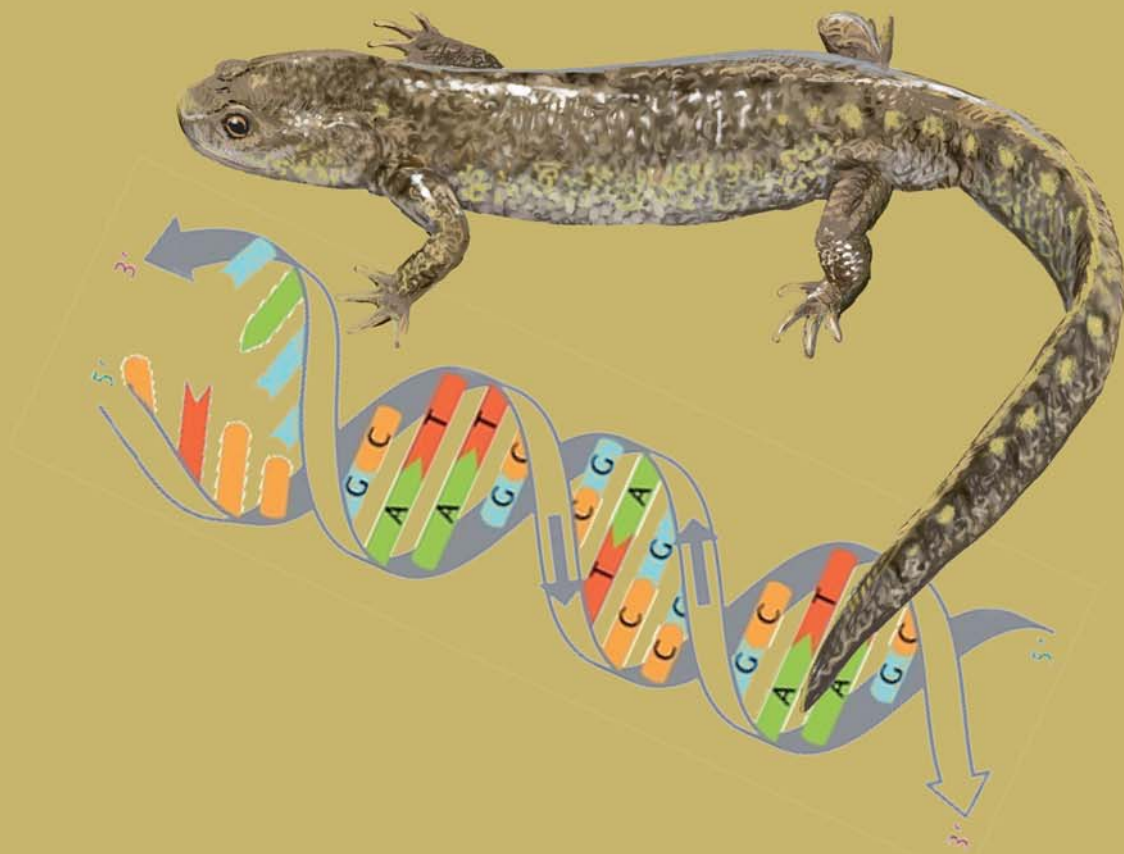


Tesi doctoral

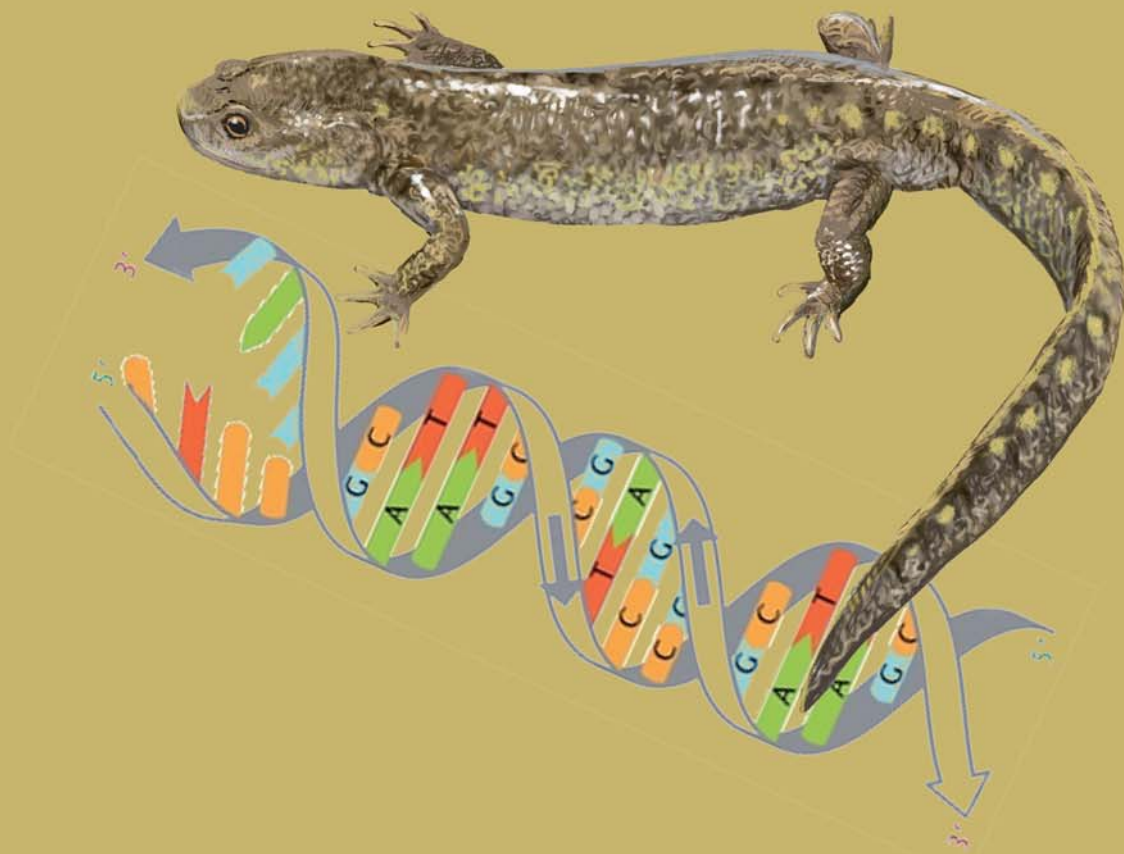
Conservation genetics of the critically
endangered Montseny brook newt
(*Calotriton arnoldi*)



