesario implicar a la guardería del PN en la toma de datos con cierta periodicidad para poder contar con series temporales largas que permitieran apreciar cambios a largo plazo en las tendencias climáticas. Asimismo, sería necesario remplazar los termómetros averiados por unos nuevos.

En un proyecto anterior de la convocatoria del OAPN se comentó la posibilidad de creación de un banco de tejidos en el que se irían incorporando muestras periódicamente. El análisis molecular de muestras recogidas durante series temporales largas puede permitir detectar cambios producidos en la estructura genética de las poblaciones y la posible relación entre esos cambios y las tendencias de cambio climático. Hasta el momento todas las muestras han sido recogidas por el grupo investigador, pero sería de gran interés implicar al personal del PNPE en esta tarea, que podría ser llevada a cabo al mismo tiempo que se realiza el mantenimiento de los termómetros de registro continuo.

- 3) *Campaña de información sobre enfermedades emergentes y riesgos para los anfibios.* Uno de los mayores riesgos para muchas especies de anfibios ha sido la aparición de enfermedades emergentes (ver <http://www.sosanfibios.org/>), como la quitridiomycosis. Estas enfermedades han provocado la extinción de muchas poblaciones de anfibios (LOTTERS *et al.*, 2009) y en el caso de los anfibios de Picos de Europa, el Sapo

partero (*Alytes obstetricans*) es especialmente sensible, al haberse detectado varios focos en el PN. Es necesario realizar una campaña de información dirigida tanto a los guardas del PNPE como a los visitantes del mismo para que extremen las precauciones. La forma más eficiente de luchar contra estas enfermedades es evitar su dispersión. Es necesario que todo el material de trabajo sea desinfectado si se va a emplear en varios humedales, asimismo se debe informar a los visitantes sobre la prohibición de capturar o mover animales o plantas dentro del parque. Hay que tener en cuenta que nosotros mismos, al entrar en los humedales podemos ser vectores involuntarios de transmisión de estos patógenos.

Aparte de las enfermedades emergentes, y tal como comentamos anteriormente, las poblaciones de alta montaña tienen un elevado riesgo de extinción local como consecuencia del cambio climático. Es necesario explicar mediante paneles o conferencias la extrema sensibilidad de los humedales de alta montaña y la necesidad de protegerlos, evitando en la medida de lo posible cualquier impacto negativo sobre las poblaciones de anfibios.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado gracias a la concesión del proyecto de referencia OAPN 38/2008 del programa de Investigación en la Red de Parques Nacionales. La Administración del PN de Picos de Europa facilitó los permisos de investigación necesarios y la guardería del PN colaboró en el desarrollo de algunas tareas, como la lectura de termómetros de registro continuo. Quisiéramos agradecer a Vanesa Rivera Girón y a Cristina García Fernández su asistencia en las labores de muestreo de campo y en el desarrollo de varios experimentos en el laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEAUMONT, M.A. & BALDING, D.J. 2004. Identifying adaptive genetic divergence among populations from genomes. *Molecular Ecology*, 13: 969-980.
- BEEBEE, T.J.C. & GRIFFITHS, R.A. 2005. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? *Biological Conservation*, 125: 271-285.
- BROWNE, R.K., SERATT, J., VANCE, C. & KOUBA, A. 2006. Hormonal priming, induction of ovulation and in-vitro fertilization of the endangered Wyoming toad (*Bufo baxteri*). *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4: 32-43.
- CAMERON, E., DAY, T. & ROWE, L. 2007. Sperm competition and the evolution of ejaculate composition. *American Naturalist*, 169: E158-E172.
- CAREY, C. & ALEXANDER, M.A. 2003. Climate change and amphibian declines: is there a link? *Diversity & Distributions*, 9: 111-121.
- COLOMA, L.A., DUELLMAN, W.E., ALMENDARIZ, A., RON, S.R., TERAN-VALDEZ, A., GUAYASAMIN, J.M. 2010. Five new (extinct?) species of *Atelopus* (Anura: Bufonidae) from Andean Colombia, Ecuador, and Peru. *Zootaxa*, 2574: 1-54.
- CUSHMAN, S.A. 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. *Biological Conservation* 128: 231-240.
- DAVIES, N.B. & HALLIDAY, T.R. 1977. Optimal mate selection in the toad *Bufo bufo*. *Nature*, 269: 56-58.
- DAVIES, N.B. & HALLIDAY, T.R. 1979. Competitive mate searching in male common toads, *Bufo bufo*. *Animal Behaviour*, 27: 1253-1267.
- DURÁN, J.J., ANDREO, B. & CARRASCO, F. 2006. Karst, cambio climático y aguas subterráneas. Serie Hidrogeología y Aguas Subterráneas n° 18. Instituto Geológico y Minero de España. 509 pp.
- EMLEN, S.T. & ORING, L.W. 1977. Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science* 197:215-223.
- FRANKHAM R. 1999. Quantitative genetics in conservation biology. *Genetical Research*, 74: 237-244.
- GOSNER, K.L., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16, 183-190.
- GREEN, D.M. 2003. The ecology of extinction: population fluctuation and decline in amphibians. *Biological Conservation*, 111: 331-343.
- HARPER, E.B., RITTENHOUSE, T.A.G. & SEMLITSCH, R.D. 2008. Demographic consequences of terrestrial habitat loss for pool breeding amphibians: predicting extinction risks associated with inadequate size of buffer zones. *Conservation Biology*, 22: 1205-1215.
- HETTYEY, A. & ROBERTS, J.D. 2006. Sperm traits of the quacking frog, *Crinia georgiana*: intra- and interpopulation variation in a species with a high risk of sperm competition. *Behavioural Ecology and Sociobiology*, 59: 389-396.
- JONES, A.G., ARGUELLO, J.R. & ARNOLD, S.J. 2004. Molecular Parentage Analysis in Experimental Newt Populations: The Response of Mating System Measures to Variation in the Operational Sex Ratio. *American Naturalist*, 164: 444-456.
- JUMP, A.S., HUNT, J.M., MARTÍNEZ-IZQUIERDO, J.A. & PEÑUELAS, J. 2006. Natural selection and climate change: temperature-linked spatial and temporal trends in gene frequency in *Fagus sylvatica*. *Molecular Ecology*, 15: 3469-3480.
- KOHLER, T., GIGER, M., HURNI, H., OTT, C., WIESMANN, U., VON DACH, S.W. & MASELLI, D. 2010. Mountains and Climate Change: A Global Concern. *Mountain Research and Development*, 30: 53-55.
- LEACH, B. & MONTGOMERIE, R. 2000. Sperm characteristics associated with different male reproductive tactics in bluegills (*Lepomis macrochirus*). *Behavioural Ecology and Sociobiology*, 49:31-37.

