

# BASES PARA LA CONSERVACIÓN DE LAS RANAS PARDAS, RANA PYRENAICA Y RANA TEMPORARIA, EN EL PIRINEO

DAVID R. VIEITES<sup>1,2,3\*</sup>, MARCOS PESO FERNÁNDEZ<sup>1</sup>, SANDRA NIETO ROMÁN<sup>1,3</sup>

## RESUMEN

En los Pirineos coexisten dos especies de ranas pardas, la rana bermeja (*Rana temporaria*) y la rana pirenaica (*Rana pyrenaica*), esta última en peligro de extinción. Si bien para la primera hay muchos datos de su situación actual y biología, la situación actual de la pirenaica se desconoce en gran medida. En este proyecto se ha realizado un trabajo de campo intenso que nos ha permitido recabar datos de genética, morfometría, densidad poblacional, distribución, conectividad espacial y estado de poblaciones de rana pirenaica, así como datos de conectividad, genética y fenología de la rana bermeja en el Pirineo. La diversidad genética espacial de la rana bermeja es mayor de lo esperado, habiendo encontrado dos linajes nuevos en Iberia, uno de ellos endémico de Aragón, siendo el más basal de todos los de esta especie. Este linaje coexiste con otro más común, habiendo sido localizado solo en la zona de Benasque. La rana pirenaica es muy homogénea genéticamente, tanto empleando genomas mitocondriales como en marcadores nucleares, y probablemente ha sufrido un cuello de botella con posterior expansión geográfica recientemente. Las diferencias entre el núcleo oriental y occidental son mínimas, y ha existido un flujo genético reciente entre poblaciones. En cuanto al estado de conservación, nos hemos concentrado principalmente en la rana pirenaica, por ser un endemismo en peligro de extinción cuyo estado actual se desconocía en gran medida. Hemos incrementado el área de distribución conocida de esta especie con nuevas localidades, si bien varias poblaciones históricas han desaparecido por causas desconocidas. El tamaño poblacional estimado es bajo en muchas localidades, por lo que la probabilidad de extinción local es elevada. Los modelos de conectividad espacial sugieren una cierta fragmentación, con siete unidades desconectadas recientemente entre sí, y una separación efectiva entre el núcleo oriental y occidental de la especie, si bien la conectividad dentro de estas unidades parece elevada. Se ha detectado la presencia masiva del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* en todo el área de distribución de rana pirenaica, si bien su impacto en la especie es desconocido. El monitoreo de la fenología de puesta en ranas pardas sugiere que se adelanta más de un mes y medio en años cálidos frente a años fríos, siendo también la mortalidad de larvas mayor especialmente en arroyos poco profundos. El análisis de las series históricas de estaciones meteorológicas del Pirineo Central indica que en el futuro las condiciones climáticas serán más cálidas, lo que sugiere que las ranas se reproducirán antes y se deberán enfrentar a condiciones de sequía estival. Hay diferencias importantes entre los modelos de conectividad incorporando el clima entre años con poca nieve y mucha nieve, con implicaciones en el futuro de estas poblaciones considerando el Cambio Global. Los datos obtenidos confirman a rana pirenaica como en peligro de extinción. Se proponen una serie de medidas de gestión para la conservación *in situ* y *ex situ* de la especie, así como unidades de gestión en toda el área de distribución. Este trabajo ha permitido identificar

<sup>1</sup> Museo Nacional de Ciencias Naturales – CSIC. C/José Gutiérrez Abascal 2, 28006, Madrid.

<sup>2</sup> CIBIO-InBIO, Universidade do Porto, Campus Agrário de Vairão, Rua Padre Armando Quintas, 4485-661 Vairão, Portugal

<sup>3</sup> BioCoRe S. Coop. Calle Zurbarán 16, Collado Mediano, Madrid.

\* E-mail: vieites@mncn.csic.es - Teléfono: 91 4111328 ext 1219

medidas de gestión de estas especies así como valorar su situación actual de conservación, las cuales esperamos que sirvan de ayuda a la gestión de la especie en Navarra y Aragón y especialmente en el Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido que es el único que alberga poblaciones de rana pirenaica.

**Palabras clave:** *Rana pyrenaica*, *Rana temporaria*, Pirineos, distribución, conectividad, diversidad genética, cambio global, conservación, Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido.

## **BASES FOR THE CONSERVATION OF BROWN FROGS, RANA PYRENAICA AND RANA TEMPORARIA, IN THE PYRENEES.**

### **SUMMARY**

Two brown frog species occur in the Pyrenees, the European common frog (*Rana temporaria*) and the Pyrenean frog (*Rana pyrenaica*), which is Endangered. Although for the common frog a lot of data are available for its biology and current situation, the actual situation of the Pyrenean frog is mostly unknown. In this project, intense fieldwork was done in order to get data on the genetics, morphometry, population density, distribution, spatial connectivity and conservation status of the Pyrenean frog, as well as data on the genetics, connectivity and phenology of the common frog in the Pyrenees. The spatial genetic diversity of the common frog is higher than expected, with two new lineages in Iberia, one of them endemic to Aragón, being the most basal of all in this species. This lineage coexists with another, being only known from the Benasque area so far. The Pyrenean frog is strongly homogeneous genetically, both considering complete mitochondrial genomes as well as with nuclear markers, suggesting that it has suffered a strong bottleneck followed by a recent geographic expansion. The genetic differences between the occidental and oriental populations are minimal, and there has been recent gene flow between populations. We have focused most of the conservation status work on the Pyrenean frog as it is an Endangered species, which current situation was unknown. We have incremented its distribution range with new localities for the species, although we also confirmed local extinctions in historical localities. Estimated population sizes are rather low in most localities, suggesting that the local probability of extinction is high. Spatial connectivity models suggest a certain degree of fragmentation, with seven identified units not connected, and an effective separation between the oriental and occidental range of the species. Connectivity seems high within these units. We have detected the presence of the quitrid fungus *Batrachomyxium dendrobatidis* in all the distribution range of the species, yet its impact is so far unknown. The monitoring of the breeding phenology in brown frogs suggests that in hot years they reproduce significantly earlier, which coincides with a higher larval mortality mainly in shallow streams that desiccate. The analysis of the historical series of meteorological stations for the Central Pyrenees suggests that future climatic conditions will be hotter, implying that frogs will breed earlier and should face summer drought conditions. There are important differences between connectivity models when incorporating climate of years with high or low snow cover, which has important implications in the future of these populations considering Global Change. Our data confirm that the species is Endangered. We propose some management actions for the *in-situ* and *ex-situ* conservation of the species, as well as management units. This work provides new data on the current situation and conservation status of these species, identifying key conservation and management measures to be done, which we expect they will help managers in Aragón and Navarra as well as in the Ordesa and Monte Perdido National Park, which is the only one harboring Pyrenean frog populations.

**Key words:** *Rana pyrenaica*, *Rana temporaria*, Pyrenees, distribution, connectivity, genetic diversity, global change, conservation, Ordesa National Park.

## INTRODUCCIÓN

Las oscilaciones climáticas ocurridas durante el Cuaternario, con múltiples periodos consecutivos de glaciación e interglaciares cálidos, han tenido un impacto profundo en la distribución, diversidad genética espacial, demografía y evolución de las especies actuales (ej. HEWITT 2004). En todos los grandes sistemas montañosos europeos, incluidos los españoles, se han observado algunos de los cambios más dramáticos y extremos tanto en la climatología como en el paisaje durante ese periodo. Los Alpes o Pirineos albergaron grandes glaciares los cuales se retrajeron durante los periodos interglaciares al incrementarse la temperatura global (CROWLEY & NORTH 1991; EHLERS & GIBBARD 2004), volviendo a crecer y extenderse en los subsiguientes periodos de glaciación.

La zona norte de la península Ibérica se ha visto particularmente afectada por estos cambios climáticos en el Pleistoceno (CROWLEY & NORTH 1991; ARRIBAS 2004). La cota de nieves perpetuas en la parte central de la cordillera Cantábrica se mantuvo en torno a los 750 m durante la última glaciación, mientras que en el Pirineo muchos circos glaciares permanecieron helados incluso en periodos interglaciares, con el nivel de nieves perpetuas en torno a los 1400-2000 m durante el último máximo glacial, muy por debajo del actual que está en torno a los 3000 m (UZQUIANO 1995; ARRIBAS 2004; EHLERS & GIBBARD 2004). En paralelo a este continuo avance y retroceso del hielo, la fauna y flora de estos sistemas montañosos ha tenido oportunidades de colonizar zonas de alta montaña cuando las condiciones fueron favorables, reduciéndose su distribución a zonas más bajas durante los periodos más fríos donde persistieron en zonas refugio, como valles profundos o zonas costeras con condiciones climáticas más favorables. La distribución y la estructura genética de muchas especies que habitan estas zonas actualmente se han visto perfiladas por los patrones de colonización desde las diferentes zonas refugio (ALEXANDRINO *et al.* 2000; GUILLAUME *et al.* 2000; GÓMEZ & LUNT 2007).

Los datos más recientes sobre la extensión de los glaciares en el último máximo glacial (EHLERS & GIBBARD 2004), sugieren que en el Pirineo las zonas glaciadas ocupaban una gran extensión, incluidos la gran mayoría de valles hasta cotas altitudinales bajas. Este escenario sugiere que la gran mayoría de especies se tuvieron que ver restringidas a zonas de baja altitud y que éstas tendrían un alto grado de interconexión a través de la depresión central que separa el Pirineo del pre-Pirineo. Esta conectividad facilitaría el flujo y mezcla genética entre las poblaciones de los diferentes valles dentro de cada vertiente, y supondría una desconexión significativa entre la vertiente francesa y la española. La homogeneidad genética para marcadores mitocondriales y alozimas en una serie de especies estaría de acuerdo con este modelo (CARRANZA & ARRIBAS 2008; CARRANZA & AMAT 2005; MONTORI *et al.* 2008; VEITH *et al.* 2002, 2010), y la existencia de poblaciones fósiles durante el Pleistoceno en zonas de baja altitud del pre-Pirineo se ha confirmado recientemente para *Rana temporaria* y para periodos del Holoceno en el tritón pirenaico (LOPEZ-GARCÍA *et al.* 2010). Sin embargo, la reconstrucción de la extensión glacial muestra también una gran multitud de zonas no glaciadas entre diferentes valles glaciares, que pudieron servir de refugio para poblaciones aisladas, permitir la persistencia de especies endémicas de distribución restringida y el mantenimiento de la diversidad fenotípica observada en muchas especies (e.g. CARRANZA *et al.* 2004; MILÁ *et al.* 2009; VENCES *et al.* 2013).

Desde el último máximo glacial se ha producido un incremento global de la temperatura del planeta, el cual se ha acelerado desde 1975, así como una importante transformación del medio ligada al hombre. Este cambio global ha permitido que muchas especies hayan colonizado zonas de la alta montaña Pirenaica en los últimos milenios y hayan establecido poblaciones estables en ellas. Estos cambios de distribución altitudinales han supuesto cambios demográficos considerables en muchas especies, en ocasiones extinciones poblacionales, y han proporcionado oportunidades para adaptaciones microevolutivas en esta cordillera (DUBOIS 1982; CARRANZA *et al.* 2004; CARRANZA & AMAT 2005; MONTORI *et al.* 2008; VEITH *et al.*

2002, 2010). Si bien muchas especies típicas de climas templados se encuentran también en zonas de la alta montaña Pirenaica, su historia natural y fenología son bastante diferentes entre estos dos ambientes. Entre ellas, varias especies de anfibios han sido ampliamente estudiadas, destacando la rana bermeja (*Rana temporaria*), mientras que de otras conocemos menos los aspectos de su biología, distribución e historia natural como la rana pirenaica (*Rana pyrenaica*). Ambas especies son ectotermas y presentan una capacidad de dispersión limitada. Ambas tienen poblaciones en zonas de baja y media montaña en el Pirineo, como resultado de una colonización post-glacial de zonas de montaña debida al calentamiento global del planeta desde la última glaciación, si bien pirenaica no llega a zonas de alta montaña como la rana bermeja (2100 vs 2600 m). La rana bermeja presenta una gran variabilidad morfológica en el Pirineo, la cual ha llevado incluso a varios autores a distinguir diferentes subespecies y morfotipos creando cierta confusión taxonómica, mientras que pirenaica fue durante largo tiempo confundida con *Rana iberica*, otro endemismo Ibérico (DUBOIS 1982, 1983; VEITH *et al.* 2002, 2003, 2010). A pesar de que ambas especies de ranas pardas se encuentran ampliamente distribuidas en el Pirineo central, existe un fuerte contraste entre ellas en cuanto a su historia natural, ecología, diversidad morfológica y potencialmente genética, que sugiere que los cambios ambientales pasados han podido afectar a ambas de forma diferente. Su distribución, historia natural y evolutiva particular los convierte en organismos-modelo idóneos para estudiar la impronta de las glaciaciones en su distribución, estructura genética y fenotípica, así como la conectividad y flujo genético entre poblaciones pirenaicas entre valles y en gradientes altitudinales.

