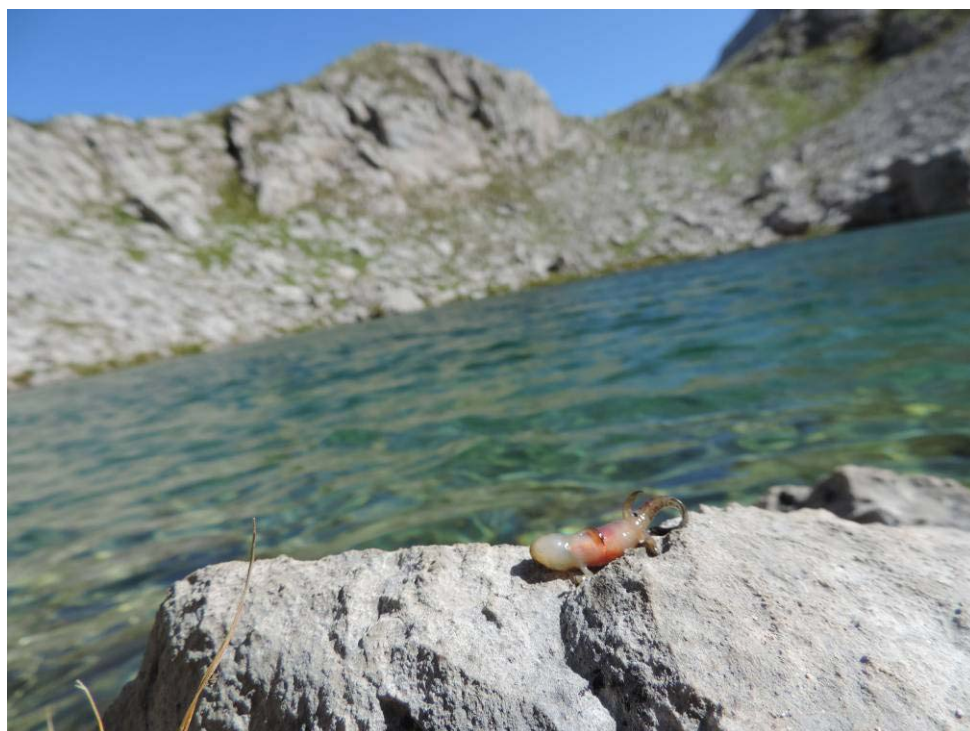


Evolución de las poblaciones en el tiempo

---

# Seguimiento Anfibios 2013-2014



## INFORME

Área de Conservación, Diciembre 2014

CONSORCIO INTERAUTONÓMICO



PARQUE NACIONAL DE LOS PICOS DE EUROPA

PICOS DE  
EUROPA  
PARQUE NACIONAL

- Autora informe:** Amparo Mora Cabello de Alba
- Fecha informe:** Diciembre, 2014
- Foto portada:** Larva de tritón alpino, muerta con síntomas de infección por ranavirus, en la laguna de Moñetas (Cabres, Asturias) (25/09/2014)
- Autores trabajo campo:** Han realizado los muestreos sobre el terreno en 2014 los siguientes miembros de la Guardería del Parque Nacional: Susana Marquínez, Manuel Díaz, Miguel A. Bermejo, César Obeso, Sergio Casares, Saturnino González, Félix Rojo, Rubén Varona, Iván Alonso, Amparo Mora, Sara González, José Luis Mosquera, Ángel Tejedor, Pedro A. Alonso, Julio M. Martínez, José Enrique Díez, Juan José Alonso, Ramón González y Marcelino Fernández.



INTRODUCCIÓN: ANTECEDENTES Y DISEÑO DEL SEGUIMIENTO .....	3
METODOLOGÍA .....	3
RESULTADOS.....	4
Esfuerzo de muestreo .....	4
Tendencias de las poblaciones.....	5
RANAVIRUS EN EL PARQUE NACIONAL DE LOS PICOS DE EUROPA: ESTADO DE LA CUESTIÓN .....	9
MEDIDAS DE MITIGACIÓN DE LOS EFECTOS DE LOS RANAVIRUS SOBRE LAS ESPECIES AFECTADAS .....	13
MODIFICACIONES PARA EL SEGUIMIENTO 2015.....	17
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18

**Anexo I:** Archivos TRIM para el análisis tendencias anfibios (2007-2014)

**Anexo II:** Artículo “Collapse of amphibian communities due to an introduced ranavirus” y resumen

**Anexo III:** Modelo de viabilidad de la población de *Alytes obstetricans* en Moñetas

**Anexo IV:** Calendario de muestreos 2015

## INTRODUCCIÓN

El método de seguimiento a largo plazo de anfibios que actualmente se lleva a cabo en el Parque fue diseñado en 2006 por Jaime Bosch, investigador del Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC, con ayuda del personal del Parque Nacional. Actualmente contamos con 8 temporadas de datos (2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013 y 2014).

Es necesario un mínimo de diez años en este tipo de seguimientos para obtener tendencias válidas en las poblaciones, ya sean de disminución, estabilidad o aumento en las mismas. Las grandes variaciones interanuales en la abundancia de individuos nos obligan a muestrear un número suficiente de años como para recoger toda esa variabilidad y ser capaces de extraer una tendencia global.

No obstante, el seguimiento de anfibios nos ha permitido a lo largo de todos estos años, en primer lugar, mejorar sensiblemente nuestro conocimiento sobre las distintas especies; en segundo lugar, detectar problemas evidentes como las mortalidades masivas ocurridas en Lloroza, que más tarde pudieron atribuirse a la acción de un virus propio de los anfibios y en tercer lugar, la detección de problemas no tan evidentes, como por ejemplo, la tendencia a la baja de la población de sapo común en el área de los Lagos.

## METODOLOGÍA

El modelo de seguimiento propuesto pretende sólo evaluar la evolución de las poblaciones en el tiempo, y en ningún caso proporcionar estimas exactas sobre abundancias absolutas de las especies. Por lo tanto, las técnicas de muestreo empleadas proporcionan sólo estimas de abundancia relativa.

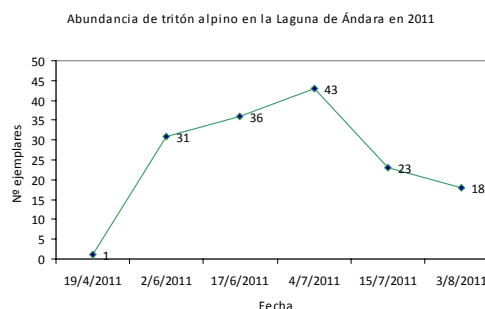
El objetivo principal de un seguimiento a largo plazo es detectar los problemas no evidentes

que puedan estar afectando a las poblaciones (ej. Enfermedades emergentes, efectos del cambio climático). Por otro lado, la repetición anual de los muestreos en las mismas localidades sirve para detectar otros impactos más evidentes y evitarlos (ej. Tomas de agua ilegales, pisoteo del ganado).

Para los anfibios, se realizan muestreos en 24 localidades, en algunos casos de forma simultánea para más de una especie (ver figura 1).

Se han elaborado unas claves de identificación rápida de las especies presentes para utilizar en los muestreos, con objeto de resolver las posibles dudas de identificación.

Para cada punto de muestreo y especie se realizan un número de visitas suficientes como para registrar un pico de abundancia máxima de la especie. (ver fig. 1).



**Fig. 1.** Registro del pico máximo de abundancia de una especie en una localidad a lo largo de la temporada de muestreo.

Los muestreos se efectuaron por parte de uno, dos o tres observadores como máximo y con la ayuda de un material sencillo (ficha de campo, linterna, prismáticos, manga de muestreo grande, manga de muestreo pequeña tipo acuario, botas de goma, cubos de plástico, termómetros, cámara fotográfica, claves y guías de identificación), distinto según las distintas localizaciones.

Los resultados de los muestreos se han analizado con el programa TRIM (Trends and Indices for Monitoring Data), que analiza las tendencias de las poblaciones en el tiempo y las clasifica en

distintas categorías: en aumento, en declive, estables o de evolución incierta. El programa ha sido desarrollado por Statistics Netherlands y se puede descargar de manera gratuita en la red. Como Anexo

I, se adjuntan los ficheros de texto sobre cada especie de anfibio muestreado, que se han elaborado a partir de los datos de campo, para su análisis con el programa TRIM.

## RESULTADOS

### → ESFUERZO DE MUESTREO

Se resume en la siguiente tabla el esfuerzo de muestreo empleado en términos de tiempo y personal para el Seguimiento de Anfibios desde 2007 hasta 2014 (ver fig. 3):

AÑO	Nº MUESTREOS	FECHAS	Nº PARTICIPANTES	Nº HORAS TRABAJO CAMPO
2007	111	13/04 – 17/09	28	123 h
2008	161	3/03 – 25/08	23	198 h
2009	158	13/03 – 25/08	22	175 h
2010	154	5/03 – 25/08	18	147 h
2011	174	23/02 – 28/09	22	198 h
2012	150	1/03 – 20/09	19	159 h
2013	124	25/03 – 20/09	19	130 h
2014	115	15/02 – 26/09	19	115 h



*Fig. 2. Esfuerzo de muestreo en términos de tiempo y personal (2007-2014). En la foto, Saturnino González, Guarda del Parque Nacional en la zona de Cantabria,*

Como puede observarse en la tabla, los muestreos se extienden desde finales de febrero hasta finales de septiembre, durante la primavera y el verano, aunque algunas especies como la rana bermeja comienzan su reproducción en cuanto se retira la nieve, lo cual en función del año puede suceder ya a partir de febrero. Las especies más tardías en cuanto a muestreos son el sapo partero común y el tritón alpino que se reproducen en localidades de alta montaña y concentran su período activo en muy poco tiempo, apenas cuatro meses, de junio a septiembre.

Se efectúan una media de 143 muestreos por año. En la mayoría de los casos, los muestreos ocupan una jornada entera de trabajo, sumando el tiempo que se tarda en acceder a la localidad y el tiempo invertido en realizar el recuento de la especie. De media, participan en los muestreos unas 21 personas cada año, todos ellos miembros de la Guardería del Parque Nacional, a los que se suma esporádicamente algún estudiante en prácticas. El número de horas invertido exclusivamente en los

muestreos (sin contar los desplazamientos) es de 155 horas al año, de media. Si tenemos en cuenta que cada muestreo consume una jornada de trabajo completa (7'5 horas), estaríamos hablando de un esfuerzo de muestreo de 155 jornadas invertidas al año, repartidas aproximadamente en 7 muestreos a lo largo de la temporada por cada uno de los participantes. Como puede deducirse, el trabajo en equipo, coordinando a un gran número de personas e intentando estandarizar al máximo la metodología y el nivel de conocimientos entre todos los participantes, es la clave para la obtención de unos buenos resultados.

Hay un grupo de personas que que mantienen el núcleo del trabajo, asumiendo la responsabilidad de una o más localidades y efectuando como poco cinco muestreos al año. Otro grupo de colaboradores les acompañan o complementan su trabajo, realizando muestreos esporádicos. La labor de todos suma y rinde valiosos datos.

## → TENDENCIAS DE LAS POBLACIONES

El programa TRIM analiza las tendencias de las poblaciones naturales y las clasifica en una serie de categorías en función de las variaciones en abundancia observadas de año a año (ver fig. 4).

TENDENCIA	SIGNIFICADO	CRITERIO
FUERTE AUMENTO	Aumento significativo de más del 5% por año (5% significaría doblar la abundancia en 15 años).	Límite más bajo del intervalo de confianza <1.05.
AUMENTO MODERADO	Aumento significativo, pero no significativamente de más del 5% por año.	Valor más bajo del intervalo de confianza entre 1.00 y 1.05.
ESTABLE	No hay aumento ni descenso significativo, y es seguro que las tendencias de cambio son de menos del 5% al año.	El intervalo de confianza se encuentra entre 0.95 y 1.05.
INCIERTA	No hay aumento ni descenso significativos, pero no hay certeza de que las tendencias de cambio sean inferiores al 5% por año.	El límite más bajo del intervalo de confianza es <0.95 y el límite superior es >1.05.
DESCENSO MODERADO	Descenso significativo, pero no significativamente mayor del 5% al año.	El límite superior del intervalo de confianza está entre 0.95 y 1.00.
DESCENSO ABRUPTO	Descenso significativamente superior al 5% al año (un 5% significaría reducir la abundancia de la población a la mitad en 15 años).	El límite superior del intervalo de confianza es <0.95.

Fig. 3. Categorías en las que clasifica el Programa TRIM las tendencias de las poblaciones.

Una vez realizados los análisis con el programa TRIM sobre todos los datos de campo obtenidos entre 2007 y 2014 para las distintas especies en cada localidad, hemos obtenido los siguientes resultados (ver fig. 4):

ESPECIE	CÓD.	POBLACIÓN	TENDENCIA POBLACIONAL
<i>Chioglossa lusitanica</i>	1	Riega La Guxana	INCIERTA
	2	Cueva Covadonga	INCIERTA
<i>Salamandra salamandra</i>	1	Ctra. Lagos	INCIERTA
	2	Pozu LLau	INCIERTA
	5	Ctra. Pontón-Oseja	INCIERTA
<i>Mesotriton alpestris</i>	1	Llago Bajero	FUERTE AUMENTO
	2	Vau los Lobos	AUMENTO MODERADO
	3	Lago Ándara	FUERTE AUMENTO
	4	Charca del Pontón	INCIERTA
	5	La Güelga	INCIERTA
	6	Charcas de Cable	INCIERTA
	7	Pozo Moñetas	INCIERTA
	8	Lloroza	FUERTE AUMENTO

ESPECIE	CÓD.	POBLACIÓN	TENDENCIA POBLACIONAL
<i>Lissotriton helveticus</i>	1	Vau los Lobos	INCIERTA
	2	Charca del Pontón	ESTABLE
	3	La Güelga	DECLIVE AGUDO
	4	Charcas de Cable	FUERTE AUMENTO
<i>Triturus marmoratus</i>	1	Embalse Enterrías	INCIERTA
	2	Presa Dobarganes	INCIERTA
	3	Charca del Corvera	DECLIVE AGUDO
	4	Pilón Colio-Los Pandos	FUERTE AUMENTO ó INCIERTA
	5	Pilón Cruce de Llés	FUERTE AUMENTO
<i>Alytes obstetricans</i>	1	Llago Bajero	AUMENTO MODERADO
	2	Lloroza	DECLIVE AGUDO
	3	Moñetas	DECLIVE AGUDO
	4	Pozu Llau	DECLIVE AGUDO
<i>Bufo bufo</i>	1	Ctra. Covadonga	DECLIVE AGUDO
	2	Ctra. Pontón-Oseja	DECLIVE AGUDO
	3	Lago Ercina (puestas)	DECLIVE AGUDO
	4	Lago Ercina (adultos)	DECLIVE AGUDO
<i>Rana iberica</i>	1	Riega La Guxana	FUERTE AUMENTO
	2	Riega Allende-Cabañes	FUERTE AUMENTO
<i>Rana temporaria</i>	1	Charca Pandecarmen	INCIERTA
	2	Charca Salambre	FUERTE AUMENTO
	3	Charcas de Cable	FUERTE AUMENTO
	4	Pozu Llau	FUERTE AUMENTO

Fig. 4. Tendencias de las poblaciones estudiadas entre 2007 y 2014, tras efectuar el análisis de los datos del Seguimiento con el programa TRIM.

Hemos de comentar algunos aspectos observados:

- ***Chioglossa lusitanica***: Sigue con una tendencia INCIERTA, sin aumentos ni descensos significativos. Esto es una buena noticia, porque significa que las poblaciones de esta especie, muy frágil por su escasez y por estar muy ligada a medios concretos, no han sufrido impactos notables en estos años. Sería interesante realizar una búsqueda dirigida, seleccionando con ayuda de un GIS áreas de la vertiente norte de Picos con roca

base ácida y por debajo de una determinada altitud, para intentar determinar la distribución de *Chioglossa* a una escala de cuadrícula UTM de 1x1 km en las zonas bajas del Parque y zonas colindantes al límite. Se podría solicitar la ayuda de voluntarios de la Asociación Herpetológica Española para realizar estas búsquedas. Los meses más apropiados serían de mayo a octubre.

- ***Salamandra salamandra***: Mantiene su tendencia INCIERTA, sin aumentos ni descensos significativos.

- **Mesotriton alpestris:** Llama la atención una cierta tendencia de aumento en varias localidades, incluidas Lloroza y el Lago de Ándara, donde tenemos confirmada la presencia de ranavirus.

En el caso concreto de Lloroza, obtenemos una tendencia de FUERTE AUMENTO, que no sabemos si es artificio del análisis, si puede tratarse de una ventaja competitiva por el desplome del sapo partero en el lago u otras causas.

Deberíamos incluir como punto de seguimiento del tritón alpino el Lago Ercina, donde se sospecha que sus efectivos han disminuido notablemente en los últimos 20 años. La presencia de ranavirus está confirmada en el lago y también la predación por parte de cangrejos, aunque esto último no está cuantificado.

- **Lissotriton helveticus:** Se mantiene en todas las localidades, pero llama la atención la tendencia de declive agudo observada en La Güelga. Sería interesante mejorar el seguimiento en este punto regularizando las visitas cada 10 días y analizar muestras para confirmar si el ranavirus también está presente allí. Sería también útil la construcción de un pequeño vallado que impida que las vacas se metan en la poza de mayor tamaño.

- **Triturus marmoratus:** En cuanto al tritón jaspeado, se observan tendencias inciertas o de aumento en todos los puntos excepto en la Charca del Corvera, donde se aprecia una tendencia de Declive Agudo.

En esta localidad habría que mejorar el seguimiento, adelantándolo en el tiempo cuando el año sea cálido y vigilando el enclave ya desde el mes de marzo. Igual que en el caso de La Güelga, es importante regularizar las visitas cada 10 días.

Sería interesante buscar más puntos de presencia de tritón jaspeado en la zona del



Fig. 5. Larva de tritón alpino en la laguna de Moñetas.

Puede que la charca deje de ser un hábitat adecuado para el tritón jaspeado por falta de agua, por competencia con otras especies o por cualquier otra causa y que hayan migrado para hacer su reproducción a otro punto cercano.

- **Alytes obstetricans:** El caso del sapo partero común es preocupante ya que a excepción del Lago Bajero, donde se observa un aumento moderado, en las localidades afectadas por la rama del ranavirus CMTV (Price et al, 2014) que son Lloroza y Moñetas, se encuentra en situación de DECLIVE AGUDO.

Es de destacar que en Ándara, afectada por la rama FV3 del ranavirus (Price et al, 2014), la especie no parece estar tan afectada, ya que presenta buenas abundancias (máximo de 1650 larvas en 2014).

El sapo partero parece la especie más afectada por los ranavirus, siendo también la que tiene un período larvario (acuático) más dilatado. Existen muchas otras localidades en el Parque con presencia de *Alytes* y en los que no se han detectado mortalidades.

¿Qué medidas podrían tomarse en las localidades afectadas por ranavirus del tipo CMTV, para evitar la desaparición en las mismas de las poblaciones de sapo partero? ¿Cuánto tardarán en desaparecer las poblaciones? ¿Es probable que se recolonizen a partir de otras poblaciones cercanas? ¿Sería de alguna utilidad el



reforzamiento de las poblaciones? ¿Sería de utilidad recoger datos para elaborar un modelo de viabilidad de las poblaciones (PVA)? Se discuten las medidas que se han considerado más oportunas en el siguiente apartado del informe.

- **Bufo bufo:** El caso de Bufo bufo también resulta preocupante puesto que en las tres localidades donde se hace seguimiento de esta especie, la tendencia es de Declive Agudo.

En el lago Ercina tenemos constancia de la presencia de ranavirus. Sería necesario analizar muestras también de la Carretera de los Lagos y de la Carretera Pontón-Oseja para determinar si la infección por ranavirus también está presente en estos puntos.

En el caso concreto del Lago Ercina se proponen una serie de medidas en el siguiente apartado del informe, que pueden contribuir a mejorar las condiciones de los anfibios en el Lago y a limitar el contagio de la enfermedad a otras áreas.

Sería necesario comprobar cuál pueda ser la distribución real de la enfermedad, para valorar su afeción al conjunto de la especie en la zona.