Emilio Valbuena Ureña
2015

Tesi doctoral

Conservation genetics of the critically
endangered Montseny brook newt
(*Calotriton arnoldi*)



Emilio Valbuena Ureña

2015

*We should preserve every scrap of biodiversity as priceless while we learn to use it
and come to understand what it means to humanity*

E. O. Wilson



El tritó del Montseny (*Calotriton arnoldi*) és actualment una de les espècies de vertebrats més amenaçades d'Europa. Hi ha molts aspectes de la seva biologia i ecologia que encara es desconeixen. L'objectiu principal d'aquesta tesi és aportar els coneixements bàsic sobre la genètica del tritó del Montseny per tal que siguin útils per a la conservació de l'espècie, contribuint així a aclarir algunes de les moltes llacunes que estan pendents d'esbrinar.

En general la informació que es genera en aquesta tesi pretén ser útil en la identificació de les diferents unitats de gestió i en l'aplicació de mesures de conservació per protegir a una espècie que requereix mesures urgents de protecció. Per assolir aquest objectiu principal, s'han detallat uns objectius concrets:

- Estudiar la filogeografia de les dues espècies del gènere *Calotriton*, per tal d'analitzar els efectes dels canvis climàtics del Pleistocè en l'evolució d'aquestes dues espècies.
- Desenvolupar una bateria de *loci* microsatèl·lits útil per a estudiar la diversitat genètica en les poblacions del tritó del Montseny.
- Estudiar la caracterització genètica de l'espècie a diferents nivells, utilitzant diferents marcadors molecular. Això es pot desglossar en:
 - Determinar l'estructura i la variació genètica en tot el rang de distribució de l'espècie.
 - Inferir el grau de flux genètic entre les poblacions actuals.
 - Avaluar el seu estat de conservació en termes de diversitat i diferenciació genètica, endogàmia i mida efectiva de la població.
- Definir les unitats de maneig o unitats evolutives significatives (ESU's), indispensables per a la gestió de la diversitat intraespecífica de *Calotriton arnoldi*, combinant dades moleculars i morfològiques.
- Analitzar i avaluar la representativitat de la variabilitat genètica del programa de cria en captivitat de l'espècie, per tal d'establir unes recomanacions per a fer una bona gestió de l'espècie, tant ex situ, a través del programa de cria, com in situ, a través de les reintroduccions.

Per aconseguir aquests objectius, s'han realitzat una sèrie de treballs, que engloben la present tesi. L'estructuració és la següent:

El Capítol IV estudia la filogeografia del gènere *Calotriton* per tal d'entendre la separació de les dues espècies del gènere, i analitza en profunditat la possible correlació entre la distribució geogràfica de *C. arnoldi* i la diferenciació morfològica i estructura genètica. En aquest treball s'integren diferents metodologies, la distribució potencial d'espècies (*species distribution modelling*, SDM), l'anàlisi molecular de dos gens (un nuclear i l'altra mitocondrial) i anàlisis morfomètriques.



Valbuena-Ureña E, Amat F, Carranza S (2013) Integrative Phylogeography of *Calotriton* Newts (Amphibia, Salamandridae), with Special Remarks on the Conservation of the Endangered Montseny Brook Newt (*Calotriton arnoldi*). PLoS ONE 8(6): e62542. doi: 10.1371/journal.pone.0062542

Una vegada assentades les bases biogeogràfiques de l'espècie objecte d'estudi, es pretén aprofundir en el coneixement genètic de l'espècie a una escala més resolutive, caracteritzant les seves poblacions. Amb aquest objectiu s'utilitzaran marcadors moleculars microsatèl·lits. El Capítol V s'enfoca en desenvolupar 15 marcadors microsatèl·lits polimòrfics específics per a *C. arnoldi*. Aquest treball metodològic servirà d'eina per als següents estudis.

Valbuena-Ureña E, Steinfartz S, Carranza S (2014) Characterization of microsatellite loci markers for the critically endangered Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*). Conservation Genetics Resources 6: 263-265.