La rana bermeja, *Rana temporaria*, es uno de los anfibios más ampliamente distribuidos en Europa. Su área de distribución abarca desde el oeste de España hasta el oeste de Siberia, llegando hasta el Cabo Norte en Escandinavia, y presenta un amplio rango altitudinal desde el nivel del mar hasta los 2700 m en los Alpes y en torno a los 2600 en los Pirineos (VENCES *et al.* 2003). A pesar de esta área de distribución tan amplia, en esta especie se han descrito pocos sublinajes muy diferenciados a es-

cala regional, si bien a nivel poblacional existe aparentemente una gran subdivisión (ej. REH & SEITZ 1990; HITCHINGS & BEEBEE 1997; PALO *et al.* 2004; SCHMELLER & MERILÄ 2007). Hasta el inicio de este proyecto, aparte de un grupo de poblaciones genéticamente muy divergentes en el Noroeste de la Península Ibérica, generalmente consideradas como la subespecie *R. t. parvipalmata* (VEITH *et al.* 2002), la especie típica (*R. t. temporaria*) se podía dividir básicamente en un linaje del Oeste que está restringido a los Pirineos y zonas adyacentes del Oeste y Centroeuropa, y otro del Este de Europa (PALO *et al.* 2004). La divergencia entre *R. t. parvipalmata* y *R. t. temporaria* se ha dado en el Pleistoceno, alrededor de 1.1 millones de años, siendo la diferenciación dentro de *R. t. temporaria* más reciente (VEITH *et al.* 2003).

En la Península Ibérica la especie se distribuye desde los Pirineos hasta el Oeste de Galicia, estando presente en toda la Cordillera Cantábrica. La subespecie *R. t. parvipalmata* se describió originalmente en base a su morfología, presentando una palmeadura de las patas y tamaño corporal reducido. La variabilidad morfológica observada en poblaciones Pirenaicas y regiones adyacentes es sorprendentemente elevada, lo cual ha dado lugar a hipótesis que sugieren la presencia de especies crípticas en esas zonas (ej. DUBOIS 1982). Por ejemplo, en muchas zonas de alta montaña las ranas son relativamente más pequeñas, con extremidades más cortas y un mayor porcentaje de melanismo (RIOBÓ *et al.* 2000). La tendencia hacia estos fenotipos en relación a la altitud es muy significativa y se repite tanto en el Pirineo como en los Alpes. Los datos existentes respecto a la fenología de la especie en montaña sugieren una separación efectiva entre las poblaciones de baja y alta montaña que no se solapan ni en el tiempo ni en el espacio (VEITES 2003).

Los especímenes de alta montaña han dado lugar a descripciones de nuevos taxones, los cuales se consideran actualmente sinónimos o subespecies, como *Rana temporaria canigonensis* del monte Canigou del Este de los Pirineos franceses o *Rana (temporaria) aragonensis* del Pirineo central (DUBOIS 1982, 1983; VEITH *et al.* 2002). En contraste, en las zonas bajas de Navarra y Aquitania existen

poblaciones con individuos más esbeltos y generalmente más grandes, con patas extremadamente largas (la articulación tibiotarsal sobrepasa la punta del hocico como en *Rana dalmatina*) y tímpanos relativamente más grandes. Estos especímenes se han denominado como “rana de Gasser” y su estatus taxonómico ha sido muy discutido (DUBOIS 1983). No obstante, los datos genéticos preliminares disponibles en base a ADN mitocondrial y alozimas (ARANO *et al.* 1993; VEITH *et al.* 2002, 2003), no muestran una diferenciación genética entre estas poblaciones morfológicamente diversas en el Pirineo, si bien los datos sugieren que no hay un flujo genético relevante entre poblaciones pirenaicas (VEITH *et al.* 2010).

La rana pirenaica (*Rana pyrenaica*) es una especie de rana parda de mediano tamaño endémica del Pirineo, que fue descrita recientemente (SERRA-COBO 1993), resolviendo la polémica de la presencia de *Rana iberica* en el Pirineo, a la que recuerda mucho morfológica y ecológicamente, aunque está más próxima filogenéticamente a la bermeja. Rana pirenaica es una especie eminentemente acuática, siendo su hábitat típico torrentes de montaña, de aguas rápidas frías y oxigenadas (SERRA-COBO 1993, 1997). Se la ha encontrado también ocasionalmente en abrevaderos, fuentes y charcas en las que existe renovación continua de agua (SERRA-COBO 1997, 2002; SERRA-COBO *et al.* 1998, 2000). El periodo reproductor en esta especie comienza tras el deshielo, entre febrero y abril. Las hembras depositan la puesta bajo piedras, vegetación, o en zonas del lecho del río donde la corriente es menos rápida (SERRA-COBO 1993; SERRA-COBO *et al.* 1998). Las larvas se encuentran en arroyos de aguas rápidas, generalmente en el fondo al amparo de la corriente (SERRA-COBO 1993) y permanecen en ellos hasta el verano. Los juveniles tras la metamorfosis se dispersan por los alrededores de los torrentes (SERRA-COBO *et al.* 1998), sin embargo se desconoce cuánto se dispersan los juveniles o adultos desde sus zonas de cría, pero esta dispersión debe ser limitada considerando su distribución fragmentada. Estos requerimientos ecológicos contrastan significativamente con los de *R. temporaria*, especie que se reproduce principalmente en charcas y lagos, evitando cursos de aguas rápidas.

*Rana pyrenaica* se distribuye en la vertiente sur del Pirineo central y occidental, desde el valle de Irati en Navarra hasta el Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido en Aragón. Existen varias localidades en Francia, en el bosque de Irati, pero cerca de la frontera con España (SERRA-COBO 1993; 1997, 2002; LLAMAS *et al.* 1994, 1998; ORTEGA-MARTÍNEZ & FERRER-JUSTES 2000; DUGUET & MELKI 2003), y recientemente se la ha encontrado en una localidad francesa más al norte (DUCHATEAU *et al.* 2012). Se distribuye generalmente desde los 1000 a 1800 metros de altitud (SERRA-COBO 1993; VENCES *et al.* 1997; SERRA-COBO *et al.* 1998, 2000), si bien el rango altitudinal abarca desde los 500 m a los 2100 m (VIEITES & VENCES 2003; DUCHATEAU *et al.* 2012). Mediante análisis de unos pocos individuos con ADN mitocondrial, se ha reportado una única mutación en el citocromo b, que sugiere un nivel de variabilidad genética muy bajo en la especie (CARRANZA & ARRIBAS 2008). Sin embargo, no existen datos genéticos para un número suficiente de ejemplares y poblaciones, que cubran el área de distribución de la especie, ni datos nucleares que confirmen esta baja variabilidad genética.

A finales de los años 90 y principios de los 2000, Serra-Cobo y colaboradores realizaron varios estudios para el gobierno de Aragón en los que cartografiaron detalladamente el área de distribución de la especie. Desde entonces no ha habido un estudio similar y se desconoce si ha habido cambios en la distribución de la especie. Sin embargo, observaciones aisladas de herpetólogos sugieren que la especie ya no se encuentra en algunas de las localidades donde estaba presente hace 10 años, ya que no se han encontrado larvas, las cuales se detectan muy fácilmente en verano, y se han observado adultos muertos en zonas de cría. La aparición y expansión de la quitridiomycosis, enfermedad fúngica que está diezmando especies de anfibios en todo el mundo, quizás sea la causa del posible declive de las poblaciones de esta especie, pero se carece de datos al respecto. Los datos disponibles de los 90 muestran una mayor densidad poblacional hacia la zona central de distribución de la especie, mientras que ésta era baja en poblaciones situadas en el límite oeste de distribución (Navarra), así como en zonas de baja altitud (LLA-

MAS *et al.* 1994; SERRA-COBO 2002). Tanto la UICN como revisiones recientes (Bosch *et al.* 2009), sugieren que la especie está en declive continuo, tanto en su área de ocupación, la extensión y calidad de su hábitat como en el número de localidades. Por este motivo está catalogada por la UICN como especie en peligro de extinción y a nivel peninsular también. Sin embargo, se desconoce si ha habido cambios significativos en el área de distribución de la especie, así como en las poblaciones naturales en la última década. Todavía no están claros los factores que limitan su distribución geográfica ni se ha evaluado el impacto potencial de cambios en sus hábitats típicos o el impacto potencial del Cambio Global en la especie. Considerando la falta de información actualizada acerca de la especie, así como los indicios de que sus poblaciones pueden estar sufriendo un importante declive, este proyecto se ha centrado en recabar datos que nos permitan evaluar la situación actual de esta especie en peligro de extinción, y desarrollar las bases para una estrategia de conservación que ayude en la toma de decisiones. El Parque Nacional de Ordesa juega un papel fundamental en la conservación de la especie pues es el único que alberga poblaciones de la misma.

En general, las hipótesis existentes hasta la fecha sugieren que las poblaciones de anfibios pirenaicos sufrieron contracciones poblacionales significativas en el Pleistoceno, con posterior expansión y mezcla en el Holoceno, basándose en la homogeneidad genética así como en el reducido número de alelos nucleares y haplotipos mitocondriales observados (ej. MONTORI *et al.* 2008; CARRANZA & ARRIBAS 2008; VEITH *et al.* 2010). Los resultados de Milá *et al.* (2009) con *Calotriton*, así como la elevada variabilidad morfológica observada en *R. temporaria*, sugieren un patrón caracterizado por un elevado grado de aislamiento entre poblaciones refugio, baja dispersión y limitado flujo genético durante el Pleistoceno. Las dos especies de ranas pardas presentes en el Pirineo presentan patrones de distribución, ecología e historia natural diferentes y es posible que la historia reciente de sus poblaciones haya sido también distinta, con un solo núcleo durante el Pleistoceno desde el que *R. pyrenaica* recolonizó el Pirineo, versus múltiples refugios en *R. temporaria*.

Una de las predicciones de los modelos de calentamiento global para especies de montaña es que tenderán a desplazarse hacia altitudes mayores a medida que la temperatura media se incrementa, y que las primaveras (deshielo) se adelantarán y los inviernos se retrasarán (MORITZ *et al.* 2008). En especies de reproducción explosiva como estas ranas pardas, que en el Pirineo se reproducen justo tras el deshielo, el adelantamiento de la primavera supondrá que se reproducirán antes, y que los periodos de actividad se alargarán en el tiempo. Afortunadamente, existen una serie de localidades en las que E. Balcells determinó la fenología de puesta de *Rana temporaria* entre las décadas de los 50 y 70 (BALCELLS 1976), así como datos de fenología de las mismas localidades de principios de siglo (VIEITES 2003), que abren la oportunidad de comparar con la presente década que está batiendo año tras año records de calentamiento. De esta forma podemos evaluar si existe una tendencia en el cambio de fenología de ranas pardas en el Pirineo, y su impacto potencial en la conectividad entre poblaciones.

En los últimos años se ha avanzado mucho en el marco teórico de la ecología del paisaje, especialmente en temas de conectividad espacial y aislamiento, que se han enriquecido con la incorporación de nuevos programas y análisis genéticos. Desde que Wright (1943) propusiese la idea de que a mayor distancia geográfica menor conectividad entre poblaciones y por tanto mayor diferenciación genética (conocido como "aislamiento por distancia"), se ha testado esta hipótesis en numerosos organismos, demostrando que es un fenómeno común. En el reciente campo de la genética del paisaje, se ha introducido el concepto de "aislamiento por resistencia" (MCRAE & BEIER 2007), que se define como la correlación entre distancias genéticas y distancias de "resistencias". Una matriz de resistencias es simplemente una clasificación del paisaje en una función de probabilidad de uso de los diferentes componentes del paisaje, de forma que en unos una especie podrá cruzarlos al 100% (0 resistencia) y otros serán barreras totales (100% resistencia). Esta relación no tiene que estar relacionada con la distancia geográfica, ya que muchas barreras son puntuales y están localizadas en sitios concretos.