- **Rana iberica:** Con respecto a esta especie, en las dos localidades en las que se efectúa seguimiento, la tendencia observada es de FUERTE AUMENTO.

Si limitamos el análisis a los años de 2010 en adelante, la tendencia resulta INCIERTA. Parece que resulta más prudente descartar los primeros tres años de datos, ya que se trata de una especie de difícil detección. La experiencia acumulada de los observadores ha ido mejorando sensiblemente los resultados del seguimiento.



Fig. 6. Rana bermeja en los alrededores de la Vega de Comeya.

ecto a esta especie tan escasa, al igual que con *Chioglossa lusitanica*, sería interesante realizar una búsqueda dirigida, seleccionando con ayuda de un GIS áreas de la vertiente norte de Picos con roca base ácida y por debajo de una determinada altitud, para intentar determinar su distribución a una escala de cuadrícula UTM de 1x1 km en las zonas bajas del Parque y zonas colindantes al límite. Se podría solicitar la ayuda de voluntarios de la Asociación Herpetológica Española para realizar estas búsquedas. Los meses más apropiados serían de mayo a octubre. Las búsquedas pueden ser conjuntas para *Chioglossa lusitanica* y *Rana iberica*, que parecen compartir hábitat en nuestra región.

- **Rana temporaria:** En esta especie parece no haber tendencias preocupantes. Todas las localidades presentan una tendencia de FUERTE AUMENTO, excepto Pandecarmen, con tendencia INCIERTA.

## RANAVIRUS EN EL PARQUE NACIONAL DE LOS PICOS DE EUROPA: ESTADO DE LA CUESTIÓN

En noviembre de 2014, se ha publicado el artículo “*Collapse of amphibian communities due to an introduced Ranavirus*” en la revista *Current Biology* (Price et al. Collapse of amphibian communities due to an introduced Ranavirus, *Current Biology* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.028>). El artículo utiliza como datos de base los recogidos en el Parque Nacional desde 2005 y especialmente desde que se puso en marcha el seguimiento de anfibios en 2007.

El autor principal es Stephen J. Price (Institute of Zoology, Zoological Society of London) que realizó trabajo de campo en Picos, llevó a cabo los análisis moleculares y filogenéticos y preparó el manuscrito. Trenton W.J. Garner (Zoological Society of London), preparó junto con Stephen J. Price el manuscrito. Richard A. Nichols (School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary University of London) y François Balloux (UCL Genetics Institute, University College London), asesoraron en cuanto a los análisis filogenéticos y su interpretación. César Ayres (Asociación Herpetológica Española) llevó a cabo el trabajo de campo y la organización de los datos en Galicia. Amparo Mora (Parque Nacional Picos de Europa) realizó trabajos de campo y coordinó la recogida de datos en el Parque Nacional Picos de Europa. Jaime Bosch (Museo Nacional Ciencias Naturales), llevó a cabo trabajos de campo en Picos de Europa y analizó el conjunto de los datos sobre poblaciones de Galicia y Picos de Europa. El manuscrito fue editado por todos los autores.

*Current Biology* es una revista de divulgación científica general de alto impacto. La publicación implica que la información que se aporta es de interés para toda la comunidad científica y no sólo para ecólogos o especialistas en medio ambiente. Además, es la primera vez que se


documenta un caso de un patógeno emergente que afecta a toda la comunidad y no sólo a especies puntuales. Es decir, que tiene la capacidad de evadir la inmunidad en nuevos hospedadores múltiples y diversos.

La publicación ha tenido un gran impacto global, habiéndose difundido ampliamente por los medios de comunicación principales (prensa, radio y televisión) y en las redes sociales, apareciendo por ejemplo en BBC News, New Scientist, El País, Science y Examiner.com. A nivel nacional, se han publicado artículos en El País y en La Vanguardia y una reseña en la revista Quercus; y a nivel local, artículos de prensa en La Nueva España y El Comercio.

La puntuación alcanzada en el Altmetric Score (que mide la cantidad y calidad de la atención online recibida por el artículo) ha sido de 169, lo cual ha situado al artículo en el top del 5% de los artículos que han recibido mayor atención entre todos los artículos publicados en distintas revistas (2.722.833 artículos). La medición se realizó a fecha 3 de noviembre, cuando se citó por última vez al artículo. Comparado con el resto de artículos publicados por *Current Biology*, el artículo ha obtenido muy buena puntuación, situándose por encima del 97% de los artículos.

Cell
Return to article

Article level metrics



169

**Score in context**

Puts article in the top 5% of all articles ranked by attention

Very good compared to other articles of same age & journal (94th percentile)

Very good compared to articles of the same age (99th percentile)

**Mentioned by**

- 17 news outlets
- 1 blog
- 36 tweeters
- 6 Facebook users
- 1 Reblister

**Readers on**

- 0 Mendeley
- 0 CiteULike

**Track this article**

- Get email updates when this article is shared

So far Altmetric has seen 17 stories from 17 outlets.

News
Blogs
Twitter
Facebook
Reddit
Score
Demographics
Help

**NewScientist**

[Spanish amphibians struck down by virus attack](#)

New Scientist

A study of circulating ranaviruses reveals they have devastated amphibian populations in a Spanish national park ...

2014-10-16T16:00:00-00:00

**Amphibian communities collapse in wake of viral outbreak**

Phys.org

Two closely related viruses that have been introduced to northern Spain in recent years have already led to the collapse of the ...

2014-10-16T16:00:03-00:00

**cosinc**

[Los virus de los anfibios aportan claves sobre el contagio entre especies](#)

SINC - Servicio de Información y Noticias Científicas

Un equipo internacional de investigadores, liderado por el Museo Nacional de Ciencias Naturales, ha estudiado los efectos de un ...

2014-10-16T16:00:00-00:00

**USA NEWS**

[Spanish amphibians struck down by virus attack](#)

Daily News

As if one plague wasn't sufficient, the dreaded chytrid fungus is already sweeping by means of the world's amphibians. Now, to add ...

2014-10-16T09:33:03+00:00

**Science NOW**

[Deadly virus striking European amphibians](#)

Science/AAAS

Populations of frogs, toads, salamanders, and newts hit hard by virus ...

2014-10-16T16:15:00-00:00

**EL PAÍS**

[Dos virus extinguen poblaciones de anfibios en el norte de España](#)

El País

Los patógenos, capaces de infectar a varias especies a la vez, ponen al borde del colapso a tritones, ranos y sapos en el Parque ...

2014-10-16T16:24:26+00:00

**Science Daily**

[Amphibian communities collapse in wake of viral outbreak](#)

Science Daily

Two closely related viruses that have been introduced to northern Spain in recent years have already led to the collapse of the ...

2014-10-16T16:35:28+00:00

**NEWS WORLD NEWS**

[Spanish Frogs' Lot Worsens With Emergence of Deadly Viruses](#)

News World News

It just got a lot worse to be a frog living in Spain right now. Spanish frog species already combating the same deadly chytrid f ...

2014-10-16T21:09:55-00:00

**BBC NEWS**

[New disease 'killing amphibians'](#)

BBC News

A deadly new disease has emerged in Spain that is wiping out amphibians, scientists report. ...

2014-10-16T23:47:06+00:00

**LA VANGUARDIA**

[Un virus invasor provoca la muerte masiva de anfibios en el norte de España](#)

La Vanguardia

Barcelona (Redacción) - La muerte masiva de anfibios detectada por primera vez en el 2005 en un estanque de la vertiente cantabra ...

2014-10-17T08:28:00+00:00

**HELSINKI SANOMAT**

[Virus tappaa liskot ja sammakot - leviämässä jo matelijoihin](#)

Helsingin Sanomat

Hirako

Atti fielik, ha az j virusok toibb haladnak, pusztit hatssal lehetnek a mi eleve sikeny kiffajokra. ...

2014-10-17T08:30:00+00:00

**HINDON**

[New Virus Killing Off Amphibians, Jumping Between Species \(PHOTOS\)](#)

Headlines & Global News

A new virus, with graphic symptoms, is killing off the already low amphibian population ...

2014-10-17T16:05:15+00:00

**DIE WELT**

[Viren: Nordspanien erlebt Massensterben von Amphibien](#)

Die Welt

Frosche, Kröten und Salamander werden derzeit in Nordspanien in Massen tot gefunden. Forscher vermuten, dass ein Virus ein einzige ...

2014-10-17T16:49:54+00:00

**SCIENCE WORLD REPORT**

[Amphibian Species are Collapsing in Spain Due to Deadly Virus](#)

Science World Report

Scientists have found that two closely related viruses that have been introduced to northern Spain in recent years may have led ...

2014-10-17T11:25:24+00:00

**TheScientist**

[Virus Decimating Spanish Amphibians](#)

The Scientist Magazine

Several toad, newt, and salamander populations are being hit hard by an emerging pathogen in a pristine national park in Spain ...

2014-10-20T13:24:00+00:00

**DIGITAL JOURNAL**

[Deadly virus is killing frogs throughout Spain](#)

Digital Journal

Several frog, toad, newt, and salamander populations are being attacked by an emerging pathogen in a major national park in Spain ...

2014-10-25T11:59:28+00:00

Se incluye como Anexo II una copia del artículo y una traducción del resumen.

En cuanto al contenido que el artículo nos aporta como datos para la gestión, se confirma la presencia de ranavirus en el Parque, mediante análisis moleculares, en cuatro localidades: Áliva, Ercina, Lloroza y Moñetas. Durante los seguimientos anuales, se han encontrado individuos muertos o moribundos adultos, juveniles o larvas de las seis especies de anfibios presentes en estas localidades (*Bufo bufo*, *Alytes obstetricans*, *Mesotriton alpestris*, *Rana temporaria*, *Lissotriton helveticus* y *Salamandra salamandra*). Los animales enfermos y muertos presentaban lesiones en la piel, hemorragias internas y necrosis severa de los miembros, todos signos típicos de una ranavirosis letal.

También se analizó la posible presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis*, un hongo patógeno, en ocho localidades del Parque Nacional. Resultó estar presente en dos de ellas: La Güelga, donde no se ha observado enfermedad ni mortalidad y que resultó negativo para ranavirus y; la balsa artificial de Áliva en 2005 en baja prevalencia.

La amplificación de una suite de loci de ranavirus de tres de las especies hospedadoras muestreadas en el Parque Nacional permitió realizar un análisis de los tipos de ranavirus presentes y sus relaciones filogenéticas. Todos ellos estaban relacionados o eran casi idénticos al genoma del CMTV (Common Midwife Toad Virus), que había sido originalmente aislado de un animal enfermo muestreado en 2008 en el PNPE. Las muestras procedentes de Áliva y Moñetas eran casi idénticas al virus aislado en 2008 (que se aisló en esa zona). Las muestras procedentes del lago de Ándara resultaron pertenecer a un clado hermano del CMTV, el FV3 (frog virus 3). Los ranavirus del tipo FV3 sólo han sido relacionados con descensos en las poblaciones en poblaciones de *Rana temporaria* del Reino Unido, pareciendo que no pudieran afectar significativamente a otras especies nativas. Efectivamente, en Ándara causaron morbilidad sin lesiones en *Alytes obstetricans*, pero sin evidencias de mortalidades en masa o de declives de la población.

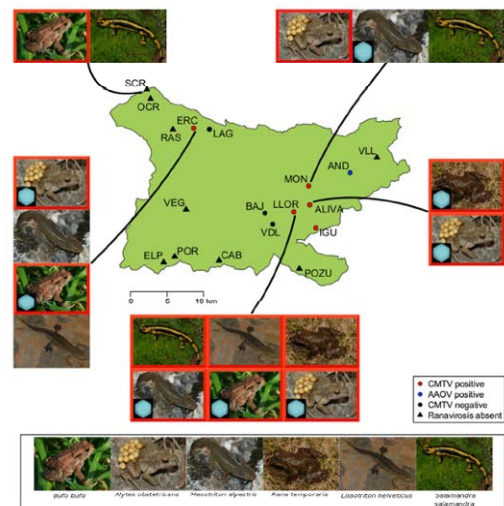


Fig. 7. En rojo, las localidades afectadas por ranavirus en el P.N. Marcadas con un hexágono las especies afectadas.

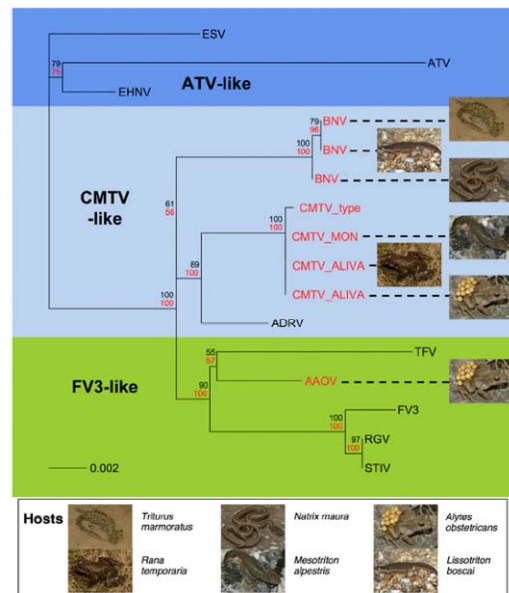


Fig. 8. Árbol filogenético resultante del análisis de muestras de individuos afectados por ranavirus en el P.N. Picos de Europa.

Las poblaciones de especies hospedadoras en comunidades con ranavirosis en el PNPE han experimentado declives estadísticamente significativos y persistentes. Los primeros registros de mortalidad en masa y ranavirosis en la región corresponden a la balsa artificial de Áliva en 2005 y a una zona encharcada al lado de la pista en las Minas de Áliva, ambos muestreados en 2005.

La especie más afectada ha sido el sapo partero común, *Alytes obstetricans*. Los tritones alpinos y los sapos comunes también han

experimentado descensos significativos en las localidades infectadas.

Se sabe que la infección y la frecuencia de la enfermedad disminuyen cuando aumenta la riqueza específica de la comunidad de hospedadores. Esto es así porque las comunidades de hospedadores diversas presentan un rango de barreras a la infección, y porque son raras las estrategias universales de los patógenos para superar las barreras de los hospedadores. Consecuentemente con lo anterior, los patógenos típicamente exhiben una variación significativa en su habilidad para infectar y causar enfermedad entre diferentes especies hospedadoras y deben evolucionar nuevos rasgos para poder explotar un abanico más amplio de hospedadores. Es por tanto inusual para un patógeno emergente explotar un amplio rango de hospedadores y extremadamente raro para especies hospedadoras múltiples, el sufrir mortalidad en masa a la vez y declives cuando la infección emerge, que es lo que está ocurriendo en el PNPE.

En los lugares afectados por ranavirus del tipo CMTV están ocurriendo declives de las poblaciones de *Alytes obstetricans* y de *Bufo bufo* sin señales de recuperación después de seis años y en algunas localidades, las poblaciones están al borde de la extinción. Estas pequeñas poblaciones relictas que han sufrido declives, son muy vulnerables a eventos estocásticos.

Este mismo patrón sin recuperación ha sido observado en las poblaciones de *Rana temporaria* que experimentan una ranavirrosis persistente en el Reino Unido, donde se mantuvieron descensos del 83% de las poblaciones de rana hospedadoras durante varias generaciones (Teacher et al, 2010). La selección que imponen las altas tasas de mortalidad a causa de los ranavirus sobre las poblaciones hospedadoras, se supone que favorecerá los genotipos capaces de resistir o de tolerar la infección. Las poblaciones de rana del Reino Unido afectadas por ranavirus exhiben la huella genética de una selección direccional en loci inmunocompetentes (Teacher et al, 2009 y 2010). Sin embargo, esta selección genética no se ha acompañado de una recuperación demográfica.

En el siguiente apartado del informe se proponen medidas para, en la medida de lo posible, paliar el efecto de los ranavirus sobre las poblaciones de anfibios del Parque y para limitar su contagio por vía humana a otras localidades.

## MEDIDAS DE MITIGACIÓN DE LOS EFECTOS DE LOS RANAVIRUS SOBRE LAS ESPECIES AFECTADAS

Han transcurrido casi diez años desde que se observó la primera mortalidad en masa de anfibios en el Parque Nacional, que posteriormente se ha confirmado como una ranaviriosis mediante análisis moleculares. En estos diez años de trabajo se ha puesto en marcha un plan de seguimiento de los anfibios en el Parque Nacional, se ha determinado la distribución en cuadrículas UTM de 1x1 km de las distintas especies y se ha seguido la evolución de la enfermedad en las localidades infectadas. Una vez que se ha constatado el descenso acusado de ciertas poblaciones, rozando casi la extinción y se ha relacionado directamente con la afección por ranavirus, procede tomar medidas activas que mitiguen el efecto de los mismos, eviten los contagios a otras localidades en la medida de lo posible e intenten mantener las poblaciones afectadas en el tiempo con objeto de: dar lugar al desarrollo de la inmunidad natural contra esta enfermedad en las poblaciones y de, dar tiempo a la investigación y el desarrollo de nuevas medidas de mitigación hoy por hoy no testadas.

A continuación se proponen las medidas que se consideran más adecuadas, una justificación de las mismas y su presupuesto estimado:

### MEDIDA 1. ANÁLISIS DE LA DIVERGENCIA GENÉTICA ENTRE POBLACIONES DE ALYTES OBSTETRICANS, SAPO PARTERO COMÚN, EN EL PARQUE NACIONAL.

**Justificación:** Tras la realización con el programa Stella 10.0.6 (utilizado para el análisis dinámico de sistemas) de un modelo básico de viabilidad de población del sapo partero en la localidad de Moñetas (se añade Anexo III sobre el diseño del modelo, sus ecuaciones y ensayos), partiendo de valores observados (Nº larvas en 2014: 400 aprox.) o extraídos de la bibliografía (Nº medio huevos/puesta: 65, 1 puesta anual, edad estimada para los adultos: 7 años, años de estadio juvenil: 2) y mortalidades estimadas (25% huevos, 90% larvas, 40% juveniles, 20% adultos), obtenemos un desplome de la población en aprox. 6 años,

quedando en niveles muy bajos, cercanos a la extinción, es decir, el caso que observamos hoy en día en la realidad.

Si en el mismo modelo, incluimos una introducción de 100 adultos al año (lo lógico es introducir adultos, ya que éstos son mucho menos sensibles al ranavirus que las larvas), la población se estabiliza a los 7 años pero con 700 adultos, 21000 juveniles y 19000 larvas, unas cifras muy aceptables. Lo importante a retener del modelo no son las cifras exactas, sino las tendencias que se observan. La dinámica de la población puede resistir hasta un 90% de mortalidad de las larvas a causa de la enfermedad, si somos capaces de reponer parcialmente el stock de adultos cada año. Esto sería viable retranslocando adultos de *Alytes* de otras localidades del Parque no infectadas por el virus. Pero el paso previo a cualquier retranslocación es un estudio de las diferencias genéticas que existen entre poblaciones para determinar la conveniencia de unir determinados núcleos de población con otros. El planteamiento lógico sería analizar el parentesco entre las localidades infectadas y las más próximas geográficamente.

**Presupuesto:** Se calcula que deberían analizarse unas 25 poblaciones y de cada una de ellas extraer 20 muestras. De cada muestra se analizan una serie de microsatélites. Se estiman necesarios unos 3 análisis por muestra, siendo el coste de cada análisis de unos 12 €. En total, los gastos ascenderían a 18.000 € de costes de laboratorio, más el gasto de personal, otros gastos indirectos e impuestos, llegaríamos a la cantidad máxima de un contrato menor, **24.000 €**.

### MEDIDA 2. INSTALACIÓN DE UNA SENDA PERIFÉRICA ACOTADA EN EL LAGO ERCINA.

**Justificación:** Esta medida pretende evitar que el gran flujo de turistas que pasean alrededor del Lago Ercina, puedan contribuir a expandir el ranavirus entre localidades. El contagio a través del sedimento que queda retenido en los zapatos tiene bajas probabilidades, pero existe. Hay un gran número de



*Fig. 9. En negro, el posible trazado de la senda acotada alrededor del Lago Ercina.*

turistas que visitan los Lagos y en días posteriores se mueven hasta la localidad de Fuente Dé y suben en el teleférico, o hasta otras localidades. Se trata de evitar que los turistas se acerquen a la orilla y al sedimento húmedo.