- LEVITAN, D.R. 2000. Sperm velocity and longevity trade off each other and influence fertilization in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Proc R Soc Lond. B*, 267:531–534.
- LOTTERS, S., KIELGAST, J., BIELBY, J., SCHMIDTLEIN, S., BOSCH, J., VEITH, M., WALKER, S.F., FISHER, M.C. & RODDER, D. 2009. The Link Between Rapid Enigmatic Amphibian Decline and the Globally Emerging Chytrid Fungus. *Ecohealth*, 6: 358-372.
- MÄKINEN, H.S., CANO, J.M. & MERILÄ, J. 2008. Identifying footprints of directional and balancing selection in marine and freshwater three-spine stickleback populations. *Molecular Ecology*, 17: 3565-3582
- MARSH, D.M. 2001. Fluctuations in amphibian populations: a meta-analysis. *Biological Conservation*, 101: 327-335.
- MATSUBA, C. & MERILÄ, J. 2009. Isolation and characterization of 145 polymorphic microsatellite loci for the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Ecology Resources*, 9: 1-8.
- MIAUD, C., OROMI, N., NAVARRO, S. & SANUY, D. 2011. Intra-specific variation in nitrate tolerance in tadpoles of the Natterjack toad. *Ecotoxicology*, 20: 1176-1183.
- MONTORI, A., GINER, G., BÉJAR, X. & ÁLVAREZ, D. 2011. Los episodios de descenso brusco de temperaturas y las nevadas tardías como causas de mortalidad de anfibios durante el periodo reproductor. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 22: 72-74.
- MORITZ, C. 1994. Defining “evolutionary significant units”. *Trends in Ecology and Evolution*, 9: 373-375.
- MORROW, E.H. & GAGE, M.J.G. 2001. Consistent significant variation between individual males in spermatozoal morphometry. *J Zool* 254: 147–153.
- PALSBOELL, P.J., BÉRUBÉ, M. & ALLENDORF, F. 2007. Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology and Evolution*, 22: 11-16.
- PARKER, G.A., BALL, M.A., STOCKLEY, P. & GAGE, M.J.G. 1996. Sperm competition games: individual assessment of sperm competition intensity by group spawners. *Proc R Soc Lond B*. 263:1291–1297.
- PHILIPS, S.J. & DUDIK, M. 2008. Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography*, 31: 161-175
- SCHMUTZER, A., GRAY, M., BURTON, E., & MILLER, D. 2008. Impacts of cattle on amphibian larvae and the aquatic environment. *Freshwater Biology*, 53: 2613-2625.
- SCHWARTZ, M.K., LUIKART, G. & WAPLES, R.S. 2007. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology and Evolution*, 22: 25-33.
- 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.
- TEJEDO, M. 1988. Fighting for females in the toad *Bufo calamita* is affected by the operational sex-ratio. *Animal Behaviour*, 36: 1765-1769.
- WELLS, K.D. 2007. *The ecology and behaviour of amphibians*. The University of Chicago Press. Ltd. London. 1149 pp.
- WHEAT, C.B. 2010. Rapidly developing functional genomics in ecological model systems via 454 transcriptome sequencing. *Genetica*, 138: 433–451.