Recientemente se ha introducido otro concepto nuevo que es el de “aislamiento por el medio ambiente” (IBE, Isolation By Environment). Se define como el patrón en el que la diferenciación genética entre poblaciones se incrementa en relación a diferencias ambientales, independientemente de la distancia geográfica (WANG & SUMMERS 2010; BRADBURD *et al.* 2013; SEXTON *et al.* 2014; WANG & BRADBURD 2014). En la reciente revisión de Wang & Bradburd (2014), se identifican los procesos que pueden generar IBE, que incluyen ejemplos de variación clinal de temperatura, selección natural o sexual en contra de inmigrantes, reducción del fitness de híbridos o dispersión sesgada entre hábitats. Una de las conclusiones a las que llegan es que la variación temporal en cambios en el medio ambiente que afecte a la conectividad entre poblaciones no se ha investigado suficientemente. Los estudios para los que hay datos se han centrado en series temporales con muestras de diferentes periodos de tiempo (datos históricos de museos frente a datos recientes). Sin embargo, todavía no hay estudios que incorporen la variación espacio-temporal fenológica, a lo largo de un mismo ciclo anual, que se dan en zonas de gradientes climáticos importantes como son los grandes sistemas montañosos. La incorporación del factor espacio-temporal nos permite elaborar diferentes escenarios de conectividad en función del clima, incorporando el impacto potencial del calentamiento global a la gestión de poblaciones.

En este proyecto nos hemos centrado en aclarar la situación actual, distribución, variación genética y morfológica, mortalidad y amenazas potenciales en rana pirenaica, la única especie de anfibio en peligro de extinción del Pirineo, integrando diferentes metodologías. Asimismo, se han generado datos genéticos y fenológicos que han servido para comparar los patrones de rana pirenaica con los de la rana bermeja. Para ambas especies se han generado modelos de conectividad espacial para el Pirineo, incorporando el componente temporal bajo dos escenarios reales climáticos, que nos permite evaluar el impacto del calentamiento global en la conectividad y supervivencia de poblaciones. Estos datos se discuten en el contexto de la estrategia de conservación

de rana pirenaica y el papel central que debe jugar el Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido en la misma.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Distribución y situación actual de la rana pirenaica en toda su área de distribución.**

Entre la primavera de 2010 hasta el otoño de 2013 se realizó un exhaustivo trabajo de campo en toda el área de distribución conocida de rana pirenaica en el Pirineo. Se han revisitado todas las localidades históricas donde se ha registrado la especie, recogidas en varios informes inéditos del Gobierno de Aragón desde 1997 a 2004 e informes del Gobierno de Navarra, así como multitud de zonas donde no se había citado la especie pero podría encontrarse en ellas. También se incluyeron zonas de Francia donde podría encontrarse la especie, así como las localidades donde se ha citado hasta la fecha en artículos. Para determinar las nuevas zonas a muestrear, a partir de los datos históricos de distribución se realizó un modelo de distribución potencial en Maxent para determinar las zonas donde potencialmente se podría encontrar la especie. Se visitaron tanto localidades históricas como zonas nuevas, si bien aquellas localidades donde se registró la presencia histórica de la especie y en las que en 2010 no fue localizada por nosotros, fueron visitadas de nuevo en 2011, 2012 y 2013 para confirmar la ausencia real de la especie en la zona.

El periodo de actividad de la rana pirenaica comienza en marzo-abril y termina en otoño. El mejor periodo para detectar la especie es en la primavera temprana, cuando los adultos se están reproduciendo, hasta el mes de Junio cuando los renacuajos todavía están en el agua. Por ello, nos planteamos realizar varias visitas a las localidades donde se ha detectado la especie a lo largo del año, a fin de poder detectar no sólo la presencia de la especie sino su reproducción y presencia de larvas. El muestreo consistió en la visita de localidades a pie o en vehículo todoterreno siempre que fue posible. Muchas localidades se encontraban en laderas escarpadas y localidades lejos de

vías de comunicación por lo que fue necesario realizar vivacs en esa zona. Se realizaron transectos por ríos, arroyos, pequeños torrentes y manantiales, localizando adultos, puestas y larvas de la especie a medida que se iba recorriendo la zona. En estos transectos se contaron el número de puestas, larvas, juveniles y adultos de rana pirenaica, anotando su situación precisa mediante GPS. El muestreo fue intensivo e incluyó la fotografía subacuática para detectar puestas que suelen estar bajo piedras (Figura 1). De cada localidad se recogieron datos del medio y se tomaron fotografías del entorno. Estos datos incluyeron el tipo de sustrato de fondo del arroyo, las características de los márgenes, tipo de vegetación dominante, geología, presencia de algas, tricópteros y otras especies de anfibios, presencia de peces, frecuencia humana y de ganado.

A fin de tener una aproximación al tamaño poblacional por localidad, se realizaron estimas de densidad relativa de adultos reproductores en base a observaciones de puestas, adultos y renacuajos. Estas estimas permiten tener por primera vez una idea aproximada del número de individuos reproductores de la especie en cada localidad. Dado que es imposible un programa de marcaje y recaptura en toda el área de distribución, se ha utilizado una aproximación en función del número de puestas, larvas censadas en

cada muestreo y su distribución en los arroyos. Durante el periodo reproductor se localizaron puestas de ranas, se contaron una a una en cada arroyo y se geo-referenciaron. Dado que es probable no detectarlas todas (véase Fig.1), se visitaron las localidades varias veces avanzada la estación para localizar masas de renacuajos. En muchos casos, las larvas de una puesta están agrupadas en el arroyo en pequeñas masas de renacuajos pequeños (cuando aún no nadan bien) y cada agrupación constituiría una puesta. En algunos casos, estimar directamente el número de puestas no es posible pues las larvas se encuentran dispersas en el arroyo, o bien, tras una riada, se concentran en los tramos bajos, por ello, en 2012 y 2013 hemos realizado el esfuerzo de revisar muchas localidades al principio de la temporada de cría para localizar las puestas y así estimar el número de hembras reproductoras mejor, ya que cada hembra pone solo una puesta. Tras estos años, hemos conseguido tener una estima bastante realista del número de puestas y por tanto de hembras reproductoras en los tramos de arroyos muestreados. Para tener una estima del número de adultos totales se empleó el sex ratio disponible para la especie, con lo que podemos tener una estima aproximada de los tamaños poblacionales, obteniendo un valor mínimo y máximo de individuos adultos reproductores para cada localidad estudiada.



**Figura 1.** Puestas de rana pirenaica.

**Figure 1.** Clutches of the Pyrenean frog.

Para todos los adultos capturados de rana pirenaica se tomaron una serie de medidas morfológicas in situ. En total se midieron 10 variables morfométricas que habitualmente se toman en anfibios, y que incluyen diferentes medidas de la longitud de las extremidades, tamaño corporal, medida del tímpano, extensión de membranas interdigitales y peso. Se tomaron fotografías digitales a escala para constatar el patrón de coloración y el grado de melanismo de los especímenes.

### Estimas de supervivencia de larvas y presencia de quitridiomycosis

En varias poblaciones de rana pirenaica se realizó un monitoreo durante 2012 y 2013 de la supervivencia de las larvas, para obtener datos preliminares de la influencia del hábitat en la supervivencia en años secos y cálidos versus húmedos y más fríos. Se escogieron diferentes tipos de hábitat y se realizaron conteos directos de huevos, y renacuajos hasta la metamorfosis. Mediante análisis no paramétricos de supervivencia de Kaplan-Meier implementados en SPSS v21 (IBM 2012), se realizaron estimas de supervivencia a lo largo del tiempo.

Para determinar la presencia del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, causante de la enfermedad quitridiomycosis, se tomaron *swabs* de piel de todos los adultos capturados, así como de la boca de renacuajos a lo largo de todo el área de distribución de rana pirenaica. Se extrajo el ADN de estas muestras mediante kits (Qiagen) y se realizaron PCRs con cebadores específicos por duplicado para detectar la presencia de este hongo. Las PCR consistieron en una primera amplificación del 18S al 28S (GOKA *et al.* 2009), seguida de otra PCR anidada con cebadores específicos para la región del ITS (ANNIS *et al.* 2004).

### Análisis genéticos

En todas las localidades muestreadas se cogieron muestras para análisis genéticos. En el caso de las ranas adultas, se colectó una falange de un dedo de la pata anterior, tratando la herida con antiséptico para evitar posibles infecciones. En el caso de los renacuajos, se cortó un trocito de cola de cada

individuo muestreado y se preservó en etanol 99%. Para evitar la transmisión de enfermedades entre localidades, se utilizaron guantes de nitrilo y procedió a la limpieza sistemática de todo el equipo que hubiera podido entrar en contacto con el agua (ropa, calzado, redes, etc.) con lejía diluida y productos fungicidas.

Se extrajo el ADN mediante kits de extracción (Quiagen). La concentración de cada muestra se estimó mediante un espectrofotómetro y se ajustó la misma en todas las muestras para homogeneizar las concentraciones. Para *Rana temporaria* los marcadores habituales funcionaron sin problemas, e incluyeron un marcador mitocondrial y uno nuclear para muestras de Pirineos y de toda Europa, y microsátélites. Sin embargo, los análisis genéticos de *Rana pyrenaica* acabaron siendo todo un reto por el hecho de que la especie no tiene apenas variabilidad genética (ver resultados). Primero se testaron 15 microsátélites de rana bermeja en pirenaica de los cuales 10 amplificaron bien en la misma, si bien al secuenciarlos no mostraron casi variabilidad dentro de rana pirenaica. Amplificamos también los marcadores nucleares usados comúnmente en ranas y tampoco hubo variación. Dado que un estudio anterior encontró una sola mutación mitocondrial en tres fragmentos estudiados en unos pocos individuos (CARRANZA & ARRIBAS 2008), secuenciamos cuatro genomas mitocondriales completos, correspondientes a dos individuos del límite de distribución Este (Aragón), y dos del Oeste (Navarra). Se desarrollaron cebadores específicos para las regiones que presentaban mutaciones y se amplificaron en una muestra 48 especímenes a lo largo del rango de distribución de la especie. Dada la baja variación mitocondrial de la especie, exploramos el genoma nuclear para encontrar variación intraespecífica, que incluyó la secuenciación del transcriptoma de dos individuos de los límites occidental y oriental de la especie, y desarrollo de marcadores de genes con variación genética e intrones.

Las librerías para secuenciación NGS se prepararon mediante el kit NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina y se secuenciaron en un Illumina Hi-seq en el Parque Científico de la UAM.

Las secuencias obtenidas por librería fueron de unos 28 y 32 millones de secuencias en el individuo de Navarra y de Aragón, respectivamente. El procesado bioinformático previo al ensamblado del transcriptoma se llevó a cabo utilizando herramientas implementadas a tal efecto en la plataforma virtual Galaxy instalada localmente en nuestro clúster de computación (GIARDINE *et al.* 2005; GOECKS *et al.* 2010). Las secuencias obtenidas se filtraron por los identificadores de cada librería, y éstos adaptadores se eliminaron bioinformáticamente. El control de calidad se realizó con FastQC, y se utilizó la herramienta “Trimmomatic (versión 0.32.2)” (BOLGER *et al.* 2014), para limpiar las secuencias en función de la calidad de cada base. Dado que no hay genomas de referencia para esta especie o próximas filogenéticamente, se realizó un ensamblaje de novo de los transcriptomas mediante Trinity (versión: 2.0.6) (GRABHERR *et al.* 2011; HAAS *et al.* 2013). Los transcriptomas resultantes de cada individuo se alinearon entre sí en Geneious, y se identificaron 25 loci con variación genética que pudieran ser utilizados para análisis filogeográficos. Se diseñaron cebadores específicos y se amplificaron en 48 especímenes. Con estos datos se estudió la variación genética en el área de distribución de la especie.

### Variación interanual en la fenología reproductora

El inicio del periodo reproductor anual de *R. temporaria* difiere en hasta 89 días entre poblaciones de baja y alta montaña en el Pirineo (VIEITES 2003). Las ranas comienzan la actividad reproductora en charcas y lagos justo tras el deshielo, a menudo cuando todavía nieva, siendo en ocasiones difícil llegar a las zonas de reproducción sin los medios adecuados. En el Valle de Tena, dada la existencia de datos antiguos de Enrique Balcells para la fenología de puesta en los años 70 del pasado siglo (BALCELLS 1976), y los de 2001 para la misma zona (VIEITES 2003), en 2012 y 2013 se visitaron exactamente las mismas localidades para determinar cuándo comienza la reproducción de las ranas en éstas y poder realizar análisis comparados. Un miembro del equipo vivió varios meses en la zona a fin de poder reco-

pillar los datos necesarios en el gradiente altitudinal, visitando también las localidades donde rana pirenaica está presente. En estas visitas se determinó cuándo y dónde se estaban reproduciendo las ranas. Con un GPS se han guardado las localizaciones de las charcas y zonas inundables muestreadas. A partir de estos datos se realizaron regresiones lineales para determinar la relación entre el inicio del periodo reproductor y la altitud en diferentes años.