Además de impedir contagios de ranavirus, la medida contribuirá a evitar en un gran porcentaje la erosión de las orillas del lago, que contribuye a su eutrofización.

Esta medida, que facilitaría el paseo alrededor del lago Ercina, trazando un recorrido definido y libre de obstáculos (se propone la instalación de pequeñas pasarelas en los puntos del recorrido que están siempre inundados) junto con la instalación de carteles informativos, de puntos de observación y la realización de una campaña divulgativa sobre los valores ecológicos de los Lagos, puede contribuir a mejorar de un modo sustancial la calidad de la visita.

Hay que recordar que los lagos de Covadonga son uno de los principales atractivos turísticos de la región, que se recibieron en ellos más de medio millón de visitantes en 2013 (577.331 visitantes) y que los días punta de agosto con el máximo de visitantes pueden acumular un flujo de hasta más de 3.000 personas al día. Por tanto, las medidas que se focalicen en esta localidad tendrán

un gran impacto de cara al público y al negocio turístico, que hay que valorar, intentando aunar criterios de conservación con criterios de mejora de la calidad turística.

**Presupuesto:** Se trataría de señalar o marcar la senda alrededor del Lago Ercina, en un recorrido alejado unos 15 metros de la orilla, que tendría una longitud total aproximada de 1985 m. Se propone marcar con pequeñas estacas que asomen del suelo unos 30 cm y se coloquen a cada lado de la senda cada 1,5 metros (2.647 postes 50cm). Además haría falta desbrozar en la orilla NE el paso a través de unos 200 m de tojo (*Ulex* sp.) e instalar tres pequeñas pasarelas de 3 m máximo sobre tres puntos en concreto donde no es posible pasar sin pisar zonas encharcadas. Se estima un presupuesto aproximado de unos 35.000 € para esta medida.

### **MEDIDA 3. ESTUDIO LIMNOLÓGICO DE LOS MEDIOS AFECTADOS POR RANAVIRUS.**

**Justificación:** En los lagos y lagunas afectados por ranavirus, se están dando procesos acusados de cambios en el ecosistema. Están desapareciendo casi por completo las larvas de sapo partero, que se alimentan de carroña, materia vegetal e invertebrados acuáticos y que, a su vez, son consumidas por larvas de libélula, adultos y larvas de anfibios y escarabajos acuáticos. Estas alteraciones en la cadena trófica junto con los posibles cambios a largo plazo debidos al calentamiento climático, son dignos de seguir en el tiempo mediante una serie de parámetros limnológicos: hidrología y tasa de renovación, transparencia del agua, temperatura del agua, cubierta de hielo invernal, oxígeno disuelto, iones mayoritarios, conductividad, alcalinidad y pH, nutrientes, clorofila a, biota (bacterias, fitoplancton, fitobentos, zooplancton, zoobentos, macrófitos, invertebrados).

Se plantea la contratación de una asistencia externa de carácter científico que diseñe el tipo de seguimiento limnológico adecuado a nuestra problemática y nuestros medios y que lo ponga en marcha durante una temporada, posibilitando que

se continúe en el futuro con medios propios del Parque Nacional.

**Presupuesto:** Se plantea un gasto inicial de unos **10.000 €** para el diseño y puesta en marcha de esta medida.

**MEDIDA 4. INSTALACIÓN DE SEÑALES DISUASORIAS EN LOS LUGARES AFECTADOS POR LA ENFERMEDAD PARA PREVENIR EL CONTAGIO ENTRE ANFIBIOS DE DISTINTAS LOCALIDADES.**

**Justificación:** Las localidades actualmente afectadas por ranavirus tienen una alta frecuencia de visitas por parte de turistas y montañeros que pasean por sus orillas y en ocasiones incluso se bañan. La instalación de pequeños carteles disuasorios de tocar el agua y acercarse a las orillas tiene como objetivo intentar disminuir las probabilidades de contagiar el ranavirus a otras localidades y por otro lado, prevenir la contaminación de las aguas con bronceadores, detergentes u otros.

Se propone el siguiente texto: "Lago afectado por ranavirus. Por favor, no pisar las orillas ni tocar el agua, podría propiciarse el contagio de otros anfibios. Gracias por su colaboración." Se podría incluir un enlace a la web de Parques Nacionales donde ampliar la información del cartel.

**Presupuesto:** Se calcula un presupuesto de unos 500 € para 10 carteles impresos en vinilo sobre placa de aluminio de 60x40 cm. La instalación de los carteles puede hacerse con personal propio.

**MEDIDA 5. ESTUDIO DE LAS DENSIDADES DEL CANGREJO EN EL LAGO ERCINA Y ANÁLISIS DE SU IMPACTO SOBRE LAS COMUNIDADES DE ANFIBIOS. ANÁLISIS DE SU POSIBLE PAPEL COMO VECTOR DE RANAVIRUS.**

**Justificación:** El cangrejo de río autóctono (*Austroptamobius pallipes*) fue introducido en el Lago Enol en el año 1919, hace 95 años. Por tanto, a pesar de su nombre común, no forma parte de la comunidad natural del ecosistema de los Lagos sino que es una especie introducida. En 1999, desapareció del lago Enol y de la Vega de Comeya,



**Fig. 10.** Cangrejos de río autóctono (*Austroptamobius pallipes*) en Orandi.

donde el lago vierte sus aguas. Se achaca esta desaparición a la afanomicosis, aunque en análisis posteriores del agua, no se detectó el hongo.

Se sospecha que existen altas densidades de cangrejo en el Lago Ercina por las amputaciones observadas en numerosos individuos de distintas especies de anfibios. Asimismo, se sospecha que se ha producido una disminución del número de tritones alpinos en el Lago, que se observaban con mayor facilidad hace algunos años.

También es posible que el cangrejo esté actuando como vector del ranavirus en el Lago Ercina, contribuyendo de este modo a amplificar el efecto de la enfermedad.

Por todas estas causas, conviene estimar la densidad de cangrejo en el lago Ercina y su afección sobre los anfibios, de cara a elaborar un plan de translocación de los ejemplares a otras localidades o de control de sus densidades.

**Presupuesto:** Se plantea un gasto inicial de 8.000 € para contratar una asistencia técnica que realice una serie de campañas en el lago Ercina de muestreo mediante nasas y una serie de análisis de laboratorio para testar la presencia de ranavirus en ejemplares de cangrejo.

**MEDIDA 6. CAMPAÑA DE INFORMACIÓN AL PÚBLICO SOBRE RANAVIRUS EN EL PARQUE NACIONAL.**

**Justificación:** Se considera imprescindible la implicación del público en estas medidas de mitigación del ranavirus, ya que afectan a localidades



con un alto número de visitas. Asimismo, el reporte de información sobre anfibios con síntomas de la enfermedad por parte de turistas, montañeros, naturalistas, etc., puede resultar muy valioso para localizar nuevos focos de infección.

Se propone elaborar un paquete de información sencilla para colgar en la página web de Parques Nacionales, la elaboración e impresión de un folleto-guía interpretativo de visita del Lago Ercina, elaboración de un panel sobre el ecosistema del lago Ercina a colocar sobre el soporte existente en la orilla

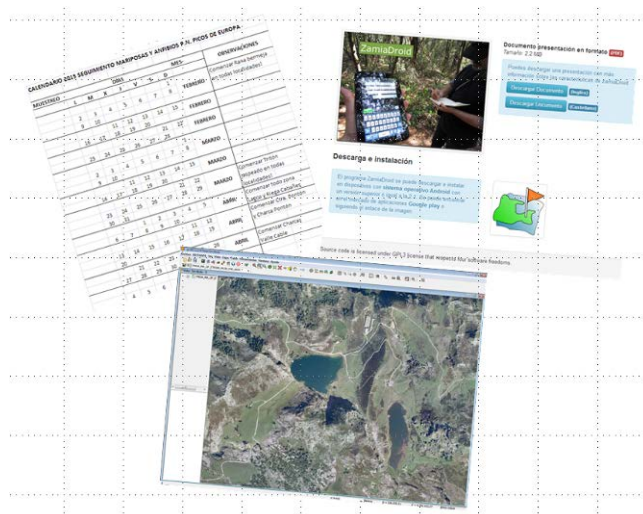
NE del lago y la elaboración e impresión de un folleto y un póster sobre anfibios y enfermedades emergentes en el Parque Nacional.

**Presupuesto:** Se estima un presupuesto de unos 1300 € para el conjunto de las medidas de información al público, contando con que la elaboración de los contenidos de folletos, carteles y panel así como la colocación del panel, se hagan con medios propios.

Se resume a continuación en una sola tabla el conjunto de las medidas propuestas para la mitigación de los ranavirus y su presupuesto:

MEDIDAS PROPUESTAS PARA MITIGACIÓN RANAVIRUS – P.N. PICOS DE EUROPA		
Nº	MEDIDA	PRESUPUESTO ESTIMADO (€)
1	Análisis de la divergencia genética entre poblaciones de <i>Alytes obstetricans</i> , sapo partero común, en el Parque Nacional.	24.000
2	Instalación de senda periférica acotada en el Lago Ercina.	32.855,87
3	Estudio limnológico de los medios afectados por ranavirus.	10.000
4	Instalación de señales disuasorias en los lugares afectados por la enfermedad para prevenir el contagio entre anfibios de distintas localidades.	484,73
5	Estudio de las densidades del cangrejo en el Lago Ercina y análisis de su impacto sobre las comunidades de anfibios. Análisis de su posible papel como vector de ranavirus.	8.000
6	Campaña de información al público sobre ranavirus en el Parque Nacional.	1.211,40
<b>Presupuesto TOTAL</b>		<b>76.552 €</b>

## MODIFICACIONES PARA EL SEGUIMIENTO 2015



De cara al seguimiento de 2015, planteamos las siguientes medidas preventivas:

- Desinfectar cuidadosamente el material (mangas y cubos) con lejía al 3% y secar al sol después de los muestreos en cada localidad, con objeto de evitar infecciones.
- Desinfección de botas antes de bajar del coche y antes de abandonar la localidad de muestreo con lejía al 5%, con objeto de evitar contagios de las infecciones.
- Retirar todos los individuos que se encuentren muertos de las masas de agua. Se conservarán los individuos en alcohol de 70º para su análisis posterior si fuera necesario. Esta medida tiene como objeto disminuir las fuentes de infección.

En cuanto a la metodología de los muestreos y el reporte de datos, se propone:

- La recogida de datos en campo, en la ficha en papel como siempre y después digitalizarlos mediante la aplicación ZamiaDroid para smartphones (opción voluntaria puesto que no disponemos de smartphones que no sean los nuestros personales) para la que se ha elaborado un

proyecto sencillo de introducción de datos. Esta aplicación permite el envío por sms de los resultados de un modo inmediato, sólo hay que dedicar menos de 5 minutos a pasar los datos de papel al formulario de ZamiaDroid en el teléfono y enviarlos por email. Se hará disponible también una hoja de Excel para el volcado de datos, que se distribuirá al personal administrativo en cada oficina para la digitalización de los datos. El objetivo es que podamos ir contrastando los datos a medida que los generamos y que al finalizar la temporada, el proceso de digitalización esté completado y no nos consuma tiempo.

- Los muestreos se ajustarán al calendario que se adjunta como Anexo IV. Una vez que comience la actividad de la especie a seguir, se realizarán muestreos cada 10 días ajustados al calendario hasta que se haya constatado una disminución de la abundancia durante 2 visitas consecutivas.
- En el caso de las localidades afectadas por ranavirus, se realizará una última visita a finales de septiembre, para comprobar cuantas larvas de sapo partero quedan en el agua susceptibles de invernarse.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



**Stephen J. Price, Trenton W.J. Garner, Richard A. Nichols, François Balloux, César Ayres, Amparo Mora Cabello de Alba and Jaime Bosch, 2014.** Collapse of amphibian communities due to an introduced *Ranavirus*. *Current Biology* 24, 1-6, November 3.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.028>

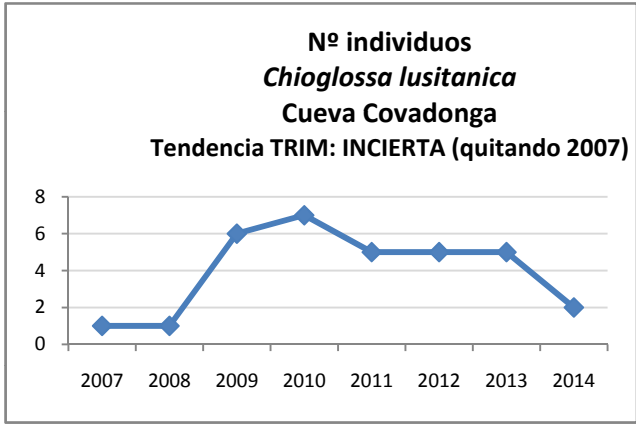
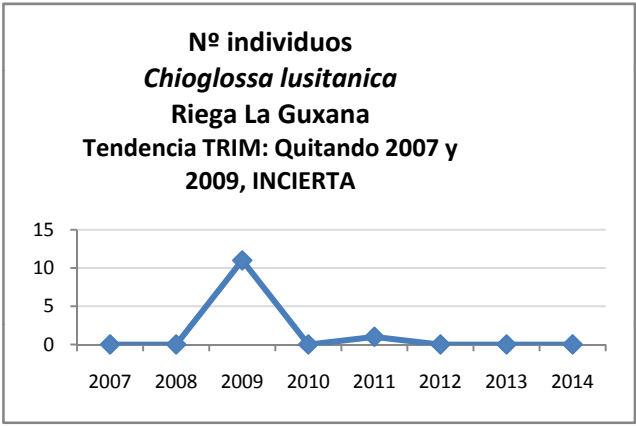


**ANEXO I:** ARCHIVOS TRIM PARA EL ANÁLISIS TENDENCIAS ANFIBIOS  
(2007-2014)

CHIOGLOSSA LUSITANICA (adultos + juveniles)						
Cod_local	Año	Abund_max	Nº_repet	Tª	Nub	Viento
1	2007	0	1	1	1	1
1	2008	0	3	2	1	2
1	2009	11	5	2	1	2
1	2010	0	5	3	1	2
1	2011	1	3	1	1	1
1	2012	0	3	2	1	1
1	2013	0	2	2	1	2
1	2014	0	3			
2	2007	1	1	1	1	1
2	2008	1	4	2	2	1
2	2009	6	5	2	1	1
2	2010	7	9	1	1	1
2	2011	5	5	1	1	1
2	2012	5	2	2	1	2
2	2013	5	2	1	2	1
2	2014	2	3	2	1	1

1= Riega la Guxana

2= Cueva Covadonga



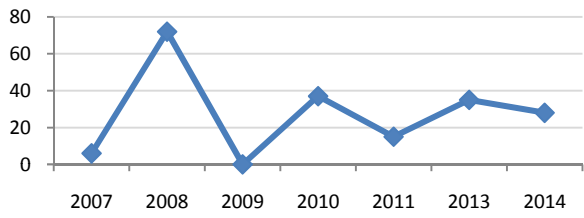
SALAMANDRA SALAMANDRA (adultos + juveniles + larvas)						
Cod_local	Año	Abund_max	Nº_repet	Tª	Nub	Viento
1	2007	6	7	2	1	1
1	2008	72	4	2	2	1
1	2009	0	2	2	1	1
1	2010	37	2	2	1	1
1	2011	15	4	2	1	1
1	2012	No se hizo				
1	2013	35	5	1	2	2
1	2014	28	2	2	1	1
2	2007	9	6	1	1	1
2	2008	18	8	2	1	1
2	2009	0	3	2	1	1
2	2010	5	4	1	1	1
2	2011	9	7	3	1	1
2	2012	1	4	2	1	1
2	2013	3	9	2	1	1
2	2014	1	7	3	1	1
5	2007	22	6	1	1	1
5	2008	35	11	2	2	1
5	2009	35	8	2	1	1
5	2010	23	3	1	2	1
5	2011	41	5	2	2	1
5	2012	101	3	2	1	2
5	2013	116	7	2	1	2
5	2014	21	2	1	2	1

1= Orandi-Covadonga = (a partir de 2010) Recta umbría después Güeyos del Reinazo

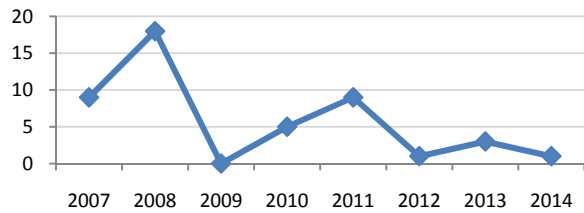
5= Ctra. Pontón-Oseja

2= Pozu Llau

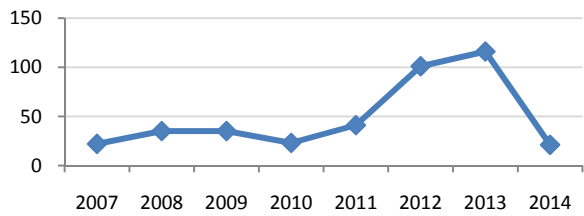
**Nº individuos**  
***Salamandra salamandra***  
**Ctra. Lagos**  
**Tendencia TRIM: INCIERTA**



**Nº individuos**  
***Salamandra salamandra***  
**Pozu Llau**  
**Tendencia TRIM: INCIERTA**



**Nº individuos**  
***Salamandra salamandra***  
**Ctra. Pontón-Oseja**  
**Tendencia TRIM: INCIERTA**





MESOTRITON ALPESTRIS (adultos en fase acuática)

Cod_local	Año	Abund_max	Nº_repet	Tª	Nub	Viento
1	2007	350	3	1	1	1
1	2008	136	3	3	1	1
1	2009	374	7	2	1	2
1	2010	268	4	2	1	1
1	2011	450	9	2	1	2
1	2012	580	7	1	1	1
1	2013	255	7	2	1	2
1	2014	397	5	2	1	1
2	2007	12	3	1	1	1
2	2008	8	3	2	2	1
2	2009	17	4	2	1	1
2	2010	13	4	2	1	1
2	2011	20	4	2	2	1
2	2012	18	4	2	1	1
2	2013	8	4	1	1	1
2	2014	17	5	2	1	2
3	2007	25	5	1	1	1
3	2008	20	4	1	1	2
3	2009	57	5	2	2	1
3	2010	13	3	2	1	1
3	2011	43	6	2	1	2
3	2012	12	7	2	1	1
3	2013	35	8	1	1	1
3	2014	65	6	2	1	1
4	2007	5	2	1	1	1
4	2008	4	1	2	1	2
4	2009	5	5	2	1	3
4	2010	1	3	2	1	3
4	2011	5	5	2	1	2
4	2012	5	4	3	1	3
4	2013	3	6	2	1	2
4	2014	1	4	2	1	2
5	2007	7	1	1	1	1
5	2008	2	4	3	1	2
5	2009	15	3	2	1	2
5	2010	3	2	2	1	2
5	2011	1	2	2	1	2
5	2012	5	2	3	1	1
5	2013	2	1	2	1	1
5	2014	0	5	2	1	2
6	2007	22	1	1	1	1
6	2008	93	5	2	1	2
6	2009	95	5	2	1	1
6	2010	177	4	2	1	2
6	2011	136	7	1	1	2

6	2013	145	6	2	1	3
6	2014	120	5	2	1	2
7	2007	56	1	1	1	1
7	2008	374	5	2	1	2
7	2009	162	4	2	2	1
7	2010	137	2	2	2	1
7	2011	106	6	3	1	2
7	2012	129	3	2	2	1
7	2013	147	7	3	1	1
7	2014	158	5	2	2	1
8	2007	207	2	1	1	1
8	2008	100	4	1	1	1
8	2009	70	5	1	1	1
8	2010	189	6	1	1	1
8	2011	149	6	1	1	1
8	2012	185	6	1	1	1
8	2013	97	8	3	1	1
8	2014	77	7	2	1	1
9	2014	7	5	2	1	3