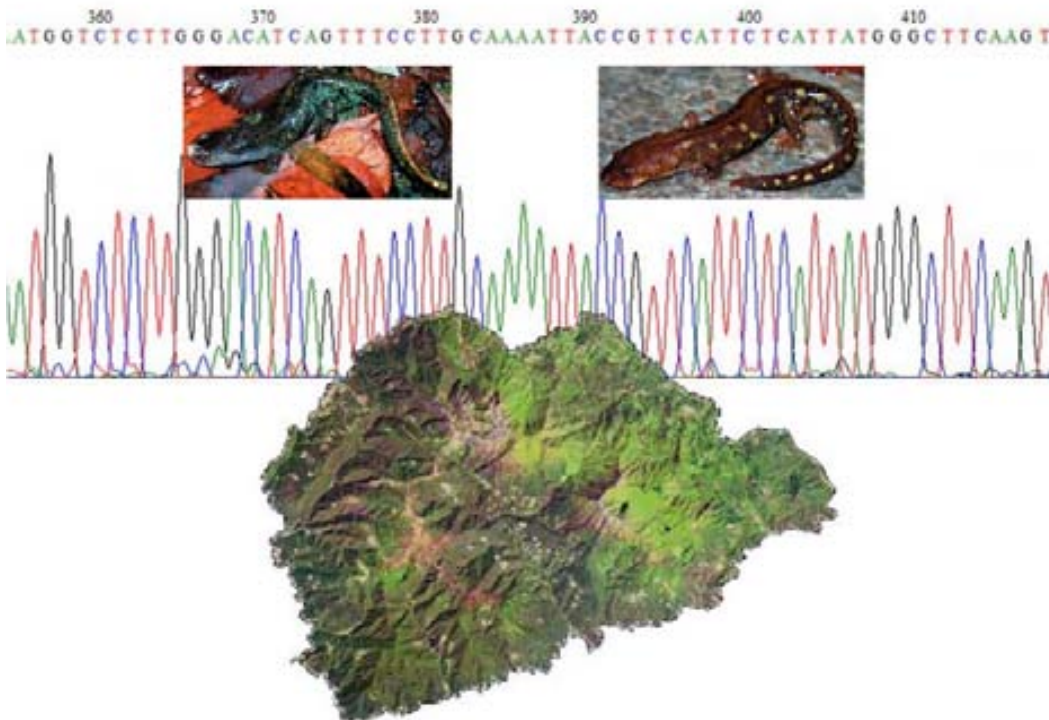
El tercer estudi (Capítol VI) és un dels treballs principals de la tesi, i es centra en la caracterització i estructuració genètica de les poblacions del tritó del Montseny, mitjançant l'anàlisi de 24 microsatèl·lits (els 15 anteriorment dissenyats més 9 cross-amplificats de *C. asper*). En aquest treball s'utilitza l'espècie com a model d'un cas extrem d'amfibi amb una àrea de distribució restringida i fragmentada, amb taxes de dispersió molt baixes i amb uns patrons esperats d'aïllament genètic alts. S'avalua l'efecte de la fragmentació de les poblacions en la genètica de l'espècie i es discuteix la implicació que pot tenir aquest efecte en la conservació de l'espècie.

Valbuena-Ureña E, Soler-Membrives A, Steinfartz S, Carranza S (1st review) Advantage or burden – habitat fragmentation in a critically endangered amphibian species (*Calotriton arnoldi*) and its implicacions for species conservation. Molecular Ecology.

En el Capítol VII, s'avalua la diversitat genètica del programa de conservació ex situ de *C. arnoldi*. Es caracteritzen els fundadors i primers descendents del programa de cria en captivitat, i es comparen els resultats obtinguts en les poblacions salvatges, amb l'objectiu d'avaluar el potencial evolutiu de l'estoc captiu actual, així com proposar mesures per millorar la representativitat i l'èxit a llarg termini del programa de cria en captivitat de l'espècie.

Valbuena-Ureña E, Soler-Membrives A, Steinfartz S, Alonso M, Carbonell F, Larios R, Obon E, Carranza S (to submit) Evaluating the ex situ conservation project of the critically endangered Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*): are we going in the right direction? Conservation genetics.

Valbuena-Ureña E, Amat F, Carranza S (2013) Integrative Phylogeography of *Calotriton* Newts (Amphibia, Salamandridae), with Special Remarks on the Conservation of the Endangered Montseny Brook Newt (*Calotriton arnoldi*). PLoS ONE 8(6): e62542. doi: 10.1371/journal.pone.0062542



Integrative Phylogeography of *Calotriton* Newts (Amphibia, Salamandridae), with Special Remarks on the Conservation of the Endangered Montseny Brook Newt (*Calotriton arnoldi*)

Emilio Valbuena-Ureña^{1,2*}, Fèlix Amat³, Salvador Carranza⁴

1 Unitat de Zoologia (Facultat de Biociències), Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Catalonia, Spain, **2** Centre de Fauna Salvatge de Torreferrussa, Forestal Catalana, Barcelona, Catalonia, Spain, **3** Museu de Ciències Naturals de Granollers, Àrea d'Herpetologia, Granollers, Catalonia, Spain, **4** Institute of Evolutionary Biology (CSIC-Universitat Pompeu Fabra), Barcelona, Catalonia, Spain

Abstract

The genus *Calotriton* includes two species of newts highly adapted to live in cold and fast-flowing mountain springs. The Pyrenean brook newt (*Calotriton asper*), restricted to the Pyrenean region, and the Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*), endemic to the Montseny massif and one of the most endangered amphibian species in Europe. In the present manuscript, we use an integrative approach including species distribution modeling (SDM), molecular analyses of mitochondrial and nuclear DNA sequence data and morphology to unravel the historical processes that have contributed to shaping the biogeography and genetic structure of the genus *Calotriton*, with special emphasis on the conservation of *C. arnoldi*. The results of the molecular analyses confirm that, despite having originated recently, being ecologically similar and geographically very close, there is no signal of hybridization between *C. asper* and *C. arnoldi*. SDM results suggest that tough environmental conditions on mountains tops during glacial periods, together with subsequent warmer periods could have prevented the contact between the two species. Within the critically endangered *C. arnoldi*, a high genetic structure is revealed despite its extremely small distribution range compared to *C. asper*. Haplotype networks, AMOVA and SAMOVA analyses suggest that two distinct groups of populations can be clearly differentiated with absence of gene flow. This is in concordance with morphological differentiation and correlates with its geographical distribution, as the two groups are situated on the eastern and western sides of a river valley that acts as a barrier. The genetic and morphological results are highly important for the ongoing conservation program of *C. arnoldi* and strongly justify the management of this species into at least two independent evolutionary significant units (eastern and western sectors) to guarantee the long-term population viability.