Para evaluar tendencias en la evolución de la temperatura y precipitación en el Pirineo central, se solicitaron los datos brutos históricos de todas las estaciones meteorológicas disponibles en la Agencia Española de Meteorología. Se realizaron análisis de Mann-Kendall que permiten detectar tendencias de cambio en precipitación y temperatura, a partir de los cuales se realizaron extrapolaciones hacia el futuro para obtener escenarios climáticos realistas a nivel local.

### Análisis de conectividad espacio-temporal en diferentes escenarios climáticos

Para analizar la conectividad espacial entre poblaciones, primero se elaboraron matrices de coste a partir de cuatro conjuntos principales de datos de los que a su vez derivaron dos más: 1) Mapa de cobertura vegetal y ocupación del suelo con una resolución de 100x100 metros proveniente del programa europeo Corine Land Cover (versión 2006); 2) Mapa de modelo digital del terreno con una resolución de 90x90 metros proveniente de la Shuttle Radar Topography Mission de la NASA del cual derivamos un mapa de altitud a partir del cual se generó otro mapa de pendientes; 3) Mapa de charcas y lagos con presencia de la rana bermeja o en el caso de pirenaica arroyos en base a trabajo de campo, y lagos dónde las especies están ausentes; 4) Mapa de embalses y presas proveniente del IGN (Instituto Geográfico Nacional). Se reescalaron todos los mapas a 100x100 metros de resolución en formato raster. En el caso de la rana bermeja, existen datos para la zona de preferencia de hábitats (VENCES *et al.* 2000), que fueron empleados para reclasificar el mapa de cobertura vegetal: En el caso de la rana pirenaica, se emplearon las

frecuencias observadas en base a todas las localidades muestreadas (ausencias y presencias) para reclasificar la capa. Esta reclasificación se realizó en una escala porcentual, en la que los valores del cien por ciento representan una alta conductancia o total permisividad en la matriz para el movimiento de los individuos, frente a valores de cero por ciento que representan las superficies de menos conductancia, es decir nula permisividad de la matriz al movimiento de los individuos actuando como una barrera. La capa de altitud se re-clasificó en función del rango altitudinal real de las especies en Pirineos, con valores de cero dispersión fuera del rango altitudinal, y 100 dentro del mismo. La capa de pendientes se reclasificó de la misma forma en base a los datos obtenidos de todas las localidades muestreadas. Los peces son grandes depredadores acuáticos que imposibilitan la reproducción de las ranas, así como su dispersión a través de ellos, por lo tanto los cuerpos de agua con presencia de peces fueron reclasificados como 0, actuando como barreras. Finalmente, las charcas y lagos libres de peces, pero en los que la presencia de rana bermeja no fue detectada fueron clasificados como 100, es decir total conductancia. Se realizaron matrices de coste globales con permutaciones de estos parámetros, para medir el impacto potencial de todas las combinaciones posibles de variables en la conectividad espacial entre poblaciones.

Durante el desarrollo del proyecto tuvimos la suerte de que 2012 fue un año seco, con deshielo rápido y poca nieve, mientras que 2013 fue un año húmedo, más frío y con mucha nieve que supuso un deshielo más tardío. Esto nos permitió comparar el impacto de dos escenarios climáticos reales muy diferentes en la fenología y conectividad espacial. Para incorporar el parámetro temporal a los modelos, se reclasificó la matriz en función de la disponibilidad de hábitat a lo largo del tiempo. Con las ecuaciones de regresión del inicio del periodo reproductor en 2012 y 2013, que están directamente relacionadas con el deshielo altitudinal, generamos matrices de coste bimensuales. Utilizando las ecuaciones de regresión reclasificamos la capa de altitud representando espacialmente el inicio del periodo reproductor.

El periodo reproductor es de unos 20 días, tras el que los adultos se dispersan durante un tiempo, excepto en zonas de alta montaña donde permanecen en ibones (VIEITES 2003; VIEITES *et al.* 2004). Por ello se generaron escenarios bimensuales solapados entre sí, que permiten la posibilidad de dispersión entre zonas, y en los que el hábitat no disponible por innivación en cada periodo y para cada año se reclasificó con valor cero. Estos mapas de disponibilidad temporal del hábitat bimensuales se multiplicaron por las matrices de coste que se habían generado anteriormente, para generar nuevos escenarios que incorporan el factor temporal a las mismas.

## RESULTADOS

### **Distribución y situación actual de la rana pirenaica en toda su área de distribución.**

La distribución histórica de rana pirenaica está disponible en el Atlas de Anfibios y Reptiles de la Península Ibérica del Ministerio de Medio Ambiente como malla UTM de 10x10 kilómetros, pero nunca se ha recopilado toda la información de las localidades precisas con presencia de la especie. En total fueron visitadas 357 localidades, incluyendo la práctica totalidad de las localidades históricas de presencia de la especie, y confirmando la ausencia tras varias visitas a algunas localidades históricas. Se han localizado 23 localidades nuevas para la especie distribuidas por los valles de Ansó, Tena, Vió; Acumuer, Bujaruelo y Hecho, así como una nueva población aislada en Francia. Esto supone una ampliación del área de distribución de la especie en cinco cuadrículas UTM en España (Figura 2).

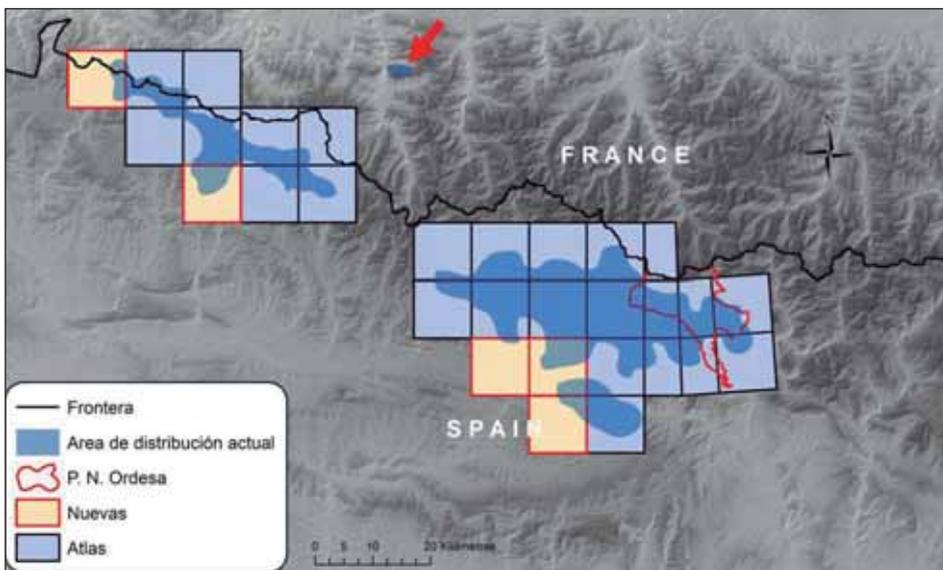
Las nuevas localidades completan el área conocida de distribución de la especie ampliándola hacia el oeste y al sur. En el caso de la cuadrícula 30TXN84, correspondiente al Valle de Hecho, la nueva localidad encontrada es de especial relevancia. En el valle de Hecho nunca se había encontrado la especie hasta ahora, a pesar del gran esfuerzo de muestreo en años anteriores. Existe una discontinuidad en el área de distribución de la especie entre el núcleo oriental y occidental, y

esta nueva localidad acorta esa distancia entre núcleos. En las cuadrículas 30TXN83 y 30TXN93, entre los dos núcleos poblacionales, no se ha encontrado la especie a pesar de los intensivos muestreos en la zona.

En la figura 3 se muestra el intenso esfuerzo de muestreo realizado durante el estudio. Se ha buscado la especie en 357 localidades de montaña, localizándola en 165 arroyos, muchos de ellos en cabeceras de valles de difícil acceso. La distribución de localidades muestra claramente dos núcleos desconectados espacialmente entre sí, territorio en el que se ha encontrado la nueva localidad mencionada en el Valle de Hecho y ninguna más por el momento. En 2012 y 2013 hemos re-visitado muchas de las localidades, tanto históricas sin detectar la especie como en las que la hemos detectado, a fin de confirmar ausencias, intentar detectar nuevas presencias, y recabar datos de número de puestas para estimar tamaños poblacionales. Hay que destacar que en varias localidades históricas no se ha vuelto a localizar la

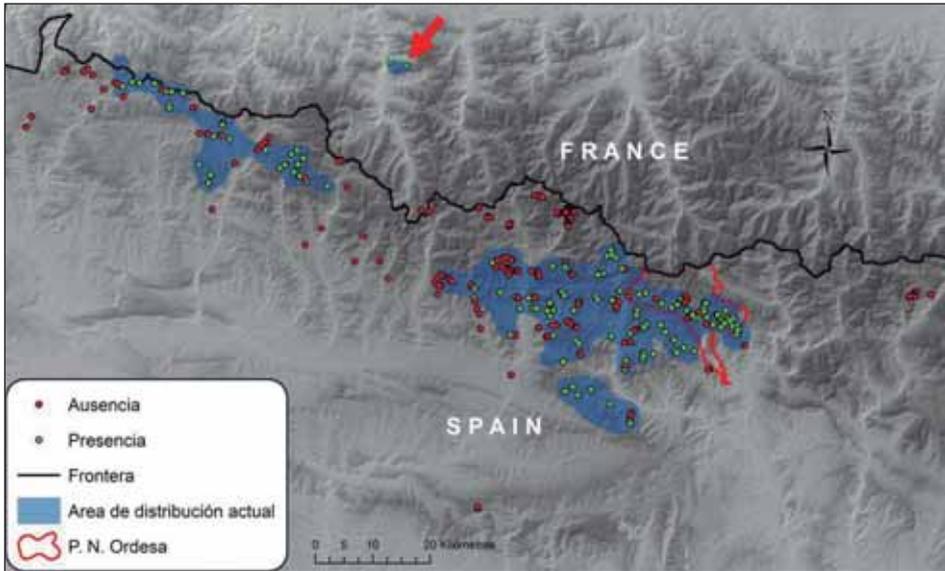
especie (30), y de especial relevancia son las localidades próximas a Villanúa. La especie se describió a partir de ejemplares de esta zona, sin embargo en todo el valle no encontramos ningún individuo en 2010 y unos pocos tras un intenso muestreo en 2011 en un solo punto, y de nuevo en 2013. La reproducción se confirmó tras encontrar un único renacuajo en el mes de Junio, lo cual indica que la especie está prácticamente extinta en este valle.

Las estimas de densidad relativa de *Rana pyrenaica* sugieren que en la zona muestreada (31 km de arroyos de montaña) la población de adultos reproductores estaría entre 630 y 1320 individuos. En cuanto a la estima global, extrapolando al hábitat potencial disponible (210 km de arroyos sin peces) podría haber una población estimada entre 13300 y 16500 individuos adultos. Los resultados indican que la especie es más abundante en Aragón, con un patrón general de poblaciones pequeñas con alto grado de fragmentación (Figura 4). Existen



**Figura 2.** Mapa de distribución de *Rana pyrenaica* en base a cuadrículas UTM 10x10 km, mostrando las nuevas cuadrículas de presencia de la especie. La flecha indica las nuevas poblaciones francesas.

*Figure 2.* Distribution map of *Rana pyrenaica* based on 10x10 km UTM grid squares, showing the new squares with presence of the species. The arrow indicates the new French populations.



**Figura 3.** Localidades muestreadas entre 2010 y 2013, indicando aquellas en las que se detectó la especie (verde) y en las que no se ha detectado (rojo).

*Figure 3.* Sampled localities between 2010 and 2013, showing the ones where the species was detected (green) and the ones where it was absent (red).