1= Llago Bajero

2= Vau los Lobos

9=Lago Ercina

3= Lago Ándara

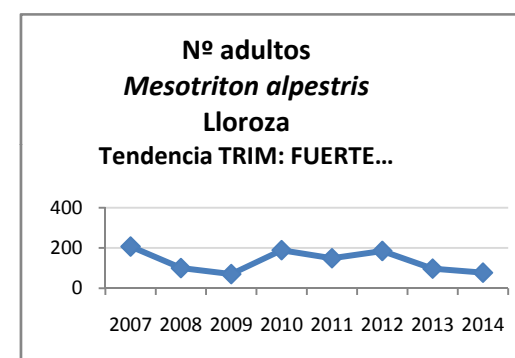
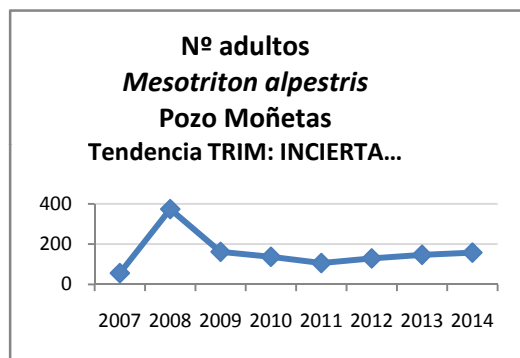
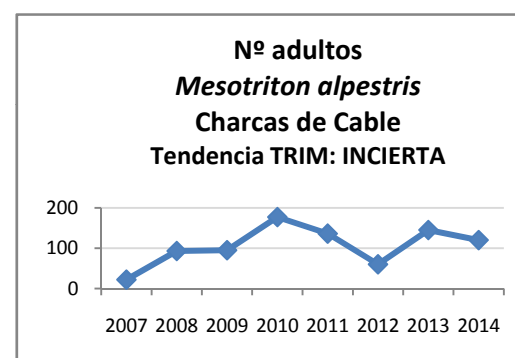
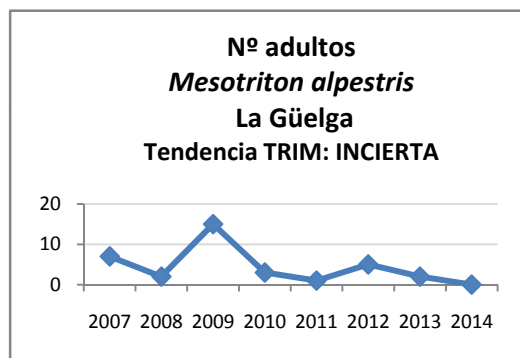
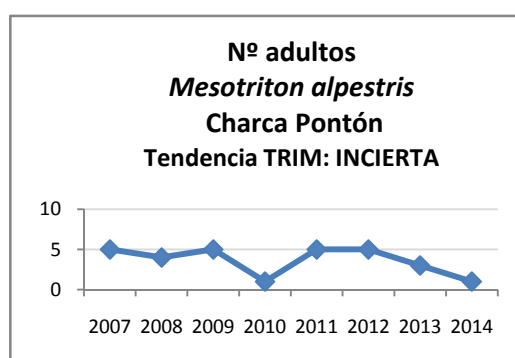
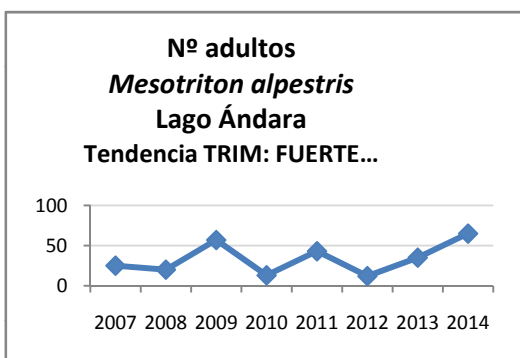
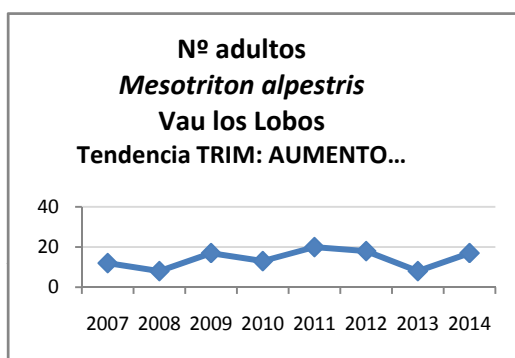
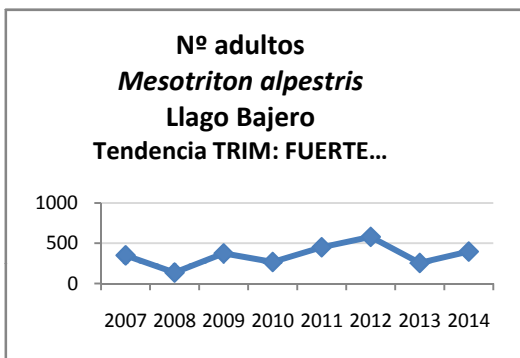
4= Charca Pontón

5=La Güelga

6= Charcas Cable

7=Pozo Moñetas

8=Lloroza



LISSOTRITON HELVETICUS (adultos en fase acuática)						
Cod_local	Año	Abund_max	Nº_repet	Tª	Nub	Viento
1	2007	93	3	1	1	1
1	2008	66	3	1	1	1
1	2009	100	4	2	1	1
1	2010	80	4	2	1	1
1	2011	178	4	2	2	1
1	2012	151	4	3	1	2
1	2013	76	4	2	1	1
1	2014	75	5	2	1	1
2	2007	239	3	1	1	1
2	2008	109	1	2	1	2
2	2009	168	5	2	1	3
2	2010	82	5	1	2	2
2	2011	133	5	2	1	2
2	2012	165	5	3	1	3
2	2013	72	6	2	1	2
2	2014	67	4	2	2	3
3	2007	120	3	1	1	1
3	2008	121	4	2	2	2
3	2009	120	3	2	1	2
3	2010	74	2	3	1	1
3	2011	60	2	2	1	2
3	2012	37	2	3	1	1
3	2013	25	1	2	1	1
3	2014	30	5	2	1	2
4	2007	10	1	1	1	1
4	2008	32	5	2	1	2
4	2009	14	5	1	1	1
4	2010	29	2	2	1	2
4	2011	37	7	1	1	2
4	2012	19	5	1	1	1
4	2013	62	7	2	1	3
4	2014	44	6	2	1	2

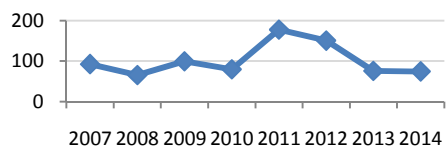
1= Vau los Lobos

2= Charca Pontón

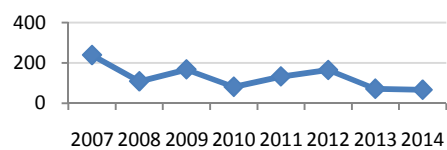
3= La Güelga

4= Charcas Cable

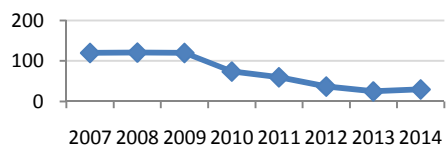
**Nº adultos**  
***Lissotriton helveticus***  
**Vau los Lobos**  
**Tendencia TRIM: INCIERTA**



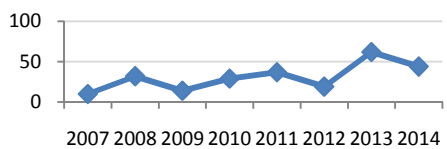
**Nº adultos**  
***Lissotriton helveticus***  
**Charca Pontón**  
**Tendencia TRIM: ESTABLE**



**Nº adultos**  
***Lissotriton helveticus***  
**La Güelga**  
**Tendencia TRIM: DECLIVE AGUDO**



**Nº adultos**  
***Lissotriton helveticus***  
**Charcas Cable**  
**Tendencia TRIM: FUERTE...**



TRITURUS MARMORATUS (adultos en fase acuática)						
Cod_local	Año	Abund_max	Nº_repet	Tª	Nub	Viento
1	2007	1	1	1	2	1
1	2008	10	3	2	1	2
1	2009	5	1	1	1	1
1	2010	16	5	3	1	2
1	2011	16	3	2	1	1
1	2012	5	3	2	1	1
1	2013	11	4	3	1	1
1	2014	0	4	2	1	1
2	2007	7	1	1	1	1
2	2008	19	3	1	2	1
2	2009	36	1	2	1	1
2	2010	91	5	3	1	1
2	2011	49	3	2	1	1
2	2012	8	3	2	1	1
2	2013	26	4	3	1	1
2	2014	0	4	2	1	1
3	2007	17	3	1	1	1
3	2008	13	5	1	2	1
3	2009	5	5	2	1	1
3	2010	8	6	2	1	2
3	2011	3	6	1	2	1
3	2012	6	3	3	1	1
3	2013	7	4	1	2	1
3	2014	3	4	2	2	1
4	2007	6	1	1	1	1
4	2008	0	2	2	1	3
4	2009	5	2	1	1	2
4	2010	16	5	2	1	1
4	2011	9	4	2	2	3
4	2012	13	5	3	1	1
4	2013	13	5	2	1	2
4	2014	13	5	1	1	1
5	2007	18	1	1	1	1
5	2008	21	3	2	1	3
5	2009	22	2	2	1	1
5	2010	32	5	3	1	1
5	2011	33	4	2	2	1
5	2012	28	5	3	1	1
5	2013	51	5	2	1	2
5	2014	31	5	1	1	1

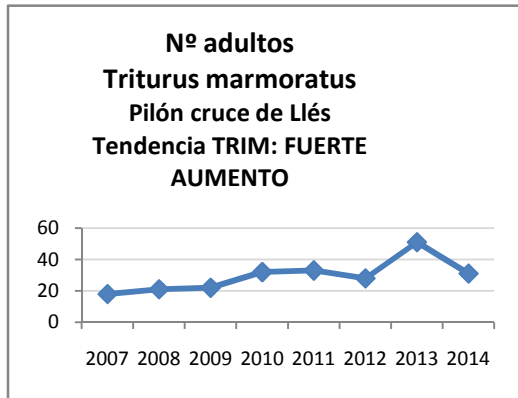
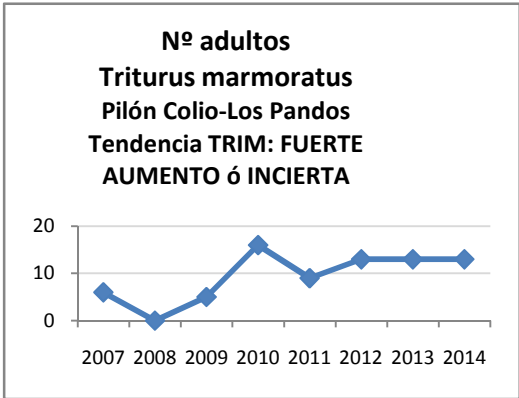
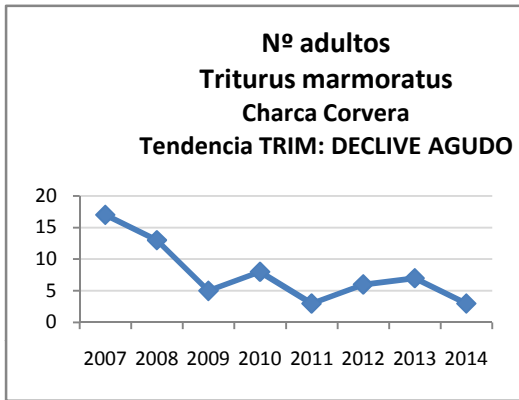
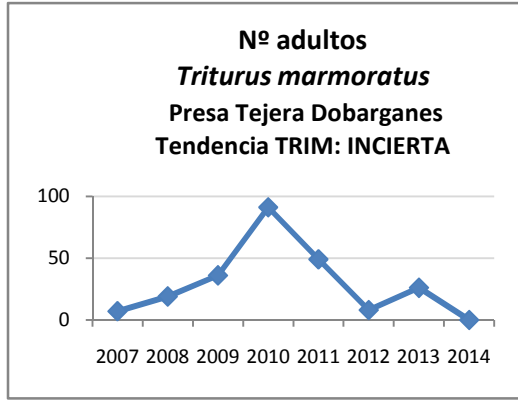
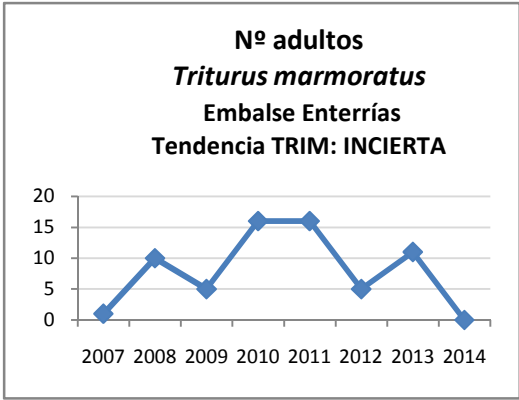
1= Embalse Enterrías

2= Presa Tejera Dobarganes

3= Charca Corvera

4= Pilón Colio-Los Pandos

5= Pilón Llés



ALYTES OBSTETRICANS (larvas invernantes)						
Cod_local	Año	Abund_max	Nº_repet	Tª	Nub	Viento
1	2007	8250	4	1	1	1
1	2008	10800	3	3	1	1
1	2009	13300	7	1	1	1
1	2010	9200	4	2	1	2
1	2011	12200	9	2	1	2
1	2012	8700	7	3	1	2
1	2013	12000	6	3	1	2
1	2014	4693	5	2	1	3
2	2007	500	3	1	2	1
2	2008	1295	4	2	1	1
2	2009	425	5	2	1	1
2	2010	11	6	3	1	1
2	2011	40	6	2	1	1
2	2012	9	6	3	1	1
2	2013	753	8	3	1	1
2	2014	97	7	2	1	1
3	2007	3700	2	1	1	1
3	2008	10000	5	2	1	2
3	2009	4000	4	2	2	1
3	2010	4120	2	2	2	1
3	2011	11	6	1	1	1
3	2012	206	3	2	2	1
3	2013	383	7	2	2	1
3	2014	53	5	2	2	1
4	2007	3238	1	1	1	1
4	2008	609	8	2	1	1
4	2009	500	3	1	1	1
4	2010	655	5	2	1	1
4	2011	1760	7	3	1	1
4	2012	121	4	2	1	1
4	2013	390	9	3	1	1
4	2014	230	7	3	1	1
5	2013	0	6	2	1	1
5	2014	0	5	2	1	1
6	2013	300	8	1	1	1
6	2014	1650	7	1	1	1

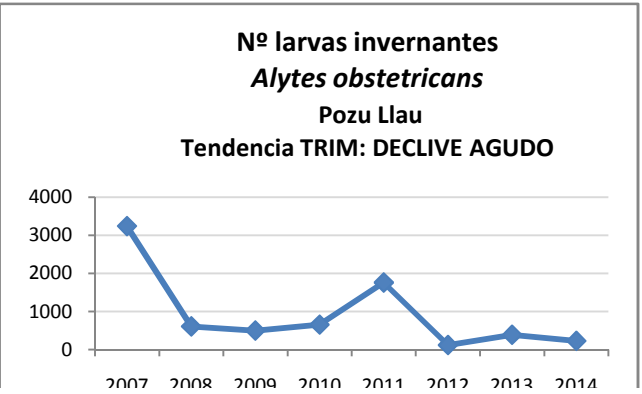
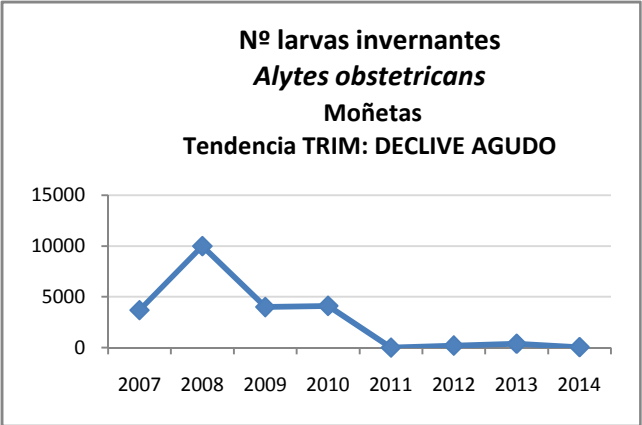
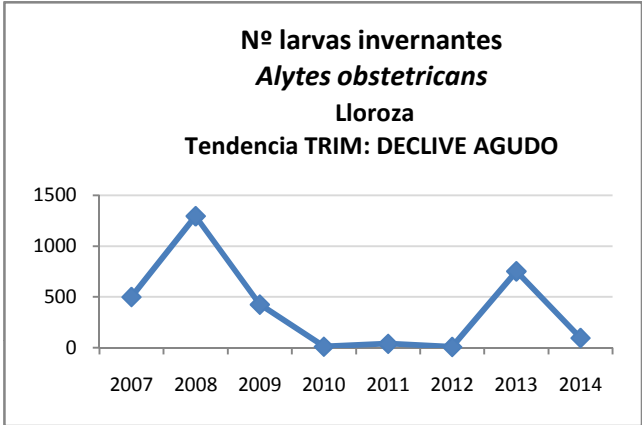
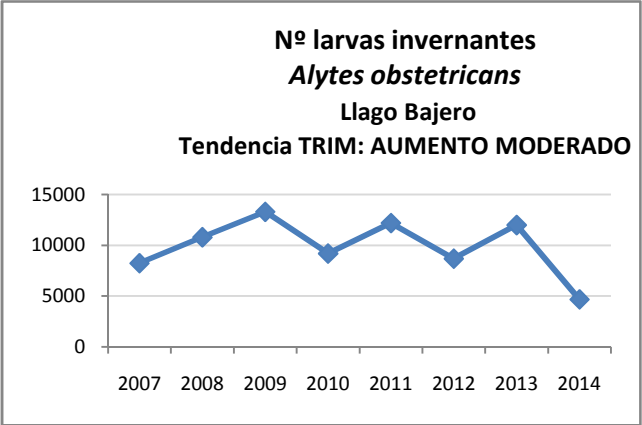
1= Lago Bajero

2= Lago superior Lloroza

3= Pozo Moñeta: 5= Lago Ercina

4= Pozu Llau 6= Lago Ándara





BUFO BUFO (adultos y puestas)						
Cod_local	Año	Abund_max	Nº_repet	Tª	Nub	Viento
1	2007	335	6	2	1	1
1	2008	111	7	1	1	1
1	2009	34	5	2	1	1
1	2010	29	4	2	1	1
1	2011	67	4	2	1	1
1	2012	No se hizo				
1	2013	13	4	1	2	2
1	2014	17	2	1	1	1
2	2007	31	6	1	1	1
2	2008	19	11	2	2	1
2	2009	26	8	2	1	1
2	2010	11	4	1	2	1
2	2011	12	5	2	2	1
2	2012	35	3	2	1	2
2	2013	19	7	2	1	2
2	2014	5	2	1	2	2
3	2007	314	4	1	1	1
3	2008	169	5	1	1	2
3	2009	27	11	1	1	2
3	2010	56	5	1	1	1
3	2011	41	5	1	1	2
3	2012	54	9	2	1	1
3	2013	34	6	2	1	2
3	2014	34	5	2	1	1
4	2007	561	4	1	1	1
4	2008	34	5	1	1	1
4	2009	16	11	1	1	1
4	2010	10	5	1	1	1
4	2011	16	5	1	1	1
4	2012	20	9	1	1	1
4	2013	29	6	2	1	1
4	2014	31	5	2	1	1
5	2013	14	8	2	1	1
5	2014	3	2	2	1	1
6	2013	0	8	NO	1	2
6	2014	¿?				
7	2014	2	3	1	1	1