Citation: Valbuena-Ureña E, Amat F, Carranza S (2013) Integrative Phylogeography of *Calotriton* Newts (Amphibia, Salamandridae), with Special Remarks on the Conservation of the Endangered Montseny Brook Newt (*Calotriton arnoldi*). PLoS ONE 8(6): e62542. doi:10.1371/journal.pone.0062542

Editor: Carles Lalueza-Fox, Institut de Biologia Evolutiva – Universitat Pompeu Fabra, Spain

Received: January 14, 2013; **Accepted:** March 22, 2013; **Published:** June 4, 2013

Copyright: © 2013 Valbuena-Ureña et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by Forestal Catalana, S.A., and DAAM of the Generalitat de Catalunya. Miloca and Zoo de Barcelona (PRIC-2011) also helped with the funding of this study. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Miloca and Zoo de Barcelona helped with the funding of this study, but this does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: emiliojavier.valbuena@uab.cat

Introduction

The evolutionary history of species strongly depends on the variation of their distributions throughout time and space. For instance, it is well known that during the Pleistocene many species shifted their distribution ranges as a result of the climatic cycles ([1] and references herein). The Quaternary age includes the last 2.6 My encompassing the Pleistocene and Holocene periods to the present. The Holocene is characterized for its relative climatic stability compared to the Pleistocene. The latter is notable for its strong oscillations in the climate with subsequent glacial and interglacial periods that have had a great impact on the distribution and evolution of species [2]. The effect of the ice ages on European species has been extensively studied ([3] and references herein). The fluctuating environmental conditions found during the recurrent ice ages, forced populations to migratory processes of contraction and expansion of their

geographic ranges. During cold periods, the mountainous parts of southern Europe are likely to have provided suitable habitats for the species to survive acting as glacial refugia [4]. Further expansion from refugia occurred when the temperature increased. These successive colonization processes implied bottlenecks that may facilitate allopatric speciation in refugia [5], [6], [7]. Genetic divergence among populations may occur during periods of isolation, while dispersion processes and gene flow may take place during connectivity periods [4], [8], [9], [10]. Therefore, the actual distribution and genetic characteristics of species have been influenced by their past population history trends [11], [12].

Amphibians are good models to explore the influence of historical aspects on the genetic structure at different geographic scales ([13], [14], [15], [16], among others). This can be explained by the retention of strong phylogeographic signal due to the low dispersal capacity [17], and sensibility to small environmental changes [6]. Population differentiation related to the Pleistocene



glaciations has been postulated among alpine urodeles [18], [19], [20]. Species distribution models (SDM) are useful for inferring climate-based potential distributions throughout the recent geological history and testing the existence of environmental barriers that could affect gene flow between closely related species [7], [21]. Thus, the combination of SDM and phylogeographic analyses is a good strategy to correctly interpret the actual genetic and geographic structure of species.

The genus *Calotriton* Gray, 1858, includes only two species adapted to live in cold and fast-flowing waters: the Pyrenean brook newt (*Calotriton asper*) and the Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*). According to Carranza & Amat [20] the two species split during the Pleistocene, approximately 1.1–2 Mya. Although they have been evolving independently, their actual distribution ranges are only separated by 25 km in a straight line. The Pyrenean brook newt is the most widely distributed of the two species, occupying more than 20000 km² across the Pyrenean mountain chain (NE Iberian Peninsula) with some populations extending northwards and southwards, reaching the Prepyrenees [22] (see Figure 1). In contrast, the endemic Montseny brook newt has a very restricted distribution range, occupying a small area of 20 km² restricted to a few brooks in the Montseny massif [23], [24], [25], [26] (see Figure 1). Currently, a total of 7 populations of *C. arnoldi* have been found, fragmented into two main population groups on both sides of the Tordera river valley separated by inhospitable habitat. The eastern and western sectors comprise three and four populations, respectively, with a total estimation of 1000–1500 mature individuals [27]. Owing to its restricted and fragmented distribution and its low population density, *C. arnoldi* is catalogued as Critically Endangered in the International Union for Conservation of Nature (IUCN) Red List of Threatened Species.

Currently, the conservation planning is in the process of development by the Catalan Government in order to ensure the survival of this species.

The study of the phylogeography of the genus *Calotriton* provides an interesting opportunity to analyze in detail the effects of the Pleistocene climatic changes on the evolution of these two species. Additionally, understanding its population structure and evolutionary history is essential for formulating the appropriate conservation strategies and management proposals, such as identifying the management units (ESU, Evolutionary Significant Unit [28]) for one of the European amphibian species with the smallest distribution range and one of the most endangered. Herein, we use an integrative approach by combining molecular and SDM analyses to unravel the historical processes that have contributed to shaping the biogeography and genetic structure of this south-western Europe endemic newt genus. This work also focuses on the genetic structure of the Montseny brook newt and its morphological differentiation within its small and fragmented distribution range.

Materials and Methods

Ethics Statement

The collection of all samples was conducted under the licenses required by the corresponding authorities. Permits were given by the following institutions: Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca Alimentació i Medi Natural of the Catalan Government, with the permission numbers SF/298 and SF/469 for all samples of *C. arnoldi* and SF/90 and SF/429 for *C. asper*; Servicio de Conservación de la Biodiversidad, Departamento de Desarrollo Rural y Medio Ambiente of the Navarra Government, with the