**Figura 4.** Estima de adultos por localidad para todo el área de distribución de rana pirenaica.

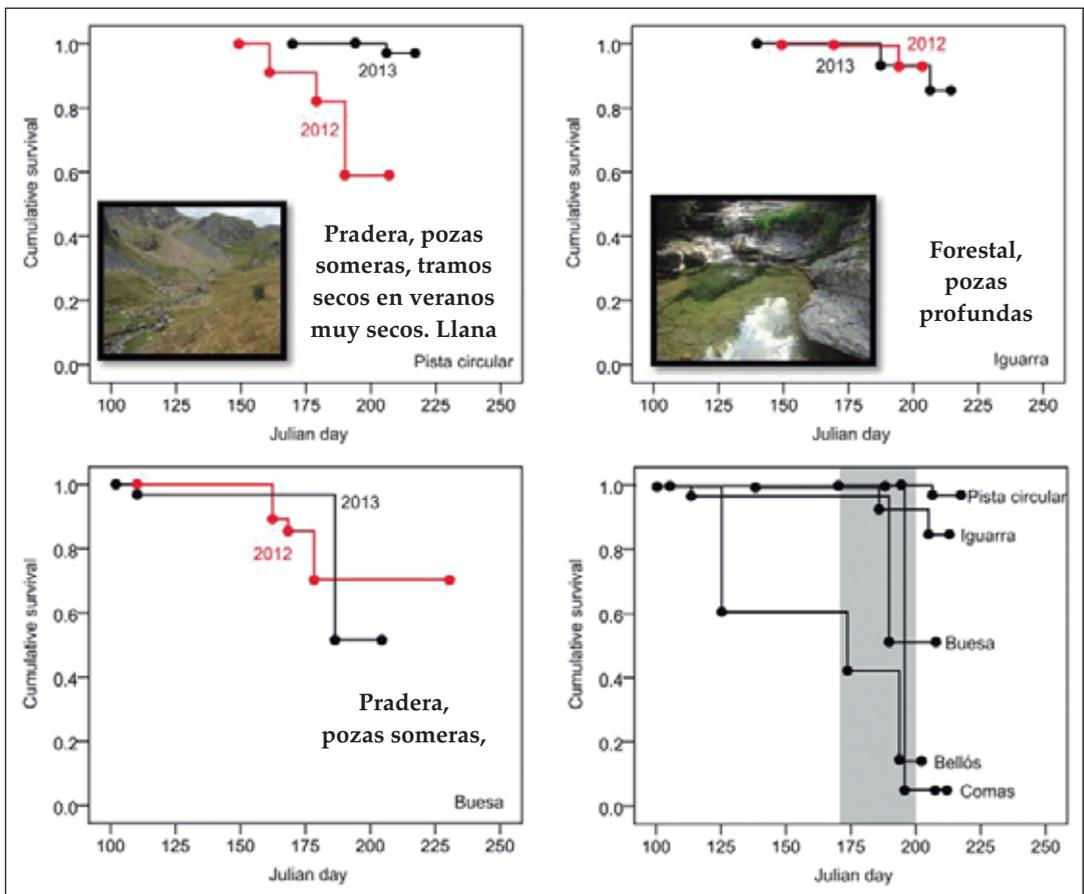
*Figure 4.* Adult estimates per locality for the whole distribution range of rana pirenaica.

13 localidades con una densidad elevada de individuos, dos de ellas dentro del Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido, y una próxima (Salto del Pix).

La variación fenotípica en la especie es pequeña en todo el área de distribución, si bien se ha encontrado una correlación significativa entre la altitud y la disminución del tamaño del tímpano ( $p < 0.01$ ), no existiendo correlaciones significativas con las demás variables analizadas.

**Estimas de supervivencia de larvas y presencia de quitridiomicosis**

Durante 2012 y 2013 se realizó un monitoreo continuo de varias poblaciones de ranas localizadas en lugares con diferentes características: zonas llanas con pozas donde se reproducen y secan en años poco lluviosos, ríos con pozas profundas que tienen agua todo el año, y río forestal con pozas someras. En la figura 5 se muestra la comparación entre años para este tipo de ambientes.



**Figura 5.** Modelos de supervivencia de fases larvarias entre diferentes años y ambientes para rana pirenaica. Superior izquierda, ambiente abierto, de pradera llana con pozas someras que se secan en veranos cálidos. Superior derecha, ambiente forestal con pozas permanentes profundas. Inferior izquierda, ambiente forestal con pozas someras. Inferior derecha, comparación de la mortalidad en cinco localidades en 2013, mostrando en gris los periodos de lluvias torrenciales.

**Figure 5.** Survival models of larval phases between different years and environments. Top left, open environment, flat prairies with shallow ponds that dry out in hot summers. Top right, forest environment with deep permanent ponds. Bottom left, forest environment with shallow ponds. Bottom right, comparison of mortalities between five localities during 2013, showing in grey periods of strong storms and floods.

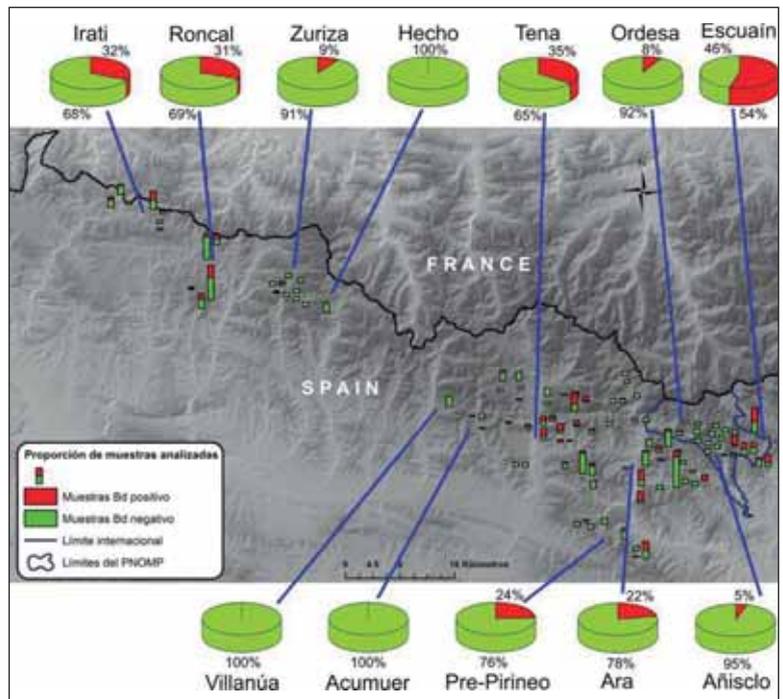
El 2012 fue muy seco y la mortalidad en el primer tipo de ambiente fue enorme comparada con 2013, en el que las pozas no se secaron. En el arroyo forestal de pozas profundas, siempre hubo agua, no observándose diferencias entre años y siendo la supervivencia alta (80%). En ambiente forestal de pozas someras, la mortalidad a partir de cierto momento se incrementa significativamente, coincidiendo con lluvias torrenciales que barren los renacuajos arroyo abajo. En el último recuadro de la figura se compara la supervivencia de 5 localidades en 2013 de diferentes características, en las que se observa que cuando se producen lluvias torrenciales se produce una mortalidad masiva de renacuajos en varias localidades.

Los análisis realizados han detectado la presencia del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (BD) en todo el área de estudio, incluyendo el Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido. En la figura 6 resume el patrón de distribución de muestras positivas en rana pirenaica. Se analizaron 666 indi-

viduos de rana, detectando positivos en el 27,6% de las muestras analizadas. La enfermedad está en muchas poblaciones, a lo largo de todo el área de distribución de la especie. Al analizar por zonas, vemos que solo hay tres áreas en las que no se ha detectado la presencia del quítrido, si bien son todas zonas periféricas donde la densidad de ranas es muy baja. En el resto se ha detectado en todas, siendo Escuaín en la que hay más proporción de individuos con BD. No se han observado mortalidades masivas de adultos durante el periodo de muestreo, si bien la detectabilidad de adultos es baja, dada la baja densidad por población excepto en 13 localidades donde es abundante.

### Análisis genéticos

La rana bermeja, *R. temporaria*, presenta una alta variabilidad genética en toda su área de distribución, con los linajes más antiguos localizados en la Península. El análisis filogeográfico en todo su área de distribución (VENCES *et al.* 2013), muestra que



**Figura 6.** Porcentajes de incidencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* (BD) por zonas. Las barras indican la cantidad y la proporción de muestras positivas y negativas por localidad.

**Figure 6.** Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* (BD) in percent for different areas. Bars show quantity and proportion of positive and negative samples per locality.

en genes mitocondriales hay 5 grandes linajes. Entre los linajes que ya se conocían, hay uno en el este de Europa hasta Alemania, que es el grupo hermano de otro Europeo que abarca desde Alemania a los Pirineos, incluyendo Irlanda, Italia y Croacia. El grupo hermano a estos incluye un linaje conocido, que corresponde a *Rana temporaria parvipalmata* de Galicia y parte de Asturias, y se ha encontrado un linaje nuevo en la cordillera cantábrica. Por último, el linaje más basal y divergente se ha descubierto en Pirineos, en Benasque, aunque la distribución real de estos dos nuevos linajes encontrados es desconocida. La rana bermeja se encuentra ampliamente distribuida en el Pirineo, sin embargo no la hemos encontrado dentro de los límites del Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido. Aparece en Bujaruelo cerca del Parque, pero no en los valles interiores.

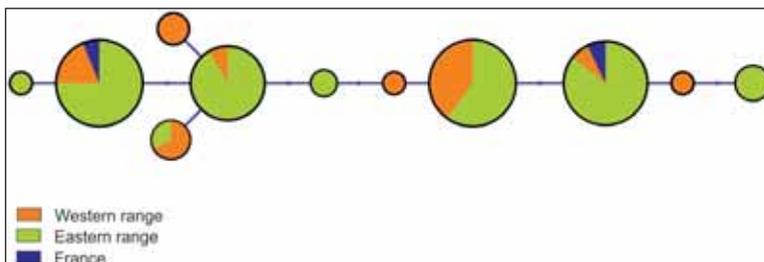
La rana pirenaica ha sido uno de los organismos más desafiantes con los que hemos trabajado en la vida. No encontramos variación genética en marcadores tradicionales, ni intrones usado comúnmente en ranas, ni en microsatélites desarrollados para rana bermeja. Tras secuenciar cuatro genomas mitocondriales completos, en aprox. 17000 pares de bases encontramos nueve posiciones variables. Teniendo en cuenta que en *R. temporaria* hay más variación en 100 pares de bases del citocromo b que en toda la especie *R. pyrenaica*, podemos decir que la rana pirenaica es homogénea genéticamente. Aunque inicialmente no estaba previsto en el proyecto, a fin de encontrar variabilidad en el genoma de esta especie, se secuenciaron dos transcriptomas para la especie (uno de Navarra y otro de Aragón), y se obtuvieron múltiples marcadores con variabilidad entre el individuo de Navarra y el de Aragón. Tras amplificar 25

de estos marcadores en 48 individuos, incluyendo algunos intrones entre exones, detectamos cierta variación genética si bien se han encontrado los mismos alelos en la zona oriental y occidental, sugiriendo que no hay una separación completa de linajes (*incomplete lineage sorting*). Por ejemplo, en la figura 7 se muestran los alelos detectados en uno de los marcadores nucleares más variables, coloreados por regiones, y se puede apreciar que la variación genética no está definida por zonas geográficas. Los datos obtenidos sugieren una homogeneidad genética en marcadores nucleares.

### Variación interanual en la fenología reproductora

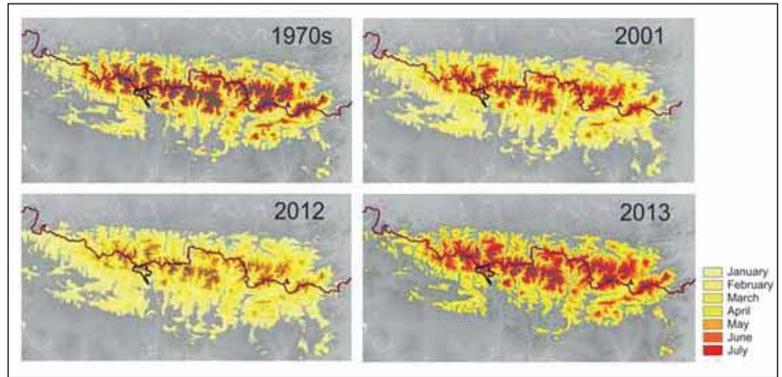
Para todos los periodos analizados se ha observado una correlación positiva y muy significativa entre el inicio del periodo reproductor de ranas y la altitud (1970s,  $R^2 = 0,774$ ; 2001,  $R^2 = 0,871$ ; 2012,  $R^2 = 0,806$ ; 2013,  $R^2 = 0,949$ ). Sin embargo, las pendientes de las rectas son muy diferentes. La variación del inicio es menor en zonas más bajas, si bien a partir de los 2000 metros, puede haber diferencias de casi dos meses entre años secos y húmedos, lo cual es muy importante a tener en cuenta en la biología de estas especies. Los años 2012 y 2013 han sido radicalmente diferentes climáticamente, uno muy seco y cálido y el otro muy húmedo y frío, respectivamente. Climáticamente, 2013 fue parecido al clima de los años 70, mientras que 2012 representa las condiciones que se esperan que sean habituales en los próximos años.

Cuando trasladamos estas ecuaciones a la geografía, obtenemos los siguientes modelos de inicio del periodo de puesta en función de la altitud



**Figura 7.** Red de alelos en un marcador nuclear anónimo variable para rana pirenaica.

*Figure 7.* Allele network for an anonymous nuclear marker for the pyrenean frog.