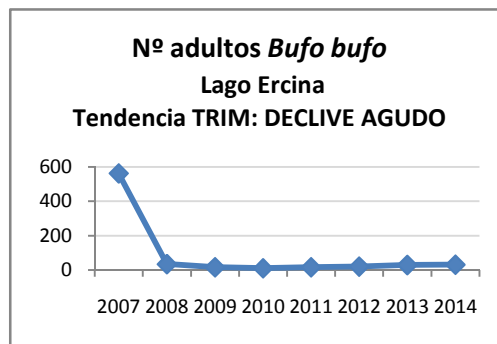
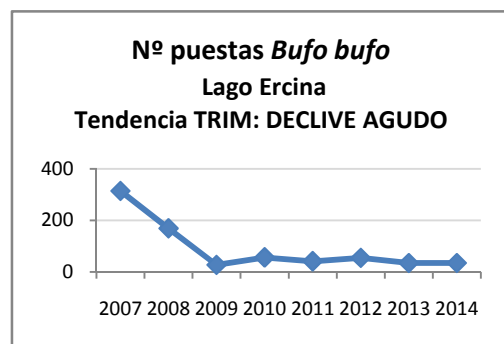
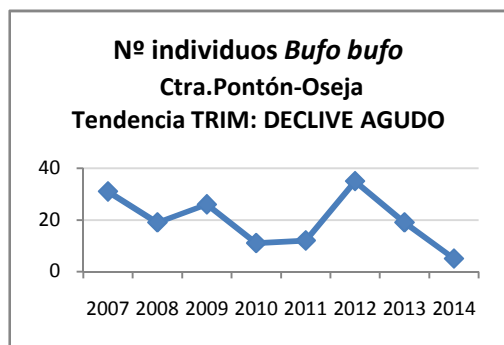
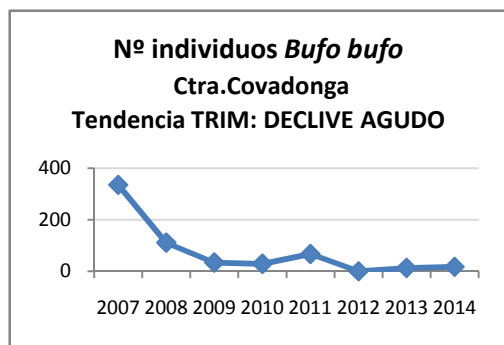
1= Ctra. Covadonga (adultos)      3= Lago Ercina (puestas)

2= Ctra. Pontón-Oseja (adultos)      4= Lago Ercina (adultos)

5= Lago superior Lloroza

6= Lago Ándara

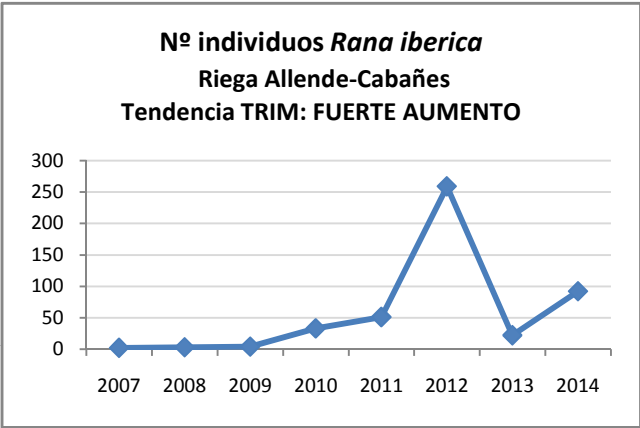
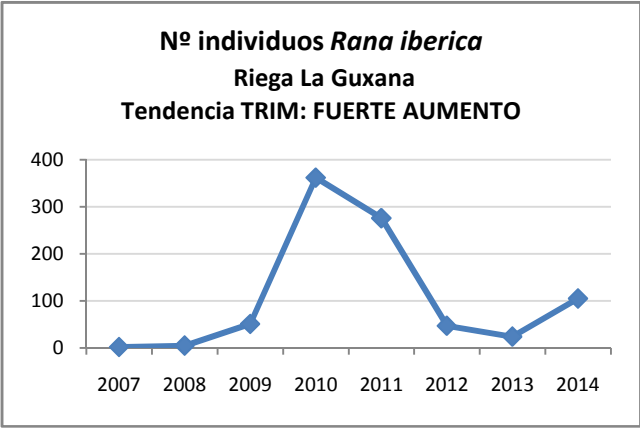
7= Ctra. Lagos



RANA IBERICA (adultos + juveniles + larvas)						
Cod_local	Año	Abund_max	Nº_repet	Tª	Nub	Viento
1	2007	2	5	1	1	1
1	2008	5	3	2	1	1
1	2009	51	5	2	1	2
1	2010	362	5	2	1	1
1	2011	276	3	2	1	1
1	2012	47	3	1	1	2
1	2013	24	2	2	1	2
1	2014	105	3	2	1	2
2	2007	2	4	1	1	1
2	2008	3	5	2	1	1
2	2009	4	5	2	1	1
2	2010	33	5	3	1	2
2	2011	51	4	2	1	3
2	2012	259	4	3	1	2
2	2013	22	4	2	1	2
2	2014	92	6	2	1	2

1= Riega La Guxana

2= Riega Allende-Cabañes



RANA TEMPORARIA (puestas)						
Cod_local	Año	Abund_max	Nº_repet	Tª	Nub	Viento
1	2007	0	1	1	1	1
1	2008	104	4	2	1	1
1	2009	300	3	1	1	2
1	2010	255	3	1	1	1
1	2011	500	5	1	1	1
1	2012	338	5	1	1	2
1	2013	226	4	2	1	3
1	2014	60	4	1	1	2
2	2007	771	1	1	1	1
2	2008	100	2	1	1	1
2	2009	350	4	1	1	1
2	2010	319	5	2	1	1
2	2011	330	5	2	1	3
2	2012	120	6	1	1	1
2	2013	168	6	1	1	2
2	2014	240	6	2	1	1
3	2007	67	1	1	1	1
3	2008	110	5	1	1	1
3	2009	90	5	2	1	1
3	2010	118	2	2	1	2
3	2011	198	4	2	1	2
3	2012	65	5	3	1	2
3	2013	53	6	1	1	1
3	2014	105	5	2	1	3
4	2007	136	1	1	1	1
4	2008	85	8	1	1	2
4	2009	75	3	1	1	1
4	2010	64	3	1	1	1
4	2011	41	5	1	1	1
4	2012	41	4	2	1	1
4	2013	182	9	2	1	1
4	2014	90	7	1	1	1
5	2013	14	6	2	1	1
5	2014	120	4	2	1	1
6	2013	1	8	-	1	2
6	2014	2	1	1	1	2

1= Charca Rasa Pandecarmen

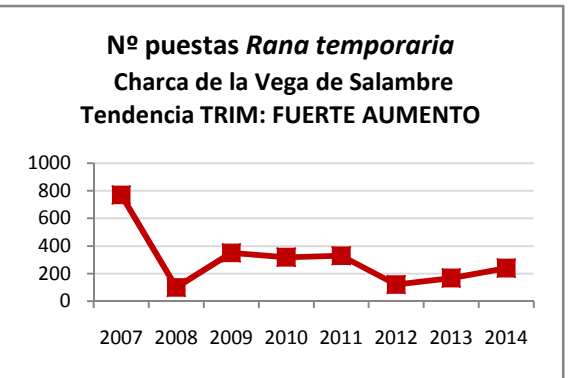
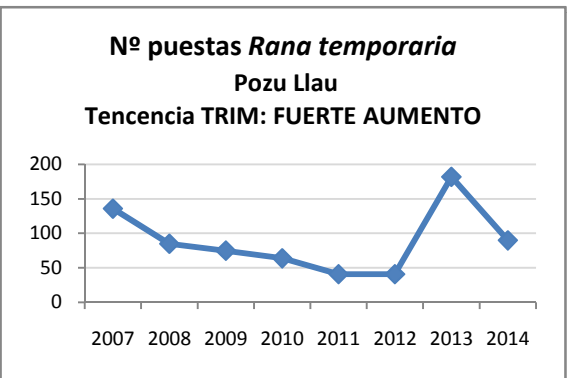
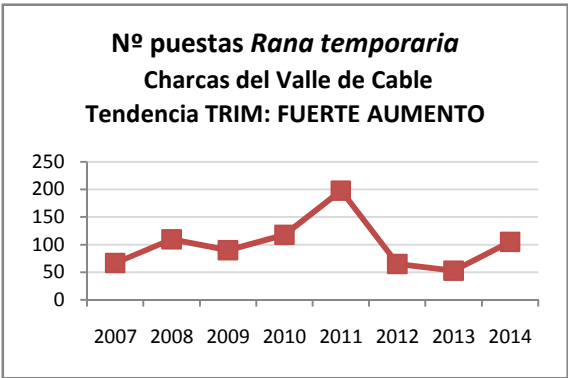
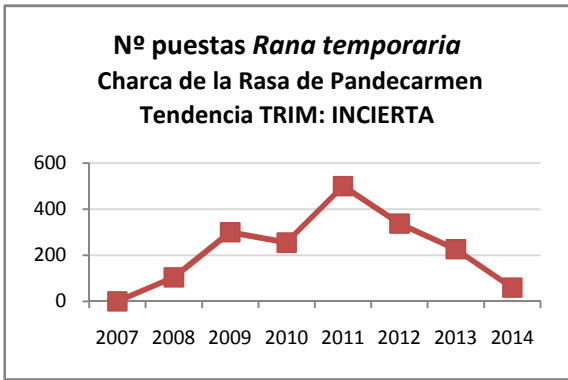
2= Charca Vega Salambre

3= Charcas Valle Cable

4= Pozu Llau

5=Lago Ercina

6=Lago Ándara





**ANEXO II: ARTÍCULO “COLLAPSE OF AMPHIBIAN COMMUNITIES  
DUE TO AN INTRODUCED RANAVIRUS” Y RESUMEN**



**Price et al, 2014.** Collapse of amphibian communities due to an introduced *Ranavirus*. *Current Biology* 24, 1-6, November 3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.028>

### **Resumen**

*La aparición de enfermedades infecciosas con un amplio rango de hospedadores puede tener un impacto dramático sobre comunidades completas y se ha convertido en una de las principales amenazas para la biodiversidad. En este artículo, describimos la explotación simultánea de comunidades enteras de hospedadores potenciales por parte de un nuevo patógeno viral, con declives severos asociados después de la invasión. Encontramos dos virus muy virulentos, filogenéticamente relacionados (género *Ranavirus*, familia *Iridoviridae*) causando mortalidades en masa en múltiples y diversos hospedadores anfibios en el norte de España, así como un tercer virus relativamente no virulento. Documentamos el declive de los hospedadores en múltiples especies y en múltiples localidades de una región.*

*Nuestro trabajo revela un grupo de patógenos que parecen tener la capacidad de infectar y evadir la inmunidad en hospedadores múltiples, diversos y nuevos, y que están ejerciendo impactos masivos en las comunidades de hospedadores. Este artículo provee un registro excepcional de las tendencias de las poblaciones de los hospedadores que han sido seguidas en tiempo real desde la aparición de una enfermedad de fauna silvestre y un ejemplo asombroso de cómo un patógeno nuevo y generalista está cruzando repetidamente la barrera entre especies con consecuencias catastróficas a nivel de las comunidades de hospedadores.*

# Collapse of Amphibian Communities Due to an Introduced *Ranavirus*

Stephen J. Price,<sup>1,2,7,\*</sup> Trenton W.J. Garner,<sup>1</sup>  
Richard A. Nichols,<sup>2</sup> François Balloux,<sup>3</sup> César Ayres,<sup>4</sup>  
Amparo Mora-Cabello de Alba,<sup>5</sup> and Jaime Bosch<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Institute of Zoology, Zoological Society of London, Regents Park, London NW1 4RY, UK

<sup>2</sup>The School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary University of London, London E1 4NS, UK

<sup>3</sup>UCL Genetics Institute, University College London, Gower Street, London, WC1E 6BT, UK

<sup>4</sup>Asociación Herpetológica Española, José Gutiérrez Abascal 2, 28006 Madrid, Spain

<sup>5</sup>Parque Nacional Picos de Europa, Avenida Covadonga 43, 33550 Cangas de Onís, Asturias, Spain

<sup>6</sup>Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, José Gutiérrez Abascal 2, 28006 Madrid, Spain

## Summary

The emergence of infectious diseases with a broad host range can have a dramatic impact on entire communities and has become one of the main threats to biodiversity [1–4]. Here, we report the simultaneous exploitation of entire communities of potential hosts with associated severe declines following invasion by a novel viral pathogen. We found two phylogenetically related, highly virulent viruses (genus *Ranavirus*, family *Iridoviridae*) causing mass mortality in multiple, diverse amphibian hosts in northern Spain, as well as a third, relatively avirulent virus. We document host declines in multiple species at multiple sites in the region. Our work reveals a group of pathogens that seem to have preexisting capacity to infect and evade immunity in multiple diverse and novel hosts, and that are exerting massive impacts on host communities. This report provides an exceptional record of host population trends being tracked in real time following emergence of a wildlife disease and a striking example of a novel, generalist pathogen repeatedly crossing the species barrier with catastrophic consequences at the level of host communities.

## Results and Discussion

We have been monitoring amphibian communities located in the Picos de Europa National Park (PNPE) since 2005, when we first recorded ranavirus infection, disease, and mass mortality. We began demographic surveys in 2007, making annual counts of target species at 15 sites across the park (Figure 1). This predates the first published records of lethal ranavirus infections (occurring in September 2007) in the PNPE in two of our study species [5, 6]. Ranaviruses are large, double-stranded DNA viruses of the family *Iridoviridae*, which are emerging pathogens with broad geographical and host

ranges. They infect and cause disease in fish and reptiles but are noted for their ability to cause lethal disease in amphibians in the Americas, Europe, Asia, and Australia [5, 7–17]. Despite *Ranavirus*'s broad geographic distribution and documented multihost epizootics in amphibian communities [18], quantitative evidence for amphibian demographic decline due to ranavirosis has previously been reported for only a single amphibian host species [19].

## Disease and Mass Mortality

We have continued to record mass mortality events consistent with ranavirosis affecting amphibian communities at four locations in the PNPE (Áliva, Ercina, Llorza, and Moñetas [ALIVA, ERC, LLOR, and MON], Figure 1). During annual field surveys, we encountered numerous dead and dying adult, juvenile, and larval caudate and anuran amphibians, including all six common species inhabiting the park. Ranavirus infections may be subclinical [20, 21] but are more typically associated with overt, distinctive disease in the form of systemic or ulcerative syndromes [6, 7] and accompanied by host mass mortality. Sick and dead animals in the PNPE exhibited superficial and ulcerating skin lesions, internal hemorrhages, and severe limb necrosis, all gross signs typical of lethal ranavirosis (see Figure S1A available online). Additionally, since 2010 we have been observing mortality associated with signs of ranavirosis at a location 200 km west of the PNPE in Galicia, affecting two caudate amphibian species that are rare or absent in the PNPE and one squamate reptile (Figure S1B).

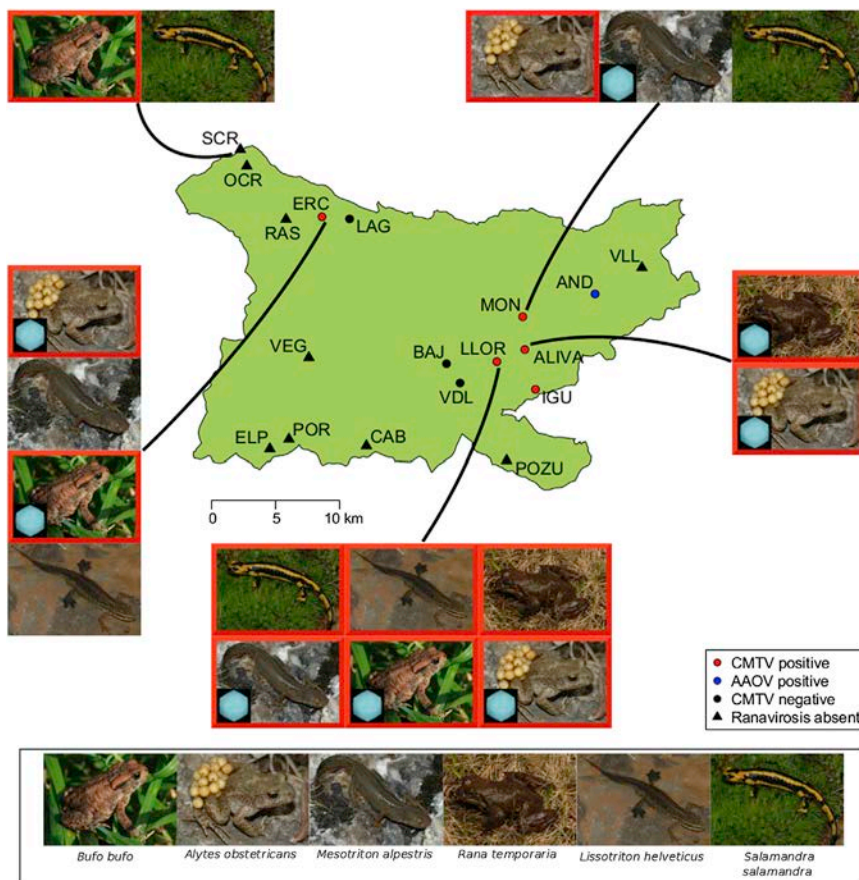
Molecular diagnostics have confirmed that infection with *Ranavirus* is associated with disease at all five of these locations (Table S1). We also screened for *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), a fungal pathogen commonly associated with amphibian die-offs in Iberia [22], at eight locations in the PNPE. *Bd* was present at two sites (25%; Table S1B), occurring in the absence of observed disease and mortality at La Güelga (LAG, a ranavirus-negative site, Figure 1) and at low prevalence in 2005 only at an artificial pond (near Áliva refuge). A more widespread survey for bacteria and viruses was also undertaken as part of the first published account of ranavirus infection and mass mortality in the PNPE [5] (at Igüedri [IGU], Figure 1). That mass mortality event affected some of our study species, which exhibited the same suite of lesions observed in this study. There were no other pathogens found besides the *Ranavirus Common midwife toad virus* (CMTV). We consider it unlikely that other environmental factors, such as pollution, are contributing to the observed mass mortality events, given the pristine nature of the PNPE and the heterogeneity among study sites in terms of the type and situation of water bodies.

We successfully amplified a suite of ranavirus loci (six partial open reading frames and an intergenic region) from three of the host species sampled at locations in the PNPE and all three species sampled in Galicia. Sequences from amplification products of all loci were aligned against whole genomes covering known global amphibian-like ranavirus diversity and joined to form a final concatenated alignment 2,274 bp in length. Phylogenetic assessment of the concatenated sequences derived from seven diseased animals show that the ranaviruses associated with disease and mortality in northern Spain were all related or near identical to the genome of CMTV.

<sup>7</sup>Present address: UCL Genetics Institute, University College London, Gower Street, London, WC1E 6BT, UK

\*Correspondence: [s.price@ucl.ac.uk](mailto:s.price@ucl.ac.uk)

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).



**Figure 1.** Ranavirus Infection and Mass Mortality among Amphibian Communities in the Picos de Europa National Park

Map shows park boundary and sites where amphibian communities have been monitored since 2005. Sites that experienced observed amphibian mass mortality events are expanded to display the amphibian community present, and affected hosts are bordered in red. Hosts with confirmed CMTV infection are denoted by a blue virus particle in bottom left corner of their image. Disease and mass mortality associated with CMTV infection at Igüedri (IGU) was reported by Balseiro et al. (2009) [5]. See also [Figure S1](#) and [Table S1](#).

Abbreviations key: SCR, Soto-Covadonga Road; OCR, Orandi-Covadonga Road; RAS, Rasa Pandecarmen; ERC, Ercina Lake; LAG, La Güelga; VEG, Vega Sajambre; ELP, El Pontón; POR, Pontón-Oseja Road; CAB, Charcas de Cable; BAJ, Bajero Lake; LLOR, Lloroza; MON, Moñetas; AND, Ándara Lake; VLL, Vau los Lobos; ALIVA, Áliva; VDL, Vega de Liordes; IGU, Igüedri; POZU, Pozu Llau.

insufficient resolution of disease records to match decline and disease onset at individual locations. Our first records of mass mortality and ranavirus in the region were at an artificial pond adjacent to Lloroza (LLOR, [Figure 1](#)); subsequently drained for other reasons) and a roadside pool at Áliva mine (ALIVA, [Figure 1](#)), both sampled in 2005.