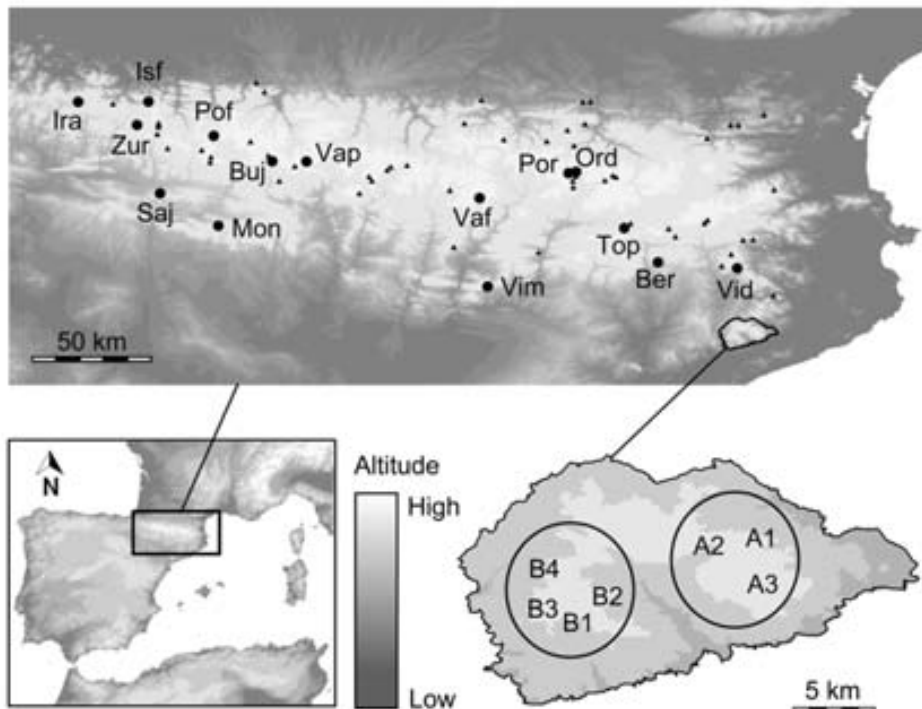


Figure 1. The study area in the NE Iberian Peninsula showing the distribution of the genus *Calotriton*. Circles indicate populations of *C. asper* included in the molecular analyses; triangles correspond to additional populations included in the species distribution modeling (SDM). All localities of *C. arnoldi* are included in the molecular analyses. Locality codes correspond to names on Table 1. Localities of *C. arnoldi* represented do not correspond to the exact geographic locations intentionally due to conservation reasons.

doi:10.1371/journal.pone.0062542.g001

Table 1. Sampling locations and number of individuals collected per site (N) for *Calotriton arnoldi* and *C. asper*.

Species	Pop. codes	Sampling site	Mitochondrial features		Nuclear features	
			N	Ocurrence and code (in brackets) of haplotypes	N	Ocurrence and code (in brackets) of haplotypes
<i>Calotriton arnoldi</i>	A1	Montseny, Spain	21	16(h2), 4(h3), 1(h4)	19	26(h2), 12(h3)
	A2	Montseny, Spain	16	16(h2)	9	1(h2), 17(h3)
	A3	Montseny, Spain	5	5(h2)	5	3(h2), 7(h3)
	B1	Montseny, Spain	20	20(h1)	14	28(h1)
	B2	Montseny, Spain	20	20(h1)	10	20(h1)
	B3	Montseny, Spain	20	20(h1)	15	30(h1)
	B4	Montseny, Spain	3	3(h1)	3	6(h1)
		Total <i>C. arnoldi</i>	105		75	
<i>Calotriton asper</i>	Vid	Vidrà, Spain	15	15(h9)	5	10(h4)
	Ber	Berga, Spain	21	21(h9)		
	Top	La Cerdanya, Spain	19	19(h9)		
	Vim	Vilanova de Meià, Spain	18	18(h9)		
	Ord	Ordino, Andorra	34	4(h5), 30(h9)	1	2(h4)
	Vaf	Vall Fosca, Spain	21	21(h12)		
	Vap	Valle de Pineta, Spain	26	9(h7), 17(h8)		
	Isf	Isaba, France	18	17(h9), 1(h10)		
	Zur	Zuriza, Spain	21	8(h7), 13(h9)		
	Ira	Iratí, Spain	15	13(h9), 2(h11)	13	13(h4), 13(h5)
	Mon	Pto. Monrepós, Spain	24	23(h5), 1(h9)	9	18(h5)
	Saj	San Juan de la Peña, Spain	22	18(h5), 4(h6)		
	Por	Port du Rat, France	12	12(h5)		
	Buj	Bujaruelo, Spain	36	33(h5), 3(h8)	5	10(h5)
	Pof	Portalet, France	13	13(h5)		
		Total <i>C. asper</i>	315		33	
		Total N	420		108	

Mitochondrial (cytochrome *b*) and nuclear (RAG-1) haplotypes detected in each sampling site (haplotype codes in brackets) and number of occurrences of each haplotype.

doi:10.1371/journal.pone.0062542.t001

permission number 2012/721 for *C. asper*; Instituto Aragonés de Gestión Ambiental, Area II-Biodiversidad of Aragon Government, with the permission numbers 24/2010/901 and 24/2012/661 for *C. asper*. Tissue samples were collected according to the

requirements of the above administrative institutions: newts were captured manually and tissue samples from tail tips and morphological measurements were taken without the use of anesthetics to avoid accidental mortality. Immediately after the

Table 2. Linear morphometric variables used in the analysis of morphological differentiation of *Calotriton arnoldi*.

Variable	Abbreviation	Linear measurement
Snout-vent length	SVL	From the snout to the posterior margin of cloacal protuberance
Head length	HL	From the snout to the gular fold
Head width	HW	Maximum dorsal head width
Forelimb length	FLL	From the tip of the largest toe to the insertion point at right ventral side
Hindlimb length	HLL	From the tip of the largest toe to the insertion point at right ventral side
Limb interval	LI	Minimum distance between the insertion points at right ventral side
Tail length	TL	From the tip to the posterior margin of the cloacal protuberance
Tail height	TH	Maximum tail height

doi:10.1371/journal.pone.0062542.t002

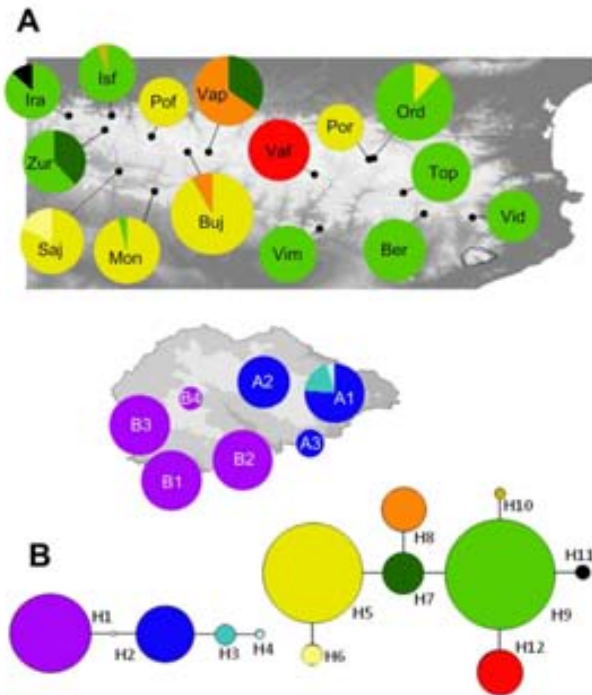


Figure 2. Map showing the geographical distribution of Cyt *b* DNA haplotypes. (A) Pie diagram size indicates number of individuals. (B) Statistical parsimony networks showing cytochrome *b* haplotypes found for *Calotriton arnoldi* (left) and *C. asper* (right); circle size are proportional to haplotype abundance, straight lines and black dots reflect mutations and unsampled or extinct haplotype. doi:10.1371/journal.pone.0062542.g002

completion of the procedure, tissue samples were stored in absolute ethanol and all newts were released at the collection site. No individuals were brought to the laboratory or sacrificed.