**Figura 8.** Modelos de inicio del período reproductor de ranas pardas en el Pirineo en diferentes años en función de la altitud.

*Figure 8.* Beginning of breeding season models for brown frogs in the Pyrenees in different years related to elevation.

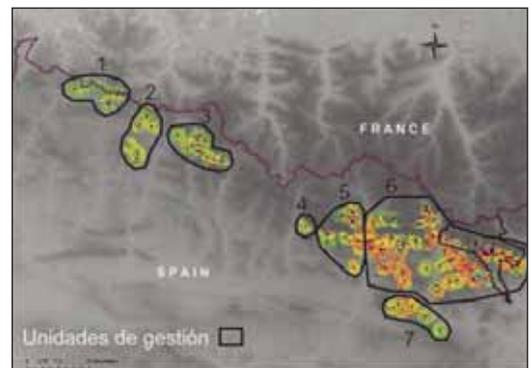
para los diferentes periodos estudiados (Figura 8). En años como el 2012, muy cálido, se adelantó mucho el periodo de puesta con respecto a los 70s o 2013, que en zonas altas se inició unos dos meses más tarde.

El año de mayor mortalidad (2012), fue el año en el que las ranas se reprodujeron más pronto. Para comprobar si el patrón en el futuro va a ser el del año 2012 o bien el de 2013, se analizaron las tendencias climáticas en base a los datos de estaciones de la AEMET para el Pirineo Central. Los test de Mann-Kendall sugieren que las temperaturas mínimas y máximas están sufriendo un incremento significativo, con una estimación de incremento de 2°C para el 2100, mientras que la precipitación no muestra diferencias significativas en su tendencia. Estos análisis sugieren que los escenarios futuros irán más en la línea del año 2012 que de 2013 o los años 70.

### Análisis de conectividad espacio-temporal en diferentes escenarios climáticos

Los análisis de conectividad espacial sugieren un escenario de elevada fragmentación poblacional en rana pirenaica. Uno de los factores que más influyen en la conectividad es la presencia de peces. En la figura 9 se muestra uno de los mejores modelos de conectividad para rana pirenaica. En el modelo se ha incluido un buffer de 2 kilómetros alrededor de cada localidad como límite de dispersión individual. En este modelo se observa la desconexión efectiva entre el nú-

cleo occidental y oriental, así como varias zonas que hemos agrupado en unidades de gestión potenciales. En el sector occidental hemos identificado tres zonas aparentemente no conectadas entre sí: 1) Irati, 2) Navarra Centro, y 3) Navarra Este hasta Hecho en Aragón. No se han encontrado poblaciones que sugieran que existe conectividad actual entre ellas, si bien no están lejanas entre sí y sería posible establecer conexiones entre ellas mediante establecimiento de poblaciones intermedias. La zona 4 corresponde al sector oriental en Villanúa, donde hemos constatado la práctica desaparición de la especie por razones desconocidas: no se ha detectado el hongo quítrido pero la población es muy baja y ha desaparecido de muchas localidades. La uni-



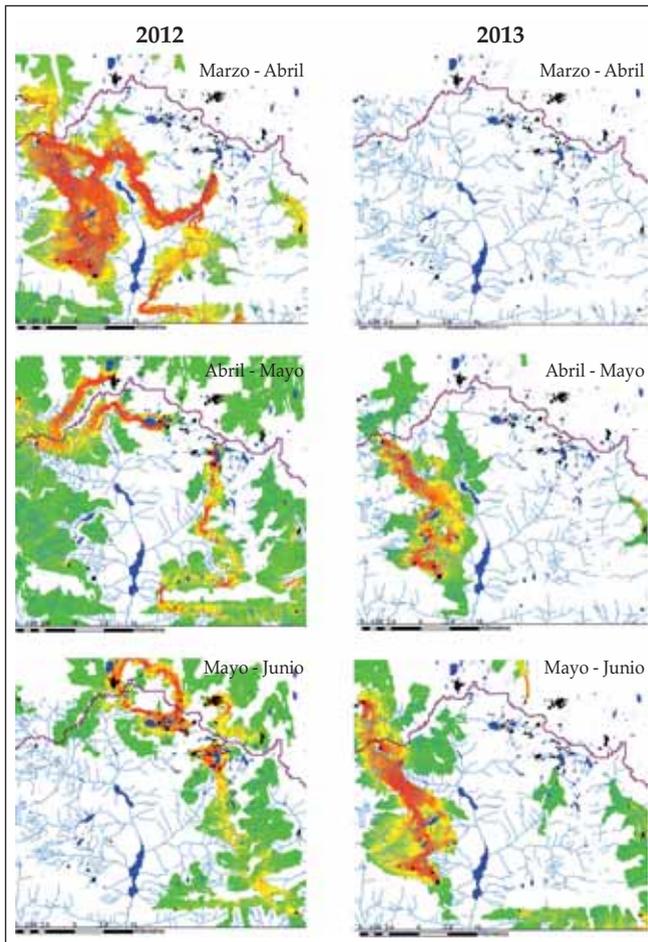
**Figura 9.** Modelo de conectividad espacial para rana pirenaica con los siete núcleos principales desconectados entre sí.

*Figure 9.* Spatial connectivity model for the Pyrenean frog, highlighting the seven main areas disconnected from each other.

dad 5 corresponde a la vertiente oeste del Valle de Tena. No hay diferencias genéticas entre las poblaciones de las dos orillas del río Gállego, si bien los modelos detectan la falta de conectividad reciente debido a barreras como grandes embalses y presencia continuada de peces que impiden la conectividad actualmente. La zona 6 es la más amplia e incluye desde la orilla Este del río Gállego hasta Ordesa, con muchas poblaciones dentro del PNOMP, aunque con incidencia alta del quitridio. Por último, las poblaciones de la zona de Fiscal (7) parecen no estar conectadas con el resto, fragmentación que probablemente hay ocurrido hace poco, e incluyen algunas de las mejores densidades para la especie.

Para evaluar el impacto potencial del cambio climático en la conectividad, se realizaron modelos espacio temporales para los diferentes años con datos de fenología. Cuando incorporamos el factor temporal, vemos que los modelos de conectividad espacial muestran diferencias significativas entre sí al incorporar la fenología. En la figura 10 se muestran los modelos bi-mensuales, correspondientes a tres periodos comparados para el año 2012 y 2013, para el valle de Tena y *Rana temporaria*.

En 2012 se derritió la nieve en febrero, comenzando la reproducción, y las primeras poblaciones de baja montaña al Este del río Gállego



**Figura 10.** Comparación de modelos bi-mensuales de conectividad espacial para la rana bermeja en 2012 y 2013. Se incluyen como ejemplo tres periodos, en los que la conectividad va desde baja (colores verdes) a alta (colores anaranjados).

**Figure 10.** Bi-monthly spatial connectivity model comparison for the common frog in 2012 and 2013. We show as an example three periods in which the connectivity spans from low (green colors) to high (orange colors).

muestran cierta conectividad potencial. En marzo-abril, la conectividad es importante y el área disponible con ranas activas es grande, con conexiones potenciales entre ambas orillas del río a través de los hayedos de Sallent de Gallego. En abril-mayo, la actividad reproductora ocurre en poblaciones de mayor altitud, las cuales no están muy conectadas entre sí, y tampoco con las que estaban disponibles en marzo-abril. Por último, en mayo-Junio se reproducen las ranas en alta montaña y hay cierto grado de conectividad entre algunas poblaciones pero el Circo de Piedrafita y el valle lateral de Panticosa no están conectados. Como contraste a 2012, en 2013 la reproducción comenzó más tarde, con nula conectividad en marzo-abril. Desde abril a Junio existe conectividad en las poblaciones al Oeste del río Gállego en zonas de media montaña, sin embargo el patrón es distinto a 2012 pues no existe conexión con la orilla oriental del río. En Junio-Julio se inicia la actividad en zonas de alta montaña, con un patrón de conexión similar al de abril-mayo de 2012. Por último, las últimas poblaciones que se reprodujeron en Julio muestran muy poca conectividad entre zonas de alta montaña entre sí ese año.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este proyecto sientan las bases para la estrategia de gestión y conservación de las ranas pardas en el Pirineo, especialmente de rana pirenaica. El esfuerzo de muestreo en todo el área de distribución de rana pirenaica, y los datos generados en diferentes aspectos, nos muestran la situación actual de la misma, la cual es incierta. El estatus de la rana bermeja es de preocupación menor, si bien la existencia de linajes genéticos muy diferenciados en zonas muy localizadas, sugiere que se asegure la preservación de los mismos.

Los datos de distribución de la especie muestran que el área de ocupación histórica se mantiene en gran medida, si bien hay localidades que han desaparecido. Es de destacar la práctica desaparición de la especie en las localidades cercanas a Villanúa, que indican que es probable que se extinga en ese valle en breve, pues sólo se ha localizado una puesta en

todo el valle, a pesar de los cuatro años de búsqueda intensiva. La especie se describió a partir de ejemplares de esta zona, no estando claras las razones de su práctica extinción local. En total, la especie ha desaparecido de 30 localidades históricas, si bien persiste en el resto, habiendo localizado nuevas poblaciones en cinco cuadrículas UTM 10x10km españolas donde no estaba descrita y en Francia.

Quizás el factor más relevante en cuanto a su conservación es el reducido tamaño poblacional de la mayoría de localidades. Si bien hay un número de localidades con densidades elevadas para la especie (aunque mucho menores si la comparamos con la rana bermeja), la mayoría albergan un reducido número de reproductores. Nuestra estimación relativa del número de adultos reproductores en el área de distribución es la única hasta la fecha, y sugiere que, si bien hay un número de ranas importante, las poblaciones son muy pequeñas y muchas de ellas probablemente no sean viables a largo plazo. Es necesario monitorear una serie de poblaciones en el tiempo y estimar las densidades de la especie mediante marcaje-recaptura. Si bien existen datos no publicados de un par de localidades, sería conveniente ampliar este muestreo a muchas más, incluyendo aquellas con densidades bajas y altas para entender cómo son sus dinámicas y qué factores influyen en la densidad y supervivencia de la especie.

Hay varios factores que afectan a la conservación de esta especie. La presencia de truchas grandes limita la presencia de la rana, no estando presente en cauces con cierta entidad. Dada la baja variación genética observada, es probable que hasta hace poco existiese cierto grado de conectividad espacial entre las poblaciones que ahora no se observa, y que éstas fuesen lo suficientemente grandes para permitir el intercambio de individuos entre ellas. Los análisis de supervivencia de renacuajos sugieren que el tipo de hábitat influye mucho en la supervivencia, así como el clima de cada año. La mayor mortalidad observada en la especie es de larvas que se encuentran en cubetas de arroyos con poca agua, que antes de la metamorfosis se secan matando a todos los renacuajos. Muchas de estas cubetas están colmatadas, por lo que el volumen de agua disponible no es alto.

Nuestros datos sugieren que en zonas donde las pozas son profundas y tienen agua todo el tiempo la supervivencia es mayor, sirviendo además de refugio frente a riadas. Otro factor relacionado es el impacto de las riadas de tormentas de verano que arrastran a los renacuajos y producen mortalidades masivas rápidas. Hay localidades con menor pendiente en las que el efecto es pequeño (Figura 6), aunque en otras es muy significativo. Los modelos de cambio global indican que en los próximos años se esperan inviernos con menos nieve, veranos secos, con tormentas estacionales, lo cual no es un escenario muy esperanzador para la especie. Para remediar en parte el problema, la medida de gestión más eficaz para la especie ahora mismo es descolmatar las pozas y cubetas, aumentando la profundidad de las mismas para asegurarse de que habrá agua suficiente para que los renacuajos completen la metamorfosis y se asegure el reclutamiento para los próximos años, sobre todo teniendo en cuenta las predicciones de prevalencia de años secos en el futuro.

La presencia del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* a lo largo de todo el área de distribución de rana pirenaica es muy preocupante. La zona con mayor presencia del hongo está dentro del parque nacional. Aunque en tres zonas no se ha detectado la presencia del hongo, el número de muestras disponibles para esos valles es pequeña, y en el resto de valles la proporción de muestras con BD negativo es mayor. Este hongo está acabando con poblaciones de anfibios en todo el mundo, si bien se desconoce la mortalidad que pueda haber ocasionado, o estar ocasionando, en esta especie o en la rana bermeja. Es necesario realizar un seguimiento de las poblaciones afectadas para ver el grado de incidencia, si afecta a más especies y con qué incidencia, y evaluar en el marco temporal si está expandiéndose o no. No hemos observado mortalidades masivas de adultos ni renacuajos, aunque quizás la quitridiomycosis sea una de las causas que expliquen el pequeño tamaño poblacional en muchas localidades.