This virus was originally isolated from a diseased animal sampled in 2008 in the PNPE and was associated with mass mortality and the same distinctive signs of disease ([Figure 1](#)) [6, 23]. Sequences amplified from all hosts sampled within the PNPE at sites of mass mortality exhibited 99.96% homology (varying at a single base) with the sequence of the type CMTV irrespective of what host species was sampled. Sequences from hosts sampled at the Galician site were highly similar to each other (two were identical and were 99.96% identical to the third, with variation again confined to a single base). They formed the sister clade to the CMTV cluster and are hereafter referred to as *Bosca's newt virus* (BNV; [Figure 2](#)). In contrast, an isolate from a common midwife toad at Ándara Lake, where ranavirus and mass mortality have not been observed—*Ándaran Alytes obstetricans virus* (AAOV)—grouped with “FV3-like” viruses. We also screened animals from three other sites in the PNPE where there has been no observed disease or mass mortality, and we found no evidence of ranavirus infection. These observations support the assumption that disease and mass mortality can be used as a reliable indicator of CMTV incidence.

### Multispecies Host Declines

Populations of host species in diseased communities in the PNPE have consistently experienced statistically significant, persistent, and in some cases catastrophic population declines, which was not the case at sites where disease had not been observed ([Figure 3](#); [Table S1A](#)). The onset of decline for all species experiencing ranavirus was contemporary with our first records of disease in the PNPE, but there is

The worst-affected species was the common midwife toad, *Alytes obstetricans*. Midwife toads experienced steep decline at both diseased sites where we monitored population trends of this host species but did not decline at two other locations where signs of ranavirus were never detected ([Figure 3](#); [Table S1A](#)). Alpine newts (*Mesotriton alpestris*) and common toads (*Bufo bufo*) also experienced significant declines at diseased sites ([Figure 3](#)) but did not show this dynamic at locations where we did not observe amphibians exhibiting signs of ranavirus, with one exception (*B. bufo* at Soto-Covadonga Road [SCR], [Figure 1](#)). Amphibian species that were enumerated at disease-free locations did not generally decline from 2007 to 2012 and sometimes appeared to be increasing in numbers during the course of our surveillance ([Table S1A](#)). When all monitored host populations were considered independently, infection with CMTV was significantly associated with host declines (Fisher's exact test,  $p = 0.0093$ ; raw data summarized in [Figure S2](#)). The same was true when we accounted for potential nonindependence of multiple species at the same site by using site data rather than host species data (Fisher's exact test,  $p = 0.022$ ; [Figure S2](#)).

### CMTV Emergence

Our findings indicate that CMTV-like ranaviruses recently emerged in northern Spain and are responsible for mortality of every amphibian species that we have sampled. Additionally, an isolate with 99.96% sequence identity to viruses isolated from amphibians in Galicia, and closely related to CMTV, was generated from esophageal tissue taken from a viperine snake (*Natrix maura*) found dead in the process

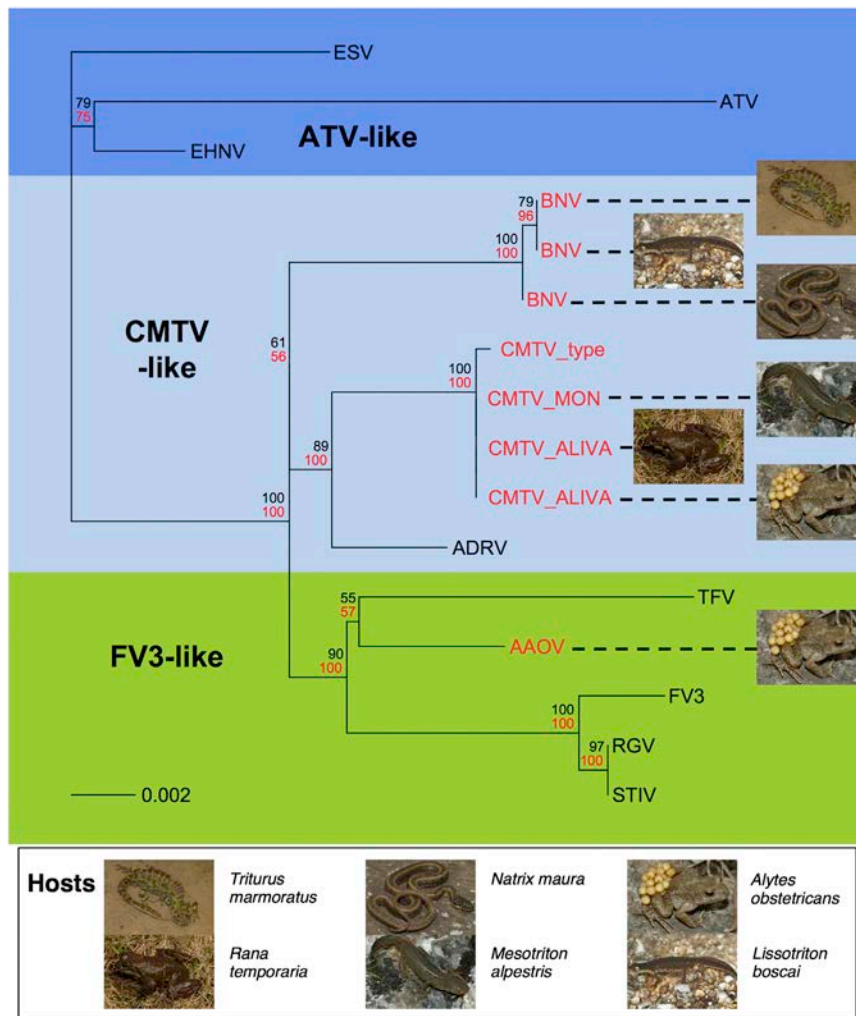


Figure 2. Phylogenetic Relationships of Spanish Ranaviruses

*Andaran Alytes obstetricans virus* (AAOV) is a member of the “FV3-like” viruses, which form a monophyletic group; *Bosca’s newt virus* (BNV) and *Common midwife toad virus* (CMTV) are considered “CMTV-like.” The tree was constructed from seven concatenated multiple sequence alignments (details of loci are included in [Experimental Procedures](#)). Node support values are annotated on the best maximum-likelihood tree and were calculated using maximum-likelihood (bootstraps, black) and Bayesian inference (posterior probabilities, red) under a GTR model of molecular evolution. Scale of branch lengths is in nucleotide substitutions per site. Additional sequences included are *Frog virus 3* (FV3, GenBank accession number AY548484), *Tiger frog virus* (TFV, AF389451), *Ambystoma tigrinum virus* (ATV, AY150217), *Epizootic hematopoietic necrosis virus* (EHNV, FJ433873), *Soft-shelled turtle iridovirus* (STIV, NC012637), *Rana grylio virus* (RGV, JQ654586), and *European sheatfish virus* (ESV, JQ724856).

CMTV-like ranaviruses may be in the process of emerging in amphibian host communities across Europe, with the capacity to infect and cause significant disease and death in a wide range of hosts.

#### Community-Level Effects

Infection and disease frequency are both known to decrease with increasing host community species richness (see e.g. [27]), even if the relationship is not always straightforward [28]. This is because diverse host communities present a range of barriers to infection, and

of ingesting diseased amphibians [24] and with ulcerating lesions along its gullet. The ability of FV3-like ranaviruses (the sister clade to CMTV-likes; [Figure 2](#) [23]) to be transmitted among both closely related and highly diverged cold-blooded vertebrate taxa is well documented [25, 26]. However, recurrent epizootics caused by FV3-like viruses in the Americas, the United Kingdom (UK), and Southeast Asia have only been linked to host population decline in UK common frogs (*Rana temporaria*), and UK FV3-like viruses appear limited in their ability to cause disease and significant mortality in other native UK amphibian species [19]. We have also detected FV3-like ranaviruses cocirculating in the PNPE (at Ándara Lake [AND], [Figure 2](#)) that caused morbidity without lesions in *A. obstetricans* but with no evidence of mass mortality or population declines. Reports of amphibian mass mortality events associated with ranaviruses are rapidly accruing across Europe, and CMTV-like forms are implicated: a partial sequence of the major capsid protein gene of the virus isolate responsible for the death of thousands of pool frogs (*Pelophylax lessonae*) and smooth newts (*Lissotriton vulgaris*) in the Netherlands reported by Kik et al. exhibited 100% sequence similarity to CMTV [9], as did sequences from the same locus derived from a *Ranavirus* isolated from North American bullfrog larvae sampled from invasive populations in Belgium [10]. The accumulating body of evidence indicates that

universal pathogen strategies for overcoming host barriers are rare [29, 30]. Accordingly, pathogens typically exhibit significant variation in their ability to infect and cause disease across host species and must evolve novel traits to exploit a broader host range [31–33]. It is therefore unusual for an emerging pathogen to exploit a broad range of host species and extremely rare for multiple host species to suffer synchronous mass mortality and decline when infection emerges. For the rare exceptions, the results for hosts can be notably catastrophic (e.g., West Nile virus emergence in North America [1], *Batrachochytrium dendrobatidis* emergence in the Neotropics and Australia [2], and white-nose syndrome in North American bats [4]).

We see no evidence of increased host species diversity hampering the ability of a novel pathogen to exploit a host community in northern Spain. At the most species-rich site in the PNPE, all six amphibian species are experiencing mortality associated with signs of disease and have done so since disease was first observed. Instead of being inhibited by host species diversity, it appears that a single strain of CMTV has the capacity to exploit multiple host species de novo. This hypothesis is supported by an almost complete lack of variation at seven loci located across the type CMTV genome and recovered at multiple points in space, time, and host species—spanning the width of the PNPE, several years,

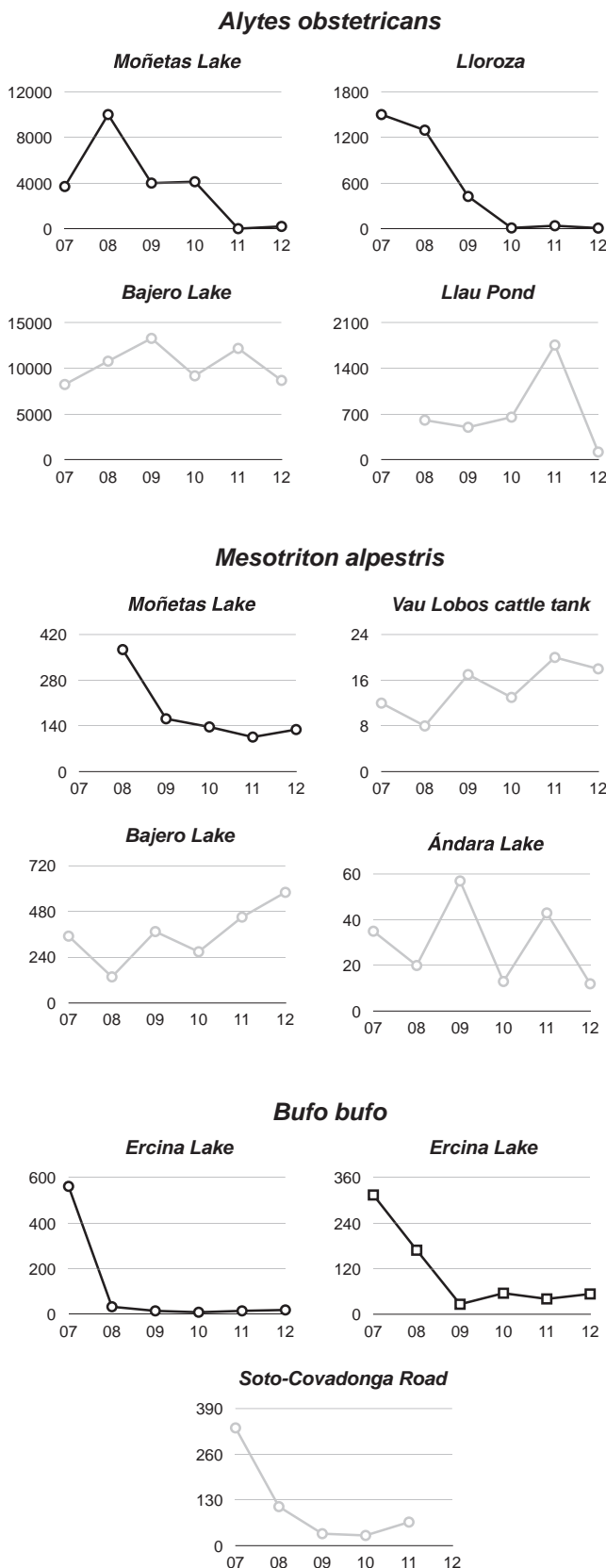


Figure 3. Population Trends for Declining Species in the Picos de Europa National Park

Common midwife toad ranavirus (CMTV) infections have been confirmed within amphibian communities at Moñetas, Lloroza, and Ercina Lake (black

and diverse hosts. The synchrony of host declines across sites, beginning shortly after disease was first detected in the park, provides further support. Taken together with the obstacles to rapid amphibian dispersal presented by the rugged, mountainous terrain of the PNPE, all of the evidence points to a single introduction of CMTV at multiple locations within the park and affecting all amphibian species. Such an introduction could have occurred via human translocations of infectious materials along with equipment or livestock.

Worryingly, species declines in the PNPE show no sign of rebound over five years, and in many cases species are all but extirpated from some locations. The availability of multiple susceptible hosts at a site increases extinction risk, while small relict populations that have suffered declines are left vulnerable to stochastic events [34]. This same pattern of decline without rebound was observed in common frog populations experiencing persistent ranavirosis in the UK, where 83% median host population declines were sustained over several frog generations [19]. Selection imposed on host populations experiencing high rates of mortality due to infectious disease is expected to favor genotypes capable of either resisting or tolerating infection, and UK frog populations affected by ranavirosis do exhibit the genetic signature of directional selection at immunocompetent loci [19, 35]. However, selection has not been accompanied by demographic recovery, and debilitating ranavirosis continues to increase in scope in common frog populations across the UK. If CMTV in Spain has similar capacity to proliferate despite host adaptive responses, amphibian communities, not just single species, will suffer.

#### Experimental Procedures

##### Sampling

All animal sampling was carried out following review by the Consejería de Medio Ambiente of Galicia and the governing body of the Parque Nacional Picos de Europa, and permits were renewed annually. We collected swabs and tissue samples from a mix of amphibian species and life stages at sites in the PNPE between 2005 and 2012, and from carcasses of two amphibian (*Lissotriton boscai*, *Triturus marmoratus*) and one reptile (*Natrix maura*) species at Pontillon (Galicia) in 2010 and 2011 (Table S1B). One of the sampled sites—Lloroza—is thought to correspond to the mass mortality event that led to the isolation of CMTV [6, 23].

##### Screening

Tissue samples were screened for *Ranavirus* in duplicate using a PCR of the viral MCP gene (CMTV ORF 16L; major capsid protein; AFA44920) [36]. A results summary is included in Table S1B. Swabs were screened for *Bd* using quantitative PCR [37].

##### Sequencing

Positive samples were subjected to additional PCR reactions to amplify partial sequences from CMTV ORFs 22L (GenBank accession number AFA44926), 58L (AFA44964), 59R (AFA44965), 81L (AFA44987), 82L (AFA44988), and a region covering a noncoding sequence and the start of 13R (AFA44917). Amplification products were submitted for Sanger sequencing, and sequences were archived in GenBank (see Supplemental Experimental Procedures).

lines). Ranavirus infection and disease were first observed in the Picos de Europa National Park in 2005 (see Multispecies Host Declines). Trends are also shown for all other sites where monitoring of *Alytes obstetricans*, *Mesotriton alpestris*, and *Bufo bufo* has been ongoing but CMTV is assumed to be absent due to molecular screening and/or the absence of disease and mass mortality events (gray lines). Circles denote counts for adults or tadpoles; Squares denote counts for egg masses. See also Table S1.

### Phylogenetics

Sequences were aligned with Prank v.100802 [38] and manually edited in Jalview 2.8 [39] to remove gaps. Additional sequences used in alignments and phylogeny construction (listed in the Figure 2 legend) were downloaded from the NCBI nucleotide database. Trees were constructed with MrBayes 3.2.2 [40] and RAxML 7.7.2 [41] using the GTR model of nucleotide substitution. Rate variation among sites was modeled by a discrete gamma distribution with four categories. Default settings were used for Markov chain Monte Carlo (MCMC) analysis in MrBayes (1,000,000 generations, 4 chains, 2 runs, sample frequency = 500, and a 25% burn-in). Twenty maximum-likelihood trees were generated on distinct starting trees in RAxML; 100 bootstrap replicates were calculated and annotated on the best maximum-likelihood tree.

### Population Monitoring and Analyses

Annual counts of amphibian populations have been conducted in the PNPE (Table S1A) since 2007. Methodology and life history stage targeted varied with the size and situation of the water body but remained consistent for each site across yearly surveys. Data were analyzed for overall trends in population size using TRIM3.0 [42].

### Accession Numbers

GenBank accession numbers by sample and locus are provided in the Supplemental Experimental Procedures.

### Supplemental Information

Supplemental Information includes two figures, one table, and Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.028>.

### Author Contributions

S.J.P. and J.B. carried out fieldwork in the PNPE. C.A. carried out fieldwork in Galicia. J.B. and A.M.-C.d.A. organized and supervised the collection of population data, and J.B. analyzed these data. S.J.P. carried out molecular screening, processed samples for sequencing, and carried out phylogenetic analyses. R.A.N. and F.B. advised on phylogenetic analyses and interpretation. S.J.P. and T.W.J.G. prepared the manuscript, which was edited by all authors.

### Acknowledgments

We thank the PNPE ranger team (J.J. Alonso, I. Alonso, M.A. Bermejo, S. Casares, M. Díaz, J.E. Díez, P. Fernández, M. Fernández, S. González, S. Marquinez, J.J. Martínez, J.L. Mosquera, C. Obeso, F. Rojo, A. Tejedor, and R. Varona) for performing population monitoring surveys. The Consejería de Medio Ambiente of Galicia and the director of the PNPE extended permits for fieldwork. This work was supported by Natural Environment Research Council grant NE/G011885/1, the Systematics and Taxonomy (SynTax) research scheme administered by the Linnean Society of London, the Fundación General CSIC, Banco Santander, and European Research Council grant 260801-BIG-IDEA. We thank Florent Lasalle, Rob Knell, Steve Paterson, and three anonymous reviewers for helpful comments during manuscript preparation and Gonçalo M. Rosa for sharing high-resolution host images.