Field sampling and DNA sequencing

A total of 420 individuals were analyzed for the cytochrome *b* gene, of which 315 correspond to *C. asper* from 15 different localities covering most of its distribution range and 105 to *C. arnoldi*, including samples from the complete distribution range of the species (seven populations). For the RAG-1 gene 33 and 75 specimens were analyzed, respectively. The number of individuals collected at each site and sampling locations are reported on Table 1. In order to preserve the critically endangered populations of *C. arnoldi* the three eastern populations are herein referred as A1, A2, A3, and the four western populations as B1, B2, B3 and B4. Tissue samples consisted of tail tips or fingers preserved in absolute ethanol until further analysis. Genomic DNA was extracted using Qiaagen™ (Valencia, California) DNeasy Blood and Tissue Kit following the manufacturer's protocol. A region of 374 bp of the *cyt b* gene was amplified using primers Cytb1EuprF and Cytb2EuprR [20] and using the same PCR conditions as in Carranza *et al.* [29]. Additionally, the following primers were designed to sequence a fragment of 530 bp of the RAG-1 gene: CaloRAG1-831F 5'-CGGTACGAGATCTGGCGGTCC-3' and CaloRAG1-1362R 5'-TATCTCAGGCACGTGGGCTAGT-3'; the PCR program used for this region included an initial denaturing step at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 55°C for 45 s, extension at 72°C for 1 min, and a final extension of 72°C for

5 min. Sequences were aligned using BioEdit 7.0.1 [30] and variable sites were checked visually for accuracy. Coding gene sequences were translated into amino acids using the vertebrate mitochondrial code and standard code, and no stop codons were observed, suggesting that they were probably all functional. Direct sequencing of PCR products for RAG-1 revealed a single nucleotide site at which individuals were heterozygous. Diploid amplified sequences were represented by two alleles [16], [31].

Molecular data analyses

Network approaches may be more effective than classical phylogenetic ones in order to represent intraspecific evolution [32]. As a result networks were inferred using statistical parsimony [33] as implemented in the program TCS 1.21 [34], with 95% connection limit between haplotypes.

An analysis of molecular variance (AMOVA) calculating *F*-statistics [35] was used to determine the level of genetic differentiation between *C. arnoldi* populations from the two different sides of the Tordera river valley (western vs eastern populations) using ARLEQUIN ver 3.5.1.2 [36]. Levels of significance were determined through 1023 random permutation replicates. Population genetic structure was assessed by performing the spatial analysis of molecular variance (SAMOVA, version 1.0 [37]). Number of haplotypes (*h*) and variable sites (*S*), and haplotype (*Hd*) and nucleotide (*Π*) diversity indices, for each marker were calculated in DNASP v5 [38].

Species distribution modelling

Calotriton arnoldi was excluded from the SDM as only seven localities are known to date separated each other by a maximum of 6 km. Unfortunately the number of populations is not enough to carry out a reliable prediction. Therefore, SDM was only performed for *C. asper*.

A total of 69 localities (Figure 1), covering the entire distribution range of *C. asper* were used. These localities included our own collection sites (53 localities), and 16 additional species records derived from Milà *et al.* [39].

The study area comprised the northeast part of the Iberian Peninsula (from 44°12'N, 7°18'W to 41°0'N, 3°48'E). Initially, a total of 19 BioClim variables were downloaded from the WorldClim database version 1.4 (<http://www.worldclim.org/>) to form the present and past (Last Glacial Maximum, LGM and Last Interglacial, LI) climatic datasets [40], [41] at a scale of 30 arc seconds for present and LI periods and 2.5 arc minutes for the LGM. Past climate scenarios for the LGM period were reconstructed by two general atmospheric circulation models: the Community Climate System Model (CCSM, <http://www.cesm.ucar.edu>) and the Model Interdisciplinary Research on Climate (MIROC, <http://www.csr.u-tokyo.ac.jp/~hasumi/MIROC/>).

To avoid autocorrelation and over fitting of our data, collinearity among the initial 19 BioClim variables was tested using the Pearson's correlation coefficient in SPSS 17.0 [42], sampling 1000 random points from the studied area ensuring a minimal distance. Seven environmental variables with a Pearson coefficient correlation value lower than 0.8 were retained. The uncorrelated variables that contributed most to the model and therefore were the most likely to influence the occurrence of *C. asper* were selected: Mean Temperature of Driest Quarter (BIO9), Annual Precipitation (BIO12) and Precipitation Seasonality (BIO15). Topographical variables and landcover were only available from the same database for current conditions. Altitude was downloaded from WorldClim database, slope was calculated using ARCGIS 10.0 (ESRI, Redlands, CA) and aspect was reclassified into four