La variación genética observada en rana pirenaica y en bermeja son radicalmente diferentes. En la rana bermeja hemos encontrado dos nuevos linajes en el norte de la Península Ibérica, uno en la

cordillera Cantábrica y el otro en Pirineos. El linaje Pirenaico coexiste con otro de distribución más Europea (VENCES *et al.* 2013). Las muestras de ambos corresponden a colas de renacuajos colectadas en el campo, por lo que se desconoce si la diferenciación genética se corresponde con una variación morfológica o no. La variación fenotípica descrita en esta especie en Pirineos no parece tener relación con este nuevo linaje, ya que las formas de patas largas que se han descrito se encuentran en otras zonas del Pirineo (DUBOIS 1982, 1983; ARANO *et al.* 1993). Se desconoce la distribución real de este linaje así como el nuevo de la Cordillera Cantábrica. Los datos obtenidos para esta especie son congruentes con la existencia de refugios pleistocénicos en el Pirineo, que mantuvieron poblaciones aisladas en las que persistieron linajes durante los periodos de glaciación. Los mapas de extensión de hielo en el último máximo glacial (EHLERS & GIBBARD 2004) muestran multitud de posibles refugios en el Pirineo, por lo que no se descarta la posibilidad de encontrar nuevos linajes en el futuro. Si bien la situación de conservación de la rana bermeja en conjunto es óptima, sí sería necesario asegurar la persistencia de los nuevos linajes encontrados, que hasta la fecha se conocen sólo de dos localidades.

En el caso de rana pirenaica, esta especie tiene menos variación genética en todo el genoma mitocondrial que en 100 pares de bases de rana bermeja. Tanto los marcadores nucleares como los mitocondriales sugieren que la especie tiene muy poca diversidad genética, y que probablemente la especie ha sufrido un cuello de botella genético reciente, seguido de una posterior expansión. Dadas sus características ecológicas, ya que habita en ríos de montaña, y que los glaciares en el Pirineo Central llegaban hasta cotas muy bajas, es posible que su área de distribución durante las glaciaciones se viese reducida significativamente. No tenemos evidencia de la existencia de ningún refugio pleistocénico para la especie, y la homogeneidad genética es pareja a la morfológica.

La fenología de la reproducción en ranas pardas en el Pirineo está directamente relacionada con el deshielo de las localidades de cría. Tanto los datos históricos (BALLCELLS 1976), como más recien-

tes (VIEITES 2003), y los generados en este estudio) muestran una correlación clara entre la altitud y el inicio de puesta, debido a que el deshielo sigue el mismo patrón altitudinal, derritiéndose la nieve más tarde en cotas más altas. Las diferencias entre años son evidentes en las pendientes de las rectas de regresión, que se traducen en que en años con poca nieve y deshielo temprano las ranas se reproducen mucho antes a mayores altitudes que en años con mucha nieve y fríos. Los datos muestran diferencias de hasta dos meses en el inicio de la reproducción entre años a 2000 metros de altitud, lo cual se traduce en un mayor o menor período de actividad anual. En años como 2012, de deshielo temprano y poca nieve y con un periodo de actividad mayor, la mortalidad observada de renacuajos en varias poblaciones es mucho mayor que en años como 2013 con mucha nieve. Los análisis de tendencias climáticas en base a estaciones meteorológicas del Pirineo sugieren que este tipo de escenario es al que se van a enfrentar las ranas en el futuro, con un incremento de temperaturas pero no una tendencia clara en las precipitaciones.

Los modelos de conectividad espacial para rana pirenaica, además de confirmar la falta de conectividad entre el núcleo oriental y el occidental, muestran desconexiones efectivas dentro de ambos núcleos, correspondiéndose con barreras montañosas o el río Gállego. Estas zonas se pueden agrupar en 7 unidades de gestión diferentes a efectos de gestión de la especie. La incorporación del componente temporal a los modelos de conectividad muestra diferencias radicales dependiendo del año y en función del clima, como se aprecia en la figura 11. El concepto de aislamiento por el medio ambiente (ver review en WANG & BRADBURD 2014) es relativamente reciente. Entre todos los mecanismos contemplados hasta la fecha, no existen estudios que hayan evaluado el impacto fenológico en la componente de conectividad espacial. En este trabajo se muestra por primera vez el enorme impacto que supone incorporar el parámetro espacio-temporal a modelos de conectividad.

El modelo de conectividad espacial sin considerar fenología muestra un patrón común a muchos es-

tudios en el que poblaciones cercanas y con hábitats más o menos homogéneos y permeables se muestran muy conectadas entre sí. Es obvio que en montañas como los Pirineos, en los que hay un gradiente altitudinal y por tanto climático muy marcado, es imposible que poblaciones que están bajo dos metros de nieve y no han iniciado su periodo de actividad, estén conectadas con otras de zonas bajas donde ya ha deshelado. Al incorporar el factor temporal, vemos que claramente la conectividad espacial se ve limitada por la fenología de la especie, que a su vez viene determinada directamente por el deshielo en el gradiente altitudinal. De los modelos para el año 2012 y 2013 se pueden extraer dos conclusiones claras: la primera es que las poblaciones de baja y alta montaña parecen no estar conectadas entre sí en ningún año. La segunda es que los patrones de conectividad espacial no son los mismos entre diferentes años para las mismas altitudes, de forma que las diferencias no son sólo que las ranas se reproduzcan antes un año que otro, si no que las oportunidades de conectividad variarán también. Esto abre escenarios muy interesantes para comprender mejor cuál es la conectividad entre poblaciones ahora y bajo escenarios futuros de cambio global. Si consideramos que el patrón de 2012 va a ser el habitual los próximos años, parece que las oportunidades de conectividad espacial van a ser mayores.

Las consecuencias de estos resultados con fines de conservación y gestión son claras. Sin la incorporación del factor temporal, en zonas de gradientes climáticos marcados, los estudios que se han realizado hasta la fecha pueden estar sesgados. Muchos estudios de conectividad espacial se emplean para elaborar planes de conservación y restauración (RUDNICK *et al.* 2012). Estos planes suelen involucrar desembolsos cuantiosos que pueden fracasar si los modelos no son adecuados, por lo que la incorporación del parámetro tiempo es muy necesaria para tener modelos realistas en esta región, y especialmente en el Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido donde el gradiente altitudinal es evidente.

A efectos de gestión práctica de estas especies, y especialmente en el caso de rana pirenaica, se

pueden tomar una serie de medidas de gestión que ayuden al mantenimiento de poblaciones. *In situ*, ayudaría una mejora de la conectividad y el hábitat (por ejemplo mediante la descolmatación de pozas). En este sentido, el mantenimiento y gestión adecuada de las poblaciones de Ordesa, la única zona con protección real para la especie, es crítico. Los análisis de conectividad sugieren un grado importante de fragmentación, que debe ser relativamente reciente pues genéticamente la especie es muy homogénea en toda su área de distribución, y se deben tomar medidas para incrementar la conectividad espacial, que pueden incluir el refuerzo de poblaciones con la incorporación de nuevos individuos.

El refuerzo de poblaciones con baja densidad pero con hábitat idóneo pueden ser efectivas para mejorar la situación de las mismas, y se pueden llevar a cabo mediante la translocación de individuos (ej. renacuajos desde zonas con alta densidad). La baja diversidad genética y la baja densidad poblacional, así como la presencia de un patógeno letal para anfibios como es el quítrido, son argumentos de peso para considerar la reproducción en cautividad de la especie a fin de asegurar su supervivencia futura. Esta estrategia se está haciendo ya en la Península con otras especies, sería compatible con la conservación *in situ*, y permitiría repoblar zonas donde la especie ha desaparecido, reforzar poblaciones y mejorar la conectividad espacial.

Nuestros datos sugieren que la categoría de amenaza actual de la especie se mantiene. *Rana pyrenaica* está catalogada por la UICN como especie en Peligro de extinción, en la categoría B1ab (II, III, IV), en las que se tiene como criterio clasificador la extensión limitada del área de distribución geográfica de la especie. La baja densidad de individuos reproductores justifica esta categoría. Sin embargo, dado que la Directiva Hábitats se

realizó antes de que la especie fuese descrita no está incluida en la misma. Por ello, es necesario que el MMARM solicite la inclusión de esta especie en un anexo nuevo a dicha directiva comunitaria. De esta forma se le daría el grado de protección oficial que merece como especie prioritaria, y permitiría solicitar fondos LIFE para su conservación.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer su ayuda a todos aquellos que han colaborado en el trabajo de campo, especialmente a Carlos Zaragoza, Javier Santos, Rubén González, Miguel Vences, Nina Bernard, Guillermo Ponz e Isabel Perandones. En el campo han sido de inestimable ayuda Fernando Carmena e Ignacio Gómez de SARGA, y Iosu Antón en Navarra. Ramon Antor Casterllanau nos proporcionó apoyo logístico que fue fundamental para llevar a cabo el proyecto. Manuel Alcántara y David Guzman del Gobierno de Aragón mostraron su total colaboración y ayuda durante todo el desarrollo del proyecto. Durante los muestreos se contactó a los guardas forestales de Navarra y Aragón, los cuales nos ayudaron y acompañaron en varias ocasiones. Gran parte de la logística se vio facilitada por la empresa pública Sodemasa, ahora Sarga, del Gobierno de Aragón, que nos permitió usar su estación de campo en Ordesa para pernocta y como base de operaciones en 2011. La Agencia Española de Meteorología aportó datos de todas las estaciones meteorológicas disponibles del Pirineo, e Isaac Pozo nos ayudó en los análisis. Agradecemos a los Gobiernos de Aragón y Navarra los permisos de captura durante estos años. Nuestros trabajos con ranas pardas en el Pirineo fueron en parte financiados por un proyecto de Investigación del Zoo de Barcelona (Ayuntamiento de Barcelona), y por un proyecto de Investigación en Parques Nacionales OAPN-MAGRAMA.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDRINO, J., FROUFE, E., ARNTZEN, J.W. & FERRAND, N. 2000. Genetic subdivision, glacial refugia and postglacial recolonization in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Molecular Ecology* 9: 771-781.
- ANNIS, S.L., DASTOOR, F.P., ZIEL, H., DASZAK, P. & LONGCORE, J.E. 2004. A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases* 40: 420-428.
- ARANO, B., ESTEBAN, M. & HERRERO, P. 1993. Evolutionary divergence of the Iberian brown frogs. *Annales des Sciences Naturelles – Zoologie* 14 (13): 49-57.
- ARRIBAS, O. 2004. Fauna y paisaje de los Pirineos en la Era Glaciar. *Lynx* Ed.
- BALCELLS, E. 1976. Observaciones en el ciclo biológico de anfibios de alta montaña y su interés en la detección del inicio de la estación vegetativa. *Publicaciones del Centro Pirenaico de Biología Experimental* 7 (2): 55-153.
- BOLGER, A.M., Lohse, M. & Usadel, B., 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15): 2114-2120.
- BOSCH, J., TEJEDO, M., MIAUD, C., MARTÍNEZ-SOLANO, I., SALVADOR, A., GARCÍA-PARÍS, M., RECUERO GIL, E., MARQUEZ, R., DÍAZ PANIAGUA, C., GENIEZ, P. 2009. *Rana pyrenaica* Serra-Cobo, 1993. Pyrenean frog. Pp. 510. En: Stuart, S. N., Hoffmann, M., Chanson, J. S., Cox, N. A., Berridge, R. J., Ramani, P., Young, B. E. (eds.). *Threatened Amphibians of the World*. IUCN, Conservation International. *Lynx*, Barcelona . 758 pp.
- BRADBURD, G.S., RALPH, P.L. & COOP, G.M. 2013. Disentangling the effects of geographic and ecological isolation on genetic differentiation. *Evolution* 67: 3258-3273.
- CARRANZA, S. & AMAT, F. 2005. Taxonomy, biogeography and evolution of *Euproctus* (Amphibia: Salamandridae), with the resurrection of the genus *Calotriton* and the description of a new endemic species from the Iberian Peninsula. *Zoological Journal of the Linnean Society* 145: 555-582.
- CARRANZA, S. & ARRIBAS, O. 2008. Genetic uniformity of *Rana pyrenaica* SERRA-COBO, 1993 across its distribution range: a preliminary study with mtDNA sequences. *Amphibia-Reptilia* 29: 579-582.
- CROWLEY, T. & NORTH, G.R. 1991. *Paleoclimatology*. Oxford University Press. New York.
- DUBOIS, A. 1982. Notes sur les grenouilles brunes (groupe de *Rana temporaria* Linné, 1758). I. Introduction. *Alytes* 1: 56-70.
- DUBOIS, A. 1983. Notes sur les grenouilles brunes (Groupe de *Rana temporaria* Linné, 1758). II. Les Grenouilles du Mont Canigou (Pyrenees Orientales). *Alytes* 2: 19-26.
- DUCHATEAU, S., BERRONEAU, M., CANTEGREL, L., GOYENCHE, L., DE REINACH HIRTZBACH, J., TILLO, S. 2012. Decouverte de *Rana pyrenaica* Serra-Cobo, 1993 (Anura, Ranidae) sur le versant nord des Pyrenees. *Bulletin de la Société Herpetologique de France* 142-143: 51-63.
- DUGUET, R. & MELKI, F. (eds.). 2003. *Les Amphibiens de France, Belgique et Luxembourg*. Collection Parthénope, éditions Biotope, Mèze.
- EHLERS, J. & GIBBARD, P. (eds.) 2004. *Quaternary glaciations-extent and chronology. Part I: Europe*. *Developments in Quaternary Science* no. 2. 488 pp.
- GIARDINE, B., RIEMER, C., HARDISON, R.C., BURHANS, R., ELNITSKI, L., SHAH, P., ZHANG, Y., BLANKENBERG, D., ALBERT, I., TAYLOR, J., MILLER, W., KENT, W.J., NEKRUTENKO, A. 2005. *Galaxy* : A platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome Research* 15: 1451-1455.
- GOECKS, J., NEKRUTENKO, A., TAYLOR, J. & THE GALAXY TEAM. 2010. *Galaxy* : a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biology* 11(R86).
- GOKA, K., YOKOYAMA, J.U.N., UNE, Y., KUROKI, T., SUZUKI, K., NAKAHARA, M. & HYATT, A.D. 2009. Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology* 18(23): 4757-4774.