Received: May 28, 2014

Revised: August 13, 2014

Accepted: September 9, 2014

Published: October 16, 2014

### References

1. LaDeau, S.L., Kilpatrick, A.M., and Marra, P.P. (2007). West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations. *Nature* 447, 710–713.
2. Fisher, M.C., Garner, T.W.J., and Walker, S.F. (2009). Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 291–310.
3. Lembo, T., Haydon, D.T., Velasco-Villa, A., Rupprecht, C.E., Packer, C., Brandão, P.E., Kuzmin, I.V., Fooks, A.R., Barrat, J., and Cleaveland, S. (2007). Molecular epidemiology identifies only a single rabies virus variant circulating in complex carnivore communities of the Serengeti. *Proc. Biol. Sci.* 274, 2123–2130.
4. Frick, W.F., Pollock, J.F., Hicks, A.C., Langwig, K.E., Reynolds, D.S., Turner, G.G., Butchkoski, C.M., and Kunz, T.H. (2010). An emerging disease causes regional population collapse of a common North American bat species. *Science* 329, 679–682.
5. Balseiro, A., Dalton, K.P., del Cerro, A., Marquez, I., Cunningham, A.A., Parra, F., Prieto, J.M., and Casais, R. (2009). Pathology, isolation and molecular characterisation of a ranavirus from the common midwife toad *Alytes obstetricans* on the Iberian Peninsula. *Dis. Aquat. Organ.* 84, 95–104.
6. Balseiro, A., Dalton, K.P., del Cerro, A., Márquez, I., Parra, F., Prieto, J.M., and Casais, R. (2010). Outbreak of common midwife toad virus in alpine newts (*Mesotriton alpestris cyreni*) and common midwife toads (*Alytes obstetricans*) in northern Spain: a comparative pathological study of an emerging ranavirus. *Vet. J.* 186, 256–258.
7. Cunningham, A.A., Langton, T.E.S., Bennett, P.M., Lewin, J.F., Drury, S.E.N., Gough, R.E., and Macgregor, S.K. (1996). Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 351, 1539–1557.
8. Une, Y., Sakuma, A., Matsueda, H., Nakai, K., and Murakami, M. (2009). Ranavirus outbreak in North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*), Japan, 2008. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1146–1147.
9. Kik, M., Martel, A., Sluijs, A.S., Pasmans, F., Wohlsein, P., Gröne, A., and Rijks, J.M. (2011). Ranavirus-associated mass mortality in wild amphibians, the Netherlands, 2010: a first report. *Vet. J.* 190, 284–286.
10. Sharifian-Fard, M., Pasmans, F., Adriaensen, C., Devisscher, S., Adriaens, T., Louette, G., and Martel, A. (2011). Ranaviruses in invasive bullfrogs, Belgium. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 2371–2372.
11. Green, D.E., Converse, K.A., and Schrader, A.K. (2002). Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the USA, 1996–2001. *Ann. N Y Acad. Sci.* 969, 323–339.
12. Ariel, E., Kielgast, J., Svart, H.E., Larsen, K., Tapiovaara, H., Jensen, B.B., and Holopainen, R. (2009). Ranavirus in wild edible frogs *Pelophylax kl. esculentus* in Denmark. *Dis. Aquat. Organ.* 85, 7–14.
13. Xu, K., Zhu, D.-Z., Wei, Y., Schloegel, L.M., Chen, X.-F., and Wang, X.-L. (2010). Broad distribution of Ranavirus in free-ranging *Rana dybowskii* in Heilongjiang, China. *EcoHealth* 7, 18–23.
14. Cullen, B.R., and Owens, L. (2002). Experimental challenge and clinical cases of Bohle iridovirus (BIV) in native Australian anurans. *Dis. Aquat. Organ.* 49, 83–92.
15. Fox, S.F., Greer, A.L., Torres-Cervantes, R., and Collins, J.P. (2006). First case of ranavirus-associated morbidity and mortality in natural populations of the South American frog *Atelognathus patagonicus*. *Dis. Aquat. Organ.* 72, 87–92.
16. Greer, A.L., Berrill, M., and Wilson, P.J. (2005). Five amphibian mortality events associated with ranavirus infection in south central Ontario, Canada. *Dis. Aquat. Organ.* 67, 9–14.
17. Jancovich, J.K., Davidson, E.W., Morado, J.F., Jacobs, B.L., and Collins, J.P. (1997). Isolation of a lethal virus from the endangered tiger salamander *Ambystoma tigrinum stebbinsi*. *Dis. Aquat. Organ.* 31, 161–167.
18. Gray, M.J., Miller, D.L., and Hoverman, J.T. (2009). Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. *Dis. Aquat. Organ.* 87, 243–266.
19. Teacher, A.G.F., Cunningham, A.A., and Garner, T.W.J. (2010). Assessing the long-term impact of Ranavirus infection in wild common frog populations. *Anim. Conserv.* 13, 514–522.
20. Lesbarrères, D., Balseiro, A., Brunner, J., Chinchar, V.G., Duffus, A., Kerby, J., Miller, D.L., Robert, J., Schock, D.M., Waltzek, T., and Gray, M.J. (2012). Ranavirus: past, present and future. *Biol. Lett.* 8, 481–483.
21. Gantress, J., Maniero, G.D., Cohen, N., and Robert, J. (2003). Development and characterization of a model system to study amphibian immune responses to iridoviruses. *Virology* 311, 254–262.
22. Bosch, J., Martínez-Solano, I., and García-Paris, 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.
23. Mavian, C., López-Bueno, A., Balseiro, A., Casais, R., Alcamí, A., and Alejo, A. (2012). The genome sequence of the emerging common midwife toad virus identifies an evolutionary intermediate within ranaviruses. *J. Virol.* 86, 3617–3625.
24. Ayres, C. (2012). Scavenging in the genus *Natrix*. *Acta Herpetol.* 7, 171–174.

25. Hoverman, J.T., Gray, M.J., Haislip, N.A., and Miller, D.L. (2011). Phylogeny, life history, and ecology contribute to differences in amphibian susceptibility to ranaviruses. *EcoHealth* 8, 301–319.
26. Hoverman, J.T., Gray, M.J., and Miller, D.L. (2010). Anuran susceptibilities to ranaviruses: role of species identity, exposure route, and a novel virus isolate. *Dis. Aquat. Organ.* 89, 97–107.
27. Johnson, P.T.J., Preston, D.L., Hoverman, J.T., and Richgels, K.L.D. (2013). Biodiversity decreases disease through predictable changes in host community competence. *Nature* 494, 230–233.
28. Wood, C.L., Lafferty, K.D., DeLeo, G., Young, H.S., Hudson, P.J., and Kuris, A.M. (2014). Does biodiversity protect humans against infectious disease? *Ecology* 95, 817–832.
29. Parrish, C.R., Holmes, E.C., Morens, D.M., Park, E.-C., Burke, D.S., Calisher, C.H., Laughlin, C.A., Saif, L.J., and Daszak, P. (2008). Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 457–470.
30. Kassen, R. (2002). The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity. *J. Evol. Biol.* 15, 173–190.
31. Benmayor, R., Hodgson, D.J., Perron, G.G., and Buckling, A. (2009). Host mixing and disease emergence. *Curr. Biol.* 19, 764–767.
32. Woolhouse, M.E.J., Taylor, L.H., and Haydon, D.T. (2001). Population biology of multihost pathogens. *Science* 292, 1109–1112.
33. Bitter, W., Gerrits, H., Kieft, R., and Borst, P. (1998). The role of transferrin-receptor variation in the host range of *Trypanosoma brucei*. *Nature* 391, 499–502.
34. Smith, K.F., Acevedo-Whitehouse, K., and Pedersen, A.B. (2009). The role of infectious diseases in biological conservation. *Anim. Conserv.* 12, 1–12.
35. Teacher, A.G.F., Garner, T.W.J., and Nichols, R.A. (2009). Evidence for directional selection at a novel major histocompatibility class I marker in wild common frogs (*Rana temporaria*) exposed to a viral pathogen (*Ranavirus*). *PLoS ONE* 4, e4616.
36. Mao, J., Tham, T.N., Gentry, G.A., Aubertin, A., and Chinchar, V.G. (1996). Cloning, sequence analysis, and expression of the major capsid protein of the iridovirus frog virus 3. *Virology* 216, 431–436.
37. Boyle, D.G., Boyle, D.B., Olsen, V., Morgan, J.A., and Hyatt, A.D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis. Aquat. Organ.* 60, 141–148.
38. Löytynoja, A., and Goldman, N. (2005). An algorithm for progressive multiple alignment of sequences with insertions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 10557–10562.
39. Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., and Barton, G.J. (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–1191.
40. Huelsenbeck, J.P., and Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755.
41. Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312–1313.
42. Van Strien, A., Pannekoek, J., Hagemeyer, W., and Verstrael, T. (2000). A loglinear Poisson regression method to analyse bird monitoring data. *Bird Census News* 13, 33–39.



**ANEXO III: MODELO DE VIABILIDAD DE LA POBLACIÓN DE *ALYTES*  
*OBSTETRICANS* EN MOÑETAS**



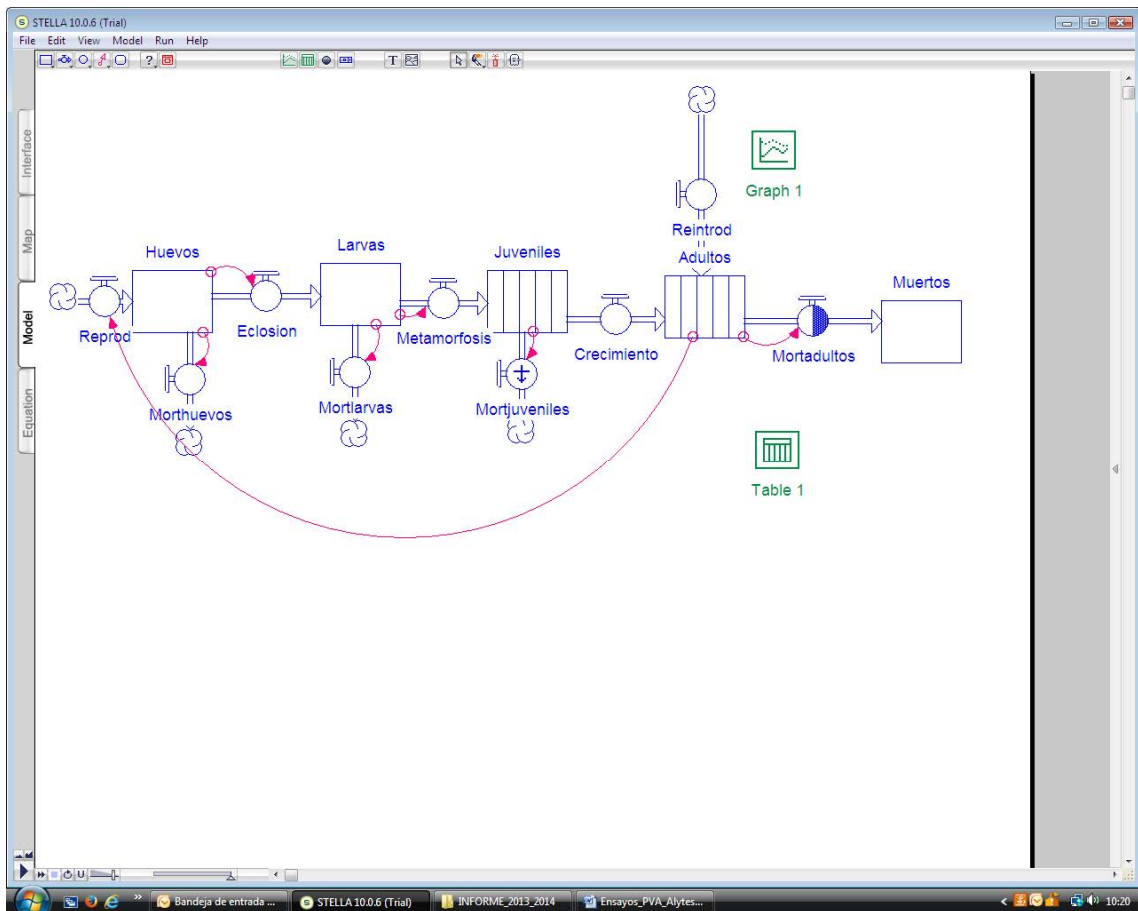
## MODELIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE *ALYTES OBSTETRICANS* EN MOÑETAS

SOFTWARE: Stella 10.0.6 (Trial)

<http://www.iseesystems.com>

### PARÁMETROS SITUACIÓN SALIDA CON 4.000 LARVAS

MODELO CON REINTRODUCCION 100 ADULTOS/AÑO (sin reintroducción se va a la extinción de adultos y de toda la población)



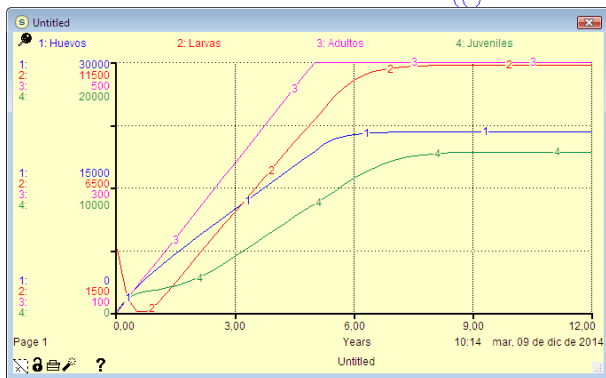
# ECUACIONES

The screenshot shows the STELLA 10.0.6 software interface with the 'Equation' tab selected. The equations are organized into sections: Interface, Map, Model, and Equation. The 'Equation' section contains the following text:

```
Huevos(t) = Huevos(t - dt) + (Reprod - Ecllosion - Morthuevos) * dt
INIT Huevos = 0
INFLOWS:
  ↳ Reprod = Adultos*65
OUTFLOWS:
  ↳ Ecllosion = Huevos*1
  ↳ Morthuevos = Huevos*0.5
Larvas(t) = Larvas(t - dt) + (Ecllosion - Metamorfosis - Mortlarvas) * dt
INIT Larvas = 4000
INFLOWS:
  ↳ Ecllosion = Huevos*1
OUTFLOWS:
  ↳ Metamorfosis = Larvas*1
  ↳ Mortlarvas = Larvas*0.9
Muertos(t) = Muertos(t - dt) + (Mortadultos) * dt
INIT Muertos = 0
INFLOWS:
  ↳ Mortadultos = CONVEYOR OUTFLOW
Adultos(t) = Adultos(t - dt) + (Crecimiento + Reintrod - Mortadultos) * dt
INIT Adultos = 100
TRANSIT TIME = 5
CAPACITY =
INFLOW LIMIT =
INFLOWS:
  ↳ Crecimiento = CONVEYOR OUTFLOW
  ↳ Reintrod = 100
OUTFLOWS:
  ↳ Mortadultos = CONVEYOR OUTFLOW
Juveniles(t) = Juveniles(t - dt) + (Metamorfosis - Crecimiento - Mortjuveniles) * dt
INIT Juveniles = 130
TRANSIT TIME = 2
CAPACITY = INF
INFLOW LIMIT = INF
INFLOWS:
  ↳ Metamorfosis = Larvas*1
OUTFLOWS:
  ↳ Crecimiento = CONVEYOR OUTFLOW
  ↳ Mortjuveniles = LEAKAGE OUTFLOW
  ↳ LEAKAGE FRACTION = Juveniles*0.4
  ↳ LEAK_ZONE = 0% to 100%
```

The Windows taskbar at the bottom shows the following open applications: 'Bandeja de entrada...', 'STELLA 10.0.6 (Trial)', 'INFORME\_2013\_2014', and 'Ensayos\_PVA\_Alytes...'. The system clock indicates the time is 10:21.

# GRÁFICA



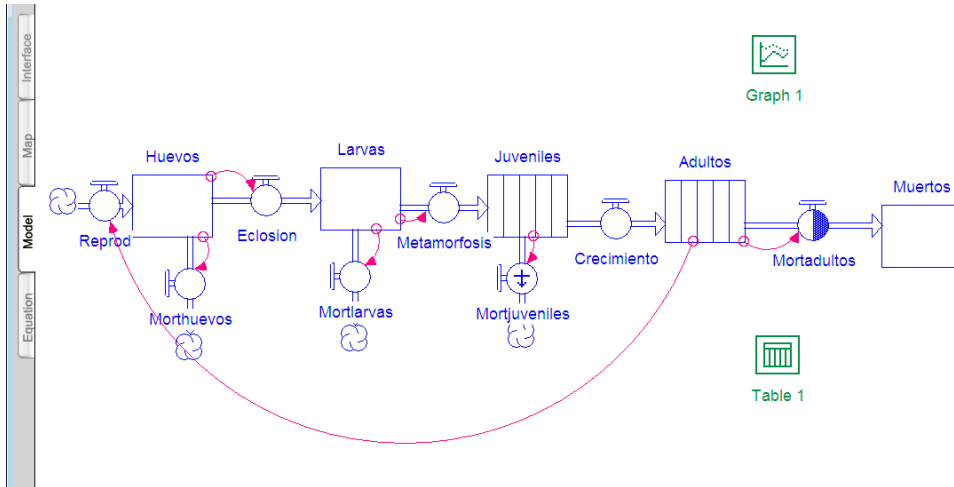
# TABLA

The screenshot shows the STELLA 10.0.6 interface with a stock-and-flow diagram on the left and a data table on the right. The diagram includes stocks for 'Huevos', 'Larvas', 'Adultos', and 'Juveniles', and flows for 'Reprod', 'Ecloti', and 'Morthuevos'. The table below provides numerical data for these variables over time.

Years	Huevos	Larvas	Adultos	Juveniles
1.25	8182.73	2399.02	200.00	18327.44
1.50	7101.99	2728.98	220.00	2138.40
1.75	8019.98	3207.08	240.00	2399.20
2.00	8368.47	3687.11	260.00	2686.42
2.25	8782.30	4182.88	280.00	3021.04
2.50	10870.50	4633.89	300.00	3472.07
2.75	11544.06	5100.51	320.00	3978.98
3.00	12418.04	5583.85	340.00	4500.02
3.25	13284.40	6024.89	360.00	5028.48
3.50	14152.78	6484.06	380.00	5585.23
3.75	15020.47	6942.32	400.00	6078.18
4.00	15887.78	7389.84	420.00	6600.27
4.25	16754.87	7886.88	440.00	7119.02
4.50	17621.78	8313.67	460.00	7638.00
4.75	18488.02	8770.07	480.00	8151.73
5.00	19355.39	9226.44	500.00	8665.58
5.25	20222.12	9682.73	500.00	9180.84
5.50	20763.32	10138.96	500.00	9594.72
5.75	21102.39	10513.81	500.00	10026.33
6.00	21313.99	10785.40	500.00	10501.47
6.25	21448.25	10988.08	500.00	11053.38
6.50	21528.90	11134.81	500.00	11648.94
6.75	21580.58	11227.84	500.00	11881.80
7.00	21612.88	11288.76	500.00	12148.44
7.25	21633.03	11330.34	500.00	12384.76
7.50	21644.88	11358.88	500.00	12607.76
7.75	21649.53	11373.07	500.00	12814.83
8.00	21649.48	11384.56	500.00	12988.11
8.25	21649.53	11391.51	500.00	13137.24
8.50	21649.48	11395.93	500.00	13269.09
8.75	21649.58	11398.73	500.00	13390.30
9.00	21649.41	11400.50	500.00	13504.65
9.25	21649.88	11401.81	500.00	13613.47
9.50	21649.18	11402.32	500.00	13718.15
9.75	21649.38	11402.78	500.00	13822.73
10.00	21649.48	11403.04	500.00	13925.02
10.25	21649.58	11403.21	500.00	14025.47
10.50	21649.58	11403.32	500.00	14124.39
10.75	21649.62	11403.38	500.00	14221.97
11.00	21649.64	11403.44	500.00	14318.33
11.25	21649.68	11403.48	500.00	14413.56
11.50	21649.68	11403.48	500.00	14508.71
11.75	21649.68	11403.48	500.00	14602.80
Final	21649.68	11403.50	500.00	14695.86

## PARÁMETROS SITUACIÓN SALIDA CON LAS LARVAS QUE HABÍA ESTE AÑO (400 aprox)

### A) MODELO SIN REINTRODUCCION



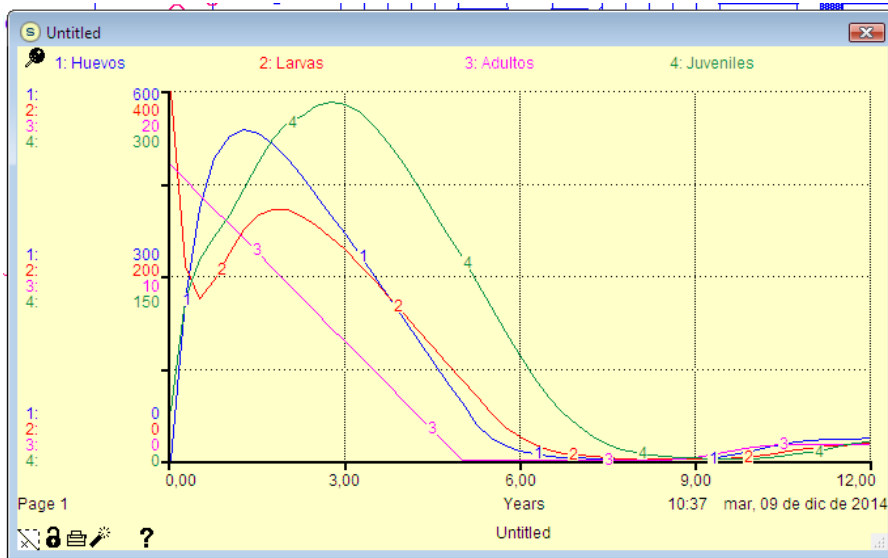
### ECUACIONES SIN REINTRODUCCIÓN

```

STELLA 10.0.6 (Trial)
File Edit View Equation Run Help

[ ] Huevos(t) = Huevos(t- dt) + (Repród - Ecllosion - Morthuevos) * dt
INIT Huevos = 0
INFLOWS:
  -> Repród = Adultos*65
OUTFLOWS:
  -> Ecllosion = Huevos*1
  -> Morthuevos = Huevos*0.5
[ ] Larvas(t) = Larvas(t- dt) + (Ecllosion - Metamorfosis - Mortlarvas) * dt
INIT Larvas = 400
INFLOWS:
  -> Ecllosion = Huevos*1
OUTFLOWS:
  -> Metamorfosis = Larvas*1
  -> Mortlarvas = Larvas*0.9
[ ] Muertos(t) = Muertos(t- dt) + (Mortadultos) * dt
INIT Muertos = 0
INFLOWS:
  -> Mortadultos = CONVEYOR OUTFLOW
[ ] Adultos(t) = Adultos(t- dt) + (Crecimiento - Mortadultos) * dt
INIT Adultos = 16
TRANSIT TIME = 5
CAPACITY =
INFLOW LIMIT =
INFLOWS:
  -> Crecimiento = CONVEYOR OUTFLOW
OUTFLOWS:
  -> Mortadultos = CONVEYOR OUTFLOW
[ ] Juveniles(t) = Juveniles(t- dt) + (Metamorfosis - Crecimiento - Mortjuveniles) * dt
INIT Juveniles = 40
TRANSIT TIME = 2
CAPACITY = INF
INFLOW LIMIT = INF
INFLOWS:
  -> Metamorfosis = Larvas*1
OUTFLOWS:
  -> Crecimiento = CONVEYOR OUTFLOW
  -> Mortjuveniles = LEAKAGE OUTFLOW
  LEAKAGE FRACTION = Juveniles*0.4
  LEAK_ZONE = 0% to 100%
  