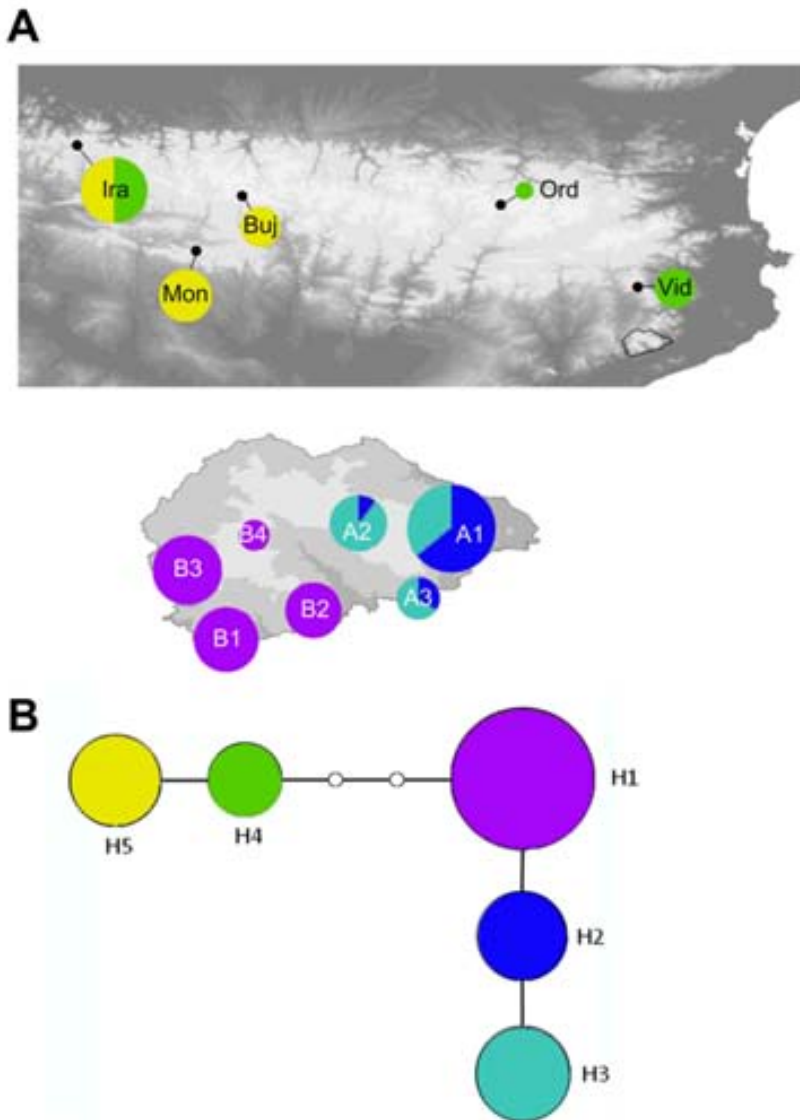


Figure 3. Map showing the geographical distribution of RAG-1 DNA haplotypes. (A) Pie diagram size indicates number of individuals. (B) Statistical parsimony network showing nuclear haplotypes found for *Calotriton* genus; circle sizes are proportional to haplotype abundance, straight lines and black dots reflect mutations and unsampled or extinct haplotype. doi:10.1371/journal.pone.0062542.g003

classes (North, East, South and West) using the same program. Landcover was downloaded from the Global Environment Monitoring database (bioval.jrc.ec.europa.eu). To account for geological range constraints, we additionally used lithology (dominant parent material) derived from the European Soil Database v. 2 [43] as a categorical predictor variable, encompassing 43 categories of geological material in the Iberian Peninsula. Because the geology is unlikely to have changed significantly since the LGM, we treated the lithology as constant [44]. SDM were generated following the maximum entropy modelling implemented in Maxent 3.3.3e [45]. This algorithm has been proven to produce high quality predictions using environmental parameters in combination with geographical presence-data of species, [15], [46], [47]. Geographical occurrences were partitioned between training and test samples (75% and 25%, respectively), as this has been proven to provide high predictive

accuracy [48]. The fade-by-clamping option was used in Maxent to remove heavily clamped pixels from the final models. As ensemble model predictions may enhance the reliability and robustness of SDM results [49], a hundred models with randomly selected test samples were computed. The average output probability of presence of the species was set to logistic format. The model performance was evaluated using the area under the curve (AUC) of the receiver operating characteristics (ROC) curve plots, which plot the true-positive rate against the false-positive rate. Models with AUC values above 0.75 are considered useful [46], [50], [51]. The model was evaluated using a null model procedure [52]. We generated 999 sets of 69 random occurrence points (equal to the number of real occurrence points in our dataset) using ENMTools Version 1.3 [53]. We used Maxent to calculate AUC for each of the 999 null datasets and tested whether the AUC of the *C. asper* dataset exceeded the 95th percentile of the



Table 3. Mitochondrial (*Cyt b*) and nuclear (*RAG-1*) DNA diversity statistics for *Calotriton asper* and *C. arnoldi*.

		<i>Calotriton asper</i>		<i>Calotriton arnoldi</i>		
		Total		Total	Eastern sector	Western sector
Cyt b	n	315		105	42	63
	H	8		4	3	1
	S	7		4	2	0
	Π	0,00331 (0,0001)		0,00276 (0,00019)	0,00066 (0,00026)	0
	Hd	0,666 (0,018)		0,495 (0,032)	0,206 (0,076)	0
RAG-1	N	66		150	66	84
	H	2		3	2	1
	S	1		2	1	0
	Π	0,00090 (0,00006)		0,00163(0,00008)	0,00095(0,00003)	0
	Hd	0,478 (0,031)		0,593(0,028)	0,503(0,015)	0

Number of sequences (n), haplotypes (h) and variable sites (S), and nuclear (Π) and haplotype diversities (Hd). Standard deviations in brackets.
doi:10.1371/journal.pone.0062542.t003

null dataset AUCs. These randomly generated models can be used as a null-hypothesis against which to test the significance of species distribution models. If the AUC of the Pyrenean brook newt was significantly higher than the AUC of randomly generated models, it was considered as evidence that the species distribution model performs significantly better than expected by chance [52].