- GÓMEZ, A., LUNT, D.H. 2007. Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. En: Phylogeography in Southern European Refugia. Weiss, S. & Ferrand, N. (eds.), pp. 155-188 Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- GRABHERR, M.G., HAAS, B.J., YASSOUR, M., LEVIN, J.Z., THOMPSON, D.A., AMIT, I., ADICONIS, Z., FAN, L. RAYCHOWDHURY, R., ZENG, Q., CHEN, Z., MAUCELL, E., HACOEN, N., GNIRKE, A., RHIND, N., DI PALMA, F., BIRREN, W. NUSBAUM, LINDBLAD-TOH, K., FRIEDMAN, N. & REGEV, I. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature biotechnology* 29(7): 644–652.
- GUILLAUME, C.P., HEULIN, B., ARRAYAGO, M.J., BEA, A. & BRAÑA, F. 2000. Refuge areas and suture zones in the Pyrenean and Cantabrian regions: geographic variation of the female MPI sex-linked alleles among oviparous populations of the lizard *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *Ecography* 23: 3-10.
- HAAS, B.J., PAPANICOLAOU, A., YASSOUR, M., GRABHERR, M., BLOOD, P.D., BOWDEN, J., COUGER, M.B., ECCLES, D., LI, BO., LIEBER, M., MACMANES M.D., OTT M., ORVIS J., POCHET, N., STROZZI, F., WEEKS, N., WESTERMAN, R., WILLIAM, T., DEWEY, CN., HENSCHER, R., D LEDUC, R.D., FRIEDMAN, N. & REGEV, A. 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature protocols* 8(8): 1494-1512.
- HEWITT, G.M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 359: 183-195.
- HITCHINGS, S.P. & BEEBEE, T.J.C. 1997. Genetic substructuring as a result of barriers to gene flow in urban *Rana temporaria* (common frog) populations: implications for biodiversity conservation. *Heredity* 79: 117-127.
- IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- LLAMAS, A., MARTÍNEZ-GIL, O., ARRIBAS, O. 1994. Estudio de la distribución y hábitat de *Rana pyrenaica* SERRA-COBO, 1993. Departamento de Medio Ambiente, Gobierno de Navarra. Inédito.
- LLAMAS, A., MARTÍNEZ-GIL, O., ARRIBAS, O. 1998. *Rana pyrenaica*, a new species for the French herpetofauna. *Boletín de la Sociedad Herpetológica Española* 9: 12-13.
- LÓPEZ-GARCÍA, J.M., BLAIN, H.A., ALLUÉ, E., BAÑULS, S., BARGALLÓ, A., MARTÍN, P., MORALES, J.I., PEDRO, M., RODRÍGUEZ, A., SOLÉ, A., & OMS, F. X. 2010. First fossil evidence of an “interglacial refugium” in the Pyrenean region. *Naturwissenschaften* 97(8): 753-761.
- MCRAE, B.H. & BEIER, P. 2007. Circuit theory predicts gene flow in plant and animal populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 19885-19890.
- MARTÍNEZ-RICA, J.P. 1980. Algunos datos sobre las poblaciones meridionales del tritón pirenaico *Euproctus asper* Dugès. *Studia Oecologica* 2: 135-154.
- MILÁ, B., GUILLAUME, O., CARRANZA, S. & CLOBERT, J. 2010. Marked genetic structuring and extreme dispersal limitation in the Pyrenean brook newt *Calotriton asper* (Amphibia: Salamandridae) revealed by genome-wide AFLP but not mtDNA. *Molecular Ecology* 19(1):108-20.
- MONTORI, A. 1988. Estudio sobre la biología y ecología del tritón pirenaico *Euproctus asper* (Dugès, 1852) en la Cerdanya. Tesis doctoral, Universitat de Barcelona, Barcelona.
- MONTORI, A., LLORENTE, G.A., SANTOS, X. & CARRETERO, M.A. 2002. *Euproctus asper*. En: Pleguezuelos, J.M., Márquez, R. & Lizana, M. (eds.) Atlas y libro rojo de los anfibios y reptiles de España. pp. 48-50. Dirección General de la Conservación de la Naturaleza-Asociación Herpetológica Española, Madrid.
- MONTORI, A., LLORENTE, G.A. & GARCIA-PARÍS, M. 2008. Allozyme differentiation among populations of the Pyrenean newt *Calotriton asper* (Amphibia: Caudata) does not mirror their morphological diversification. *Zootaxa* 1945: 39–50.
- MORITZ, C., PATTON, J.L., CONROY, C.J., PARRA, J.L., WHITE, G.C. & BEISSINGER, S.R. 2008. Impact of a century of climate change on small-mammal communities in Yosemite National Park, USA. *Science* 322(5899): 261-264.
- ORTEGA-MARTÍNEZ, M., FERRER-JUSTES, C. 2000. Los anfibios del Alto Aragón. Cuadernos Altoaragoneses de Trabajo, 23. Instituto de Estudios Altoaragoneses, Huesca.

- PALO, J.U., SCHMELLER, D.S., LAURILA, A., PRIMMER, C.R., KUZMIN, S.L. & MERILÄ, J. 2004. High degree of population subdivision in a widespread amphibian. *Molecular Ecology* 13: 2631-2644.
- REH, W. & SEITZ, A. 1990. The influence of land-use on the genetic structure of populations of the common frog *Rana temporaria*. *Biological Conservation* 54: 239-249.
- RICE, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- RIOBÓ, A., REY, J., PUENTE, M., MIRAMONTES, C. & VENCES, M. 2000. Ontogenetic increase of black dorsal pattern in *Rana temporaria*. *British Herpetological Society Bulletin* 70: 1-6.
- SCHMELLER, D.S. & MERILÄ, J. 2007. Demographic and genetic estimates of effective population and breeding size in the amphibian *Rana temporaria*. *Conservation Biology* 21: 142-151.
- SERRA-COBO, J. 1993. Descripción de una nueva especie europea de rana parda (Amphibia, Anura, Ranidae). *Alytes* 11: 1-15.
- SERRA-COBO, J. 1997. *Rana pyrenaica* Serra-Cobo, 1993. En: Pleguezuelos, J.M. (ed.), *Distribución y biogeografía de los anfibios y reptiles de España y Portugal* pp.167-168. Universidad de Granada-Asociación Herpetológica Española, Granada.
- SERRA-COBO, J. 2002. *Rana pyrenaica* Serra-Cobo, 1993. En: Pleguezuelos, J.M., Márquez, R., Lizana, M. (eds.). *Atlas y libro rojo de los anfibios y reptiles de España*, pp. 129-130. Ministerio de Medio Ambiente-Asociación Herpetológica Española, Madrid.
- SERRA-COBO, J., LACROIX, G. & WHITE, S. 1998. Comparison between the ecology of the new European frog *Rana pyrenaica* and that of four Pyrenean amphibians. *Journal of Zoology London* 246: 147-154.
- SERRA-COBO, J., MARQUES, T., MARTÍNEZ-RICA, J.P. 2000. Ecological segregation between *Rana pyrenaica* and *Rana temporaria*, and differential predation of *Euproctus asper* on their tadpoles. *Netherlands Journal of Zoology*, 50 (1): 65-73.
- Sexton, J.P., Hangartner, S.B. & Hoffmann, A.A. 2014. Genetic isolation by environment or distance: which pattern of gene flow is most common? *Evolution* 68: 1-15.
- UZQUIANO, P. 1995. The disappearance of *Picea* at the end of Upper Pleistocene in the Basque-Cantabrian region: climatic and anthropogenic factors. *Comptes rendus de l'Académie des sciences Serie II Science Terre Plan* 321: 545-551.
- VEITH, M., BAUMGART, A., DUBOIS, A., OHLER, A., GALÁN, P., VIEITES, D.R., NIETO-ROMÁN, S., VENCES, M. 2012. Discordant patterns of nuclear and mitochondrial introgression in Iberian populations of the common frog, *Rana temporaria*. *Journal of Heredity*;103(2): 240-9.
- VEITH, M., KOSUCH, J. & VENCES, M. 2003. Climatic oscillations triggered post-Messinian speciation of Western Palearctic brown frogs (Amphibia, Anura, Ranidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26: 310-327.
- VEITH, M., VENCES, M., VIEITES, D.R., NIETO-ROMAN, S. & PALANCA, A. 2002. Genetic differentiation and population structure within the Spanish common frogs (*Rana temporaria* complex; Ranidae, Amphibia). *Folia Zoologica* 51: 307-318.
- VENCES, M., GROSSENBACHER, K., PUENTE, M., PALANCA, A. & VIEITES, D.R. 2003. The Cambalès fairy tale: elevational limits of *Rana temporaria* (Amphibia: Ranidae) and other European amphibians revisited. *Folia Zoologica* 52(2): 189-202.
- VENCES, M., KUPFER, A., LLORENTE, G., MONTORI, A., CARRETERO, M. 1997. Description of the larval stages of the Pyrenean frog, *Rana pyrenaica* Serra-Cobo, 1993 (Amphibia: Ranidae). *Bolletino del Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino* 15 (1): 1-23.
- VENCES, M., HAUSWALDT S., STEINFARTZ S., RUPP, O., GOESMANN, A., KÜNZEL, S., OROZCO-TERWENGEL, P., VIEITES, D.R., NIETO-ROMAN, S., HAAS, S., LAUGSCH, C., GEHARA, M., BRUCHMANN, S., PABIJAN, M., LUDEWIG, A.K., RUDERT, D., ANGELINI, C., BORKIN, L.J., CROCHET, P.A., CROTTINI, A., DUBOIS, A., FICETOLA, F., GALÁN, P., GENIEZ, P., HACHTEL, M., JOVANOVIC, O., LITVINCHUK, S.N., LYMBERAKIS, P., OHLER, A., SMIRNOV, N.A. 2013. Radically different phylogeographies and patterns of genetic variation in two European brown frogs, genus *Rana*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 68: 657-670

- VIEITES, D.R. 2003 Temporal and spatial dynamics of a high mountain metapopulation of *Rana temporaria*. Ph.D. Thesis. Universidade de Vigo.
- VIEITES, D.R., VENCES, M. 2003. Rana pirenaica – *Rana pyrenaica*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Salvador, A., (ed). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>
- VIEITES, D.R., NIETO-ROMÁN, S., BARLUENGA, M., PALANCA, A., VENCES, M. & MEYER, A. 2004. Post-mating clutch piracy in an amphibian. *Nature* 431: 305-8.
- WRIGHT, S. 1943. Isolation by Distance. *Genetics* 28(2):114-38.
- WANG, I.J. & BRADBURD, G.S. 2014. Isolation by environment. *Molecular Ecology* 23 (23): 5649-5662.
- WANG, I.J. & SUMMERS, K. 2010. Genetic structure is correlated with phenotypic divergence rather than geographic isolation in the highly polymorphic strawberry poison-dart frog. *Molecular Ecology* 19: 447-458.