```

# GRÁFICA Y TABLA DE EVOLUCIÓN EN 12 AÑOS SIN REINTRODUCCION

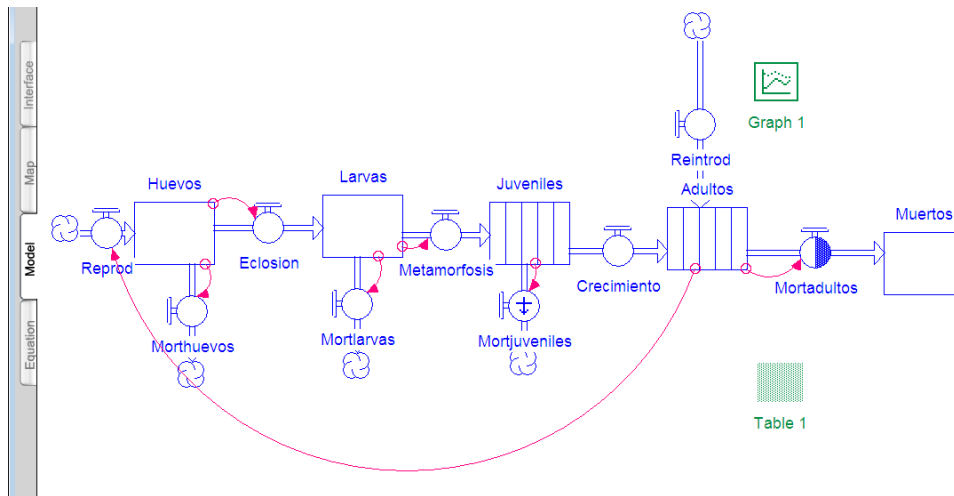


Untitled Table

10:37 09/12/2014 Table 1 (Untitled Table)

Years	Huevos	Larvas	Adultos	Juveniles				
1,50	530,94	285,46	11,20	242,46				
1,75	513,84	272,10	10,40	261,16				
2,00	490,15	271,31	9,60	274,35				
2,25	462,34	264,98	8,80	279,94				
2,50	431,96	254,70	8,00	287,98				
2,75	399,98	241,71	7,20	291,72				
3,00	366,99	226,89	6,40	289,74				
3,25	333,37	210,86	5,60	282,57				
3,50	299,35	194,05	4,80	271,33				
3,75	265,10	176,71	4,00	257,09				
4,00	230,89	159,05	3,20	240,75				
4,25	196,18	141,17	2,40	222,97				
4,50	161,81	123,16	1,60	204,23				
4,75	127,01	105,06	0,80	184,86				
5,00	92,38	88,91	0,00	165,08				
5,25	57,74	68,72	0,00	145,03				
5,50	36,09	50,51	0,00	124,80				
5,75	22,65	35,54	0,00	104,47				
6,00	14,10	24,30	0,00	84,87				
6,25	8,81	16,28	0,00	66,88				
6,50	5,51	10,75	0,00	51,09				
6,75	3,44	7,02	0,00	37,83				
7,00	2,15	4,55	0,00	27,14				
7,25	1,34	2,92	0,00	18,91				
7,50	0,84	1,67	0,00	12,63				
7,75	0,53	1,19	0,00	8,56				
8,00	0,33	0,76	0,00	5,63				
8,25	0,21	0,48	0,00	3,66				
8,50	0,13	0,30	0,00	2,37				
8,75	0,08	0,19	0,02	1,55				
9,00	0,34	0,12	0,11	1,13				
9,25	2,04	0,15	0,25	0,85				
9,50	5,36	0,59	0,40	0,66				
9,75	9,87	1,65	0,54	0,62				
10,00	14,95	3,33	0,66	0,89				
10,25	20,01	5,49	0,75	1,59				
10,50	24,63	7,88	0,81	2,76				
10,75	28,52	10,30	0,81	4,32				
11,00	30,98	12,54	0,81	6,27				
11,25	32,48	14,32	0,81	8,47				
11,50	33,43	15,64	0,81	10,73				
11,75	34,02	16,57	0,81	12,85				
Final	34,39	17,20	0,81	14,72				

## B) MODELO CON REINTRODUCCIÓN DE 100 ADULTOS/AÑO



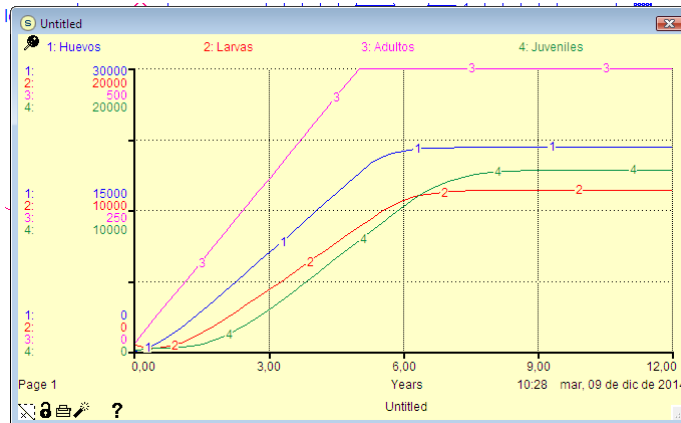
## ECUACIONES

```

STELLA 10.0.6 (Trial)
File Edit View Equation Run Help

[ ] Huevos(t) = Huevos(t - dt) + (Reprrod - Ecllosion - Morthuevos) * dt
INIT Huevos = 0
INFLOWS:
  +< Reprrod = Adultos*65
OUTFLOWS:
  +< Ecllosion = Huevos*1
  +< Morthuevos = Huevos*0.5
[ ] Larvas(t) = Larvas(t - dt) + (Ecllosion - Metamorfosis - Mortlarvas) * dt
INIT Larvas = 400
INFLOWS:
  +< Ecllosion = Huevos*1
OUTFLOWS:
  +< Metamorfosis = Larvas*1
  +< Mortlarvas = Larvas*0.9
[ ] Muertos(t) = Muertos(t - dt) + (Mortadultos) * dt
INIT Muertos = 0
INFLOWS:
  +< Mortadultos = CONVEYOR OUTFLOW
[ ] Adultos(t) = Adultos(t - dt) + (Crecimiento + Reintrod - Mortadultos) * dt
INIT Adultos = 16
TRANSIT TIME = 5
CAPACITY =
INFLOW LIMIT =
INFLOWS:
  +< Crecimiento = CONVEYOR OUTFLOW
  +< Reintrod = 100
OUTFLOWS:
  +< Mortadultos = CONVEYOR OUTFLOW
[ ] Juveniles(t) = Juveniles(t - dt) + (Metamorfosis - Crecimiento - Mortjuveniles) * dt
INIT Juveniles = 40
TRANSIT TIME = 2
CAPACITY = INF
INFLOW LIMIT = INF
INFLOWS:
  +< Metamorfosis = Larvas*1
OUTFLOWS:
  +< Crecimiento = CONVEYOR OUTFLOW
  +< Mortjuveniles = LEAKAGE OUTFLOW
    LEAKAGE FRACTION = Juveniles*0.4
    LEAK ZONE = 0% to 100%
  
```

# GRAFICA Y TABLA RESULTADOS



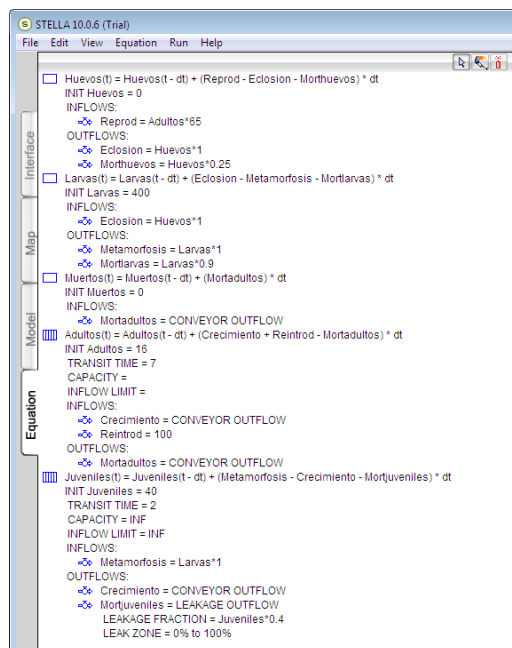
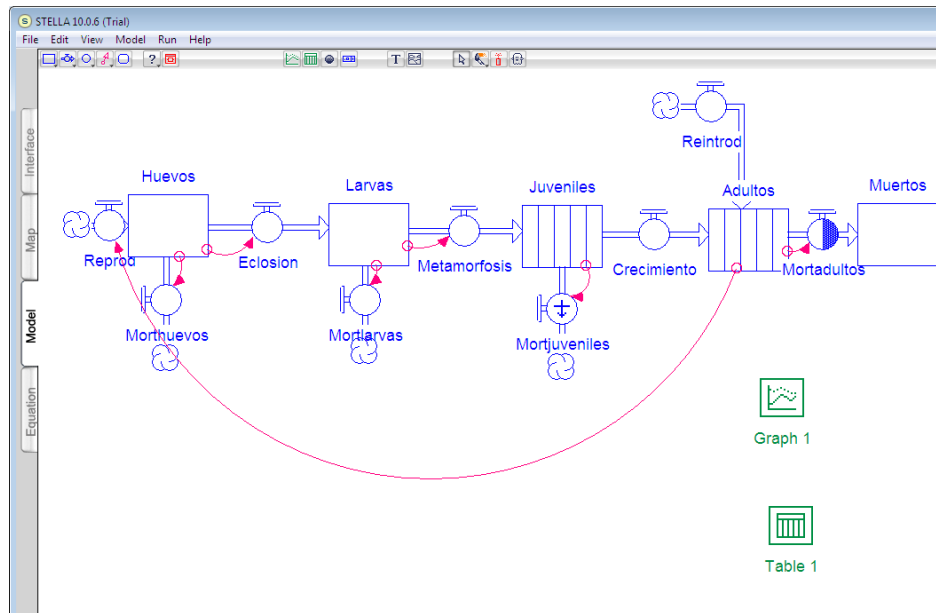
Years	Huevos	Larvas	Adultos	Juveniles
1.25	3.340,79	888,98	137,00	323,19
1.50	4.314,24	1.301,90	181,20	491,29
1.75	5.315,90	1.782,08	185,40	736,97
2.00	6.335,19	2.254,06	209,60	1.056,10
2.25	7.365,49	2.787,18	233,80	1.445,29
2.50	8.402,66	3.294,14	259,00	1.904,81
2.75	9.444,18	3.830,09	282,20	2.416,17
3.00	10.488,38	4.371,84	308,40	2.984,04
3.25	11.534,23	4.917,31	330,60	3.636,92
3.50	12.581,14	5.485,14	354,80	4.126,55
3.75	13.628,71	6.014,49	379,00	4.727,25
4.00	14.676,70	6.584,78	403,20	5.335,19
4.25	15.724,93	7.115,89	427,40	5.947,82
4.50	16.773,33	7.686,97	451,60	6.563,46
4.75	17.821,83	8.218,49	475,80	7.181,03
5.00	18.870,40	8.770,17	500,00	7.799,83
5.25	19.919,00	9.321,94	500,00	8.419,41
5.50	20.574,37	9.873,77	500,00	9.039,49
5.75	20.983,98	10.327,32	500,00	9.659,88
6.00	21.239,99	10.687,84	500,00	10.255,89
6.25	21.399,99	10.910,81	500,00	10.802,25
6.50	21.500,00	11.078,07	500,00	11.281,09
6.75	21.562,50	11.190,99	500,00	11.683,19
7.00	21.601,66	11.265,89	500,00	12.008,93
7.25	21.625,98	11.314,98	500,00	12.256,51
7.50	21.641,23	11.346,88	500,00	12.440,37
7.75	21.650,77	11.367,41	500,00	12.569,91
8.00	21.656,73	11.380,58	500,00	12.658,59
8.25	21.660,46	11.388,99	500,00	12.718,00
8.50	21.662,79	11.394,33	500,00	12.757,26
8.75	21.664,24	11.397,72	500,00	12.782,92
9.00	21.665,15	11.399,88	500,00	12.799,53
9.25	21.665,72	11.401,22	500,00	12.810,22
9.50	21.666,07	11.402,07	500,00	12.817,07
9.75	21.666,30	11.402,80	500,00	12.821,43
10.00	21.666,44	11.402,94	500,00	12.824,20
10.25	21.666,52	11.403,15	500,00	12.825,95
10.50	21.666,58	11.403,29	500,00	12.827,06
10.75	21.666,61	11.403,37	500,00	12.827,76
11.00	21.666,63	11.403,42	500,00	12.828,20
11.25	21.666,64	11.403,45	500,00	12.828,48
11.50	21.666,65	11.403,47	500,00	12.828,65
11.75	21.666,66	11.403,49	500,00	12.828,76
Final	21.666,66	11.403,50	500,00	12.828,83



## ENSAYO DESPUÉS DE HABLAR CON JAIME CORRIENDO:

Mortalidad huevos: 0.25

Edad máxima adultos: 7 años





Years	Larvas	Adultos	Juveniles
1.50	1322.23	122.57	559.34
1.75	1396.95	187.00	775.38
2.00	2478.33	211.43	1138.44
2.25	3074.31	235.88	1583.88
2.50	3891.68	260.29	2083.10
2.75	4324.87	284.71	2687.34
3.00	4988.82	309.14	3298.38
3.25	6020.17	333.57	3988.91
3.50	6276.88	358.00	4659.75
3.75	6937.45	382.43	5370.51
4.00	7800.43	406.86	6083.88
4.25	8286.15	431.29	6828.08
4.50	8931.08	455.71	7584.42
4.75	9597.82	480.14	8307.03
5.00	10285.14	504.57	9082.89
5.25	10932.85	529.00	9800.20
5.50	11600.83	553.43	10548.21
5.75	12288.99	577.86	11289.21
6.00	12977.23	602.29	12048.87
6.25	13695.88	626.71	12800.98
6.50	14274.10	651.14	13542.43
6.75	14942.83	675.57	14304.28
7.00	15611.05	700.00	15088.80
7.25	16279.81	700.00	15807.82
7.50	16948.18	700.00	16589.80
7.75	17517.47	700.00	17311.84
8.00	17986.45	700.00	18039.10
8.25	18308.38	700.00	18714.88
8.50	18584.24	700.00	19317.84
8.75	18733.87	700.00	19858.08
9.00	18881.40	700.00	20288.87
9.25	18991.52	700.00	20698.84
9.50	19014.68	700.00	21072.47
9.75	19058.73	700.00	21488.70
10.00	19089.35	700.00	21911.35
10.25	19110.58	700.00	21313.80
10.50	19135.28	700.00	21788.87
10.75	19138.41	700.00	21438.74
11.00	19142.41	700.00	21472.31
11.25	19147.23	700.00	21487.07
11.50	19150.58	700.00	21514.24
11.75	19152.88	700.00	21528.19
Final	19154.42	700.00	21534.88

Metiendo los parámetros corregidos con lo que dice Jaime, el modelo se estabiliza también a los 7 años pero con 700 adultos, 21000 juveniles y 19000 larvas.



#### **ANEXO IV: CALENDARIO DE MUESTREOS 2015**

**CALENDARIO 2015 SEGUIMIENTO MARIPOSAS Y ANFIBIOS P.N. PICOS DE EUROPA**

MUESTREO	DÍAS							MES	OBSERVACIONES
	L	M	X	J	V	S	D		
							1	<b>FEBRERO</b>	Comenzar Rana bermeja en todas localidades!
2	3	4	5	6	7	8			
9	10								
			11	12	13	14	15	<b>FEBRERO</b>	
16	17	18	19	20					
						21	22	<b>FEBRERO</b>	
23	24	25	26	27	28				
							1	<b>MARZO</b>	
2	3	4	5	6	7	8			
9	10								
			11	12	13	14	15	<b>MARZO</b>	
16	17	18	19	20					
						21	22	<b>MARZO</b>	Comenzar Tritón jaspeado en todas localidades!
23	24	25	26	27	28	29			
30	31								
			1	2	3	4	5	<b>ABRIL</b>	Comenzar todo zona Lagos y Riega Cabañes
6	7	8	9	10					
						11	12	<b>ABRIL</b>	Comenzar Ctra. Pontón y Charca Pontón
13	14	15	16	17	18	19			
20									
		21	22	23	24	25	26	<b>ABRIL</b>	Comenzar Charcas Valle Cable
27	28	29	30						
					1	2	3	<b>MAYO</b>	
4	5	6	7	8	9	10			

**CALENDARIO 2015 SEGUIMIENTO MARIPOSAS Y ANFIBIOS P.N. PICOS DE EUROPA**

MUESTREO	DÍAS							MES	OBSERVACIONES
	L	M	X	J	V	S	D		
<b>1</b>	12	13	14	15	16	17	18	<b>MAYO</b>	Comenzar Pozu Llau y Vau los Lobos. Empezar MARIPOSAS!
<b>2</b>	19	20	21	22	23	24	25	<b>MAYO</b>	
<b>3</b>	26	27	28	29	30	31		<b>MAYO</b>	
<b>3</b>	2	3	4	5	6	7	8	<b>JUNIO</b>	Comenzar Llago Bajero, Lloroza, Moñetas y Ándara
<b>4</b>	9	10	11	12	13	14	15	<b>JUNIO</b>	
<b>5</b>	16	17	18	19	20	21	22	<b>JUNIO</b>	
<b>6</b>	23	24	25	26	27	28	29	<b>JUNIO</b>	
<b>7</b>	30							<b>JUNIO</b>	
<b>8</b>		1	2	3	4	5	6	<b>JULIO</b>	
<b>9</b>	7	8	9	10				<b>JULIO</b>	
<b>10</b>					11	12	13	<b>JULIO</b>	
<b>11</b>	14	15	16	17	18	19	20	<b>JULIO</b>	
<b>12</b>	21	22	23	24	25	26	27	<b>JULIO</b>	
<b>13</b>	28	29	30	31				<b>JULIO</b>	
<b>9</b>	4	5	6	7	8	9	10	<b>AGOSTO</b>	
<b>10</b>	11	12	13	14	15	16	17	<b>AGOSTO</b>	
<b>11</b>	18	19	20					<b>AGOSTO</b>	
<b>12</b>	21	22	23	24	25	26	27	<b>AGOSTO</b>	
<b>13</b>	25	26	27	28	29	30	31	<b>AGOSTO</b>	
<b>14</b>	1	2	3	4	5	6	7	<b>SEPTIEMBRE</b>	
<b>15</b>	8	9	10					<b>SEPTIEMBRE</b>	
<b>16</b>				11	12	13	14	<b>SEPTIEMBRE</b>	
<b>17</b>	15	16	17	18	19	20	21	<b>SEPTIEMBRE</b>	Última visita para estimar invernantes <i>Alytes</i> !
<b>18</b>	22	23	24	25	26	27	28	<b>SEPTIEMBRE</b>	
<b>19</b>	29	30						<b>SEPTIEMBRE</b>	