Morphometric analysis

One hundred and sixty-three adult specimens of *Calotriton arnoldi* were included in the morphological analyses, 57 (36 males and 21 females) and 106 (55 males and 51 females) from western and eastern sectors, respectively. Eight linear morphometric measurements were obtained using a digital caliper (Table 2): snout-vent length (SVL), head length (HL), head width (HW), forelimb length (FLL) and hindlimb length (HLL), limb interval (LI), tail length (TL), and tail height (TH). Sex and adulthood of individuals was determined by the morphology of the cloacal protuberance [20]. Multivariate analyses were used to test geographic differences on morphometric variables between the two sectors within the distribution range of *C. arnoldi* using discriminant canonic analysis and multivariate analysis of variance (MANOVA). All analyses were performed on log-transformed variables using Statistica v.5.5 software (Stat Soft Inc., Tulsa, OK).

The pattern of body coloration of 189 *C. arnoldi* (108 from the eastern sector and 81 from the western one) was examined focusing on the lack or presence of pale yellow spots on the dorsal side and patches on the head of the newts.

Results

Analyses of genetic structure

The final mtDNA data set included 374 bp of the *cyt b* gene (24 variable and 22 parsimony-informative positions). The nDNA data set included 530 bp (6 variable positions, all of them parsimony-informative). Of the 12 *cyt b* haplotypes identified, 8 were found in *C. asper* and 4 in *C. arnoldi* (Figure 2), whereas of the 5 *RAG-1* haplotypes found, 2 corresponded to *C. asper* and 3 to *C. arnoldi* (Figure 3). The number of individuals sequenced and occurrences of each haplotype per sampling site are given in Table 1. The sequences of all mitochondrial and nuclear haplotypes have been deposited in GenBank; accession numbers KC665954–KC665970. The number of haplotypes (h) and variable sites (S), and estimates of nucleotide (Π) and haplotype (Hd) diversity for each marker in each sampled species are shown in Table 3. For the mtDNA, similar levels of Π and Hd were observed, being slightly higher for *C. asper* than *C. arnoldi*. Instead, for the nDNA both values were, on average, higher for *C. arnoldi*. Within the Montseny brook newt, all 42 specimens from the western sector corresponded to the same unique haplotype for both mitochondrial and nuclear markers, thus Π and Hd were null.

Geographical distribution of haplotypes and the haplotype networks for *cyt b* and *RAG-1* markers showing the relationship between both species are displayed in Figures 2 and 3. The statistical parsimony analysis for the mitochondrial marker sorted haplotypes from the two species into independent networks, while all the haplotypes were connected into a single network with the same percentage of divergence for the nuclear marker. The *C. asper cyt b* haplotype network comprised eight haplotypes, and adjacent

Table 4. Analysis of molecular variance (AMOVA) between *Calotriton asper* and *C. arnoldi*.

	Percentage of variation			Fixation indices		
	Among groups	Among populations within groups	Within populations	F _{SC}	F _{ST}	F _{CT}
Cyt b	91.44	7.38	1.19	0.86111**	0.98810**	0.91435**
RAG-1	79.61	16.40	3.99	0.80429**	0.96010**	0.79611*

*P<0.05, ** P<0.0001.
doi:10.1371/journal.pone.0062542.t004

Table 5. Spatial analysis of molecular variance (SAMOVA) and analysis of molecular variance (AMOVA) for *Calotriton arnoldi*.

		Percentage of variation		Within populations	Fixation indices		
		Among groups	Among populations within groups		F _{SC}	F _{ST}	F _{CT}
SAMOVA	Cyt <i>b</i>	93.23	0.48	6.28	0.07149	0.93716**	0.93716*
	RAG-1	83.20	5.46	11.34	0.32489**	0.88659**	0.83201*
AMOVA	Cyt <i>b</i>	94.89	0.52	4.59	0.10136	0.95410**	0.94892*
	RAG-1	83.16	6.45	10.39	0.38313**	0.89609**	0.83156*

*P<0.05, ** P<0.0001

Two geographical groupings are showed corresponding to eastern and western sectors.

doi:10.1371/journal.pone.0062542.t005

haplotypes were separated by one single step. Individual haplotypes represented samples from between one and eight sampling sites. The *C. arnoldi* haplotype network for the same marker showed four haplotypes. The eastern sector included three haplotypes consecutively connected to each other by one step, and separated from the single western haplotype by two steps. The single RAG-1 parsimony network showed three steps between *C. arnoldi* and *C. asper* haplotypes, while one step connected haplotypes within each species.

Analyses of molecular variance were consistent with high levels of structure in both markers, when populations of the genus *Calotriton* were divided into species groups (Table 4). For the cyt *b* marker, the overall differentiation among populations was high and statistically significant (F_{ST} = 0.988, P<0.001), and for the nuclear marker, the overall F_{ST} value was 0.960 (P<0.001).

Within *C. arnoldi*, the genetic structure obtained by SAMOVA identified the same geographic structure found among the haplotype networks drawn in the phylogeographic analyses. The best partitioning of the genetic diversity by SAMOVA was obtained when samples were grouped into two groups, corresponding to the western and eastern sectors (data shown in Table 5 for K=2). The genetic structure found in AMOVA analyses for the mitochondrial marker showed an overall F_{ST} = 0.954 (P<0.0001). Among groups variation was statistically significant (F_{CT} = 0.949; P<0.05). Only 0.52% of variance was a result of differences among populations within these groups, and 4.59% within populations. The nuclear marker showed similar but slightly lower values (F_{ST} = 0.896, P<0.0001; F_{CT} = 0.832; P<0.05). Most variation was explained by the among groups differences (83.16%), with variation values of 6.45% and 10.39% for among-populations within-groups and within-populations, respectively.

Species distribution modelling

The predicted geographic distributions for *C. asper* under present and past conditions are shown in Figure 4. Maximum entropy modelling produced high predictive accuracy models, according to the average testing AUC for the present SDM using climate, topography, lithology and landcover variables (AUC = 0.934±0.013). SDM inferred for the past conditions using climate and lithology also showed overall an adequate fit to the distributions. The distribution models based on the LI conditions presented an AUC value of 0.921±0.016, and over 0.92 based on LGM predictions (CCSM 0.924±0.016, MIROC 0.925±0.013). The AUC of these models were significantly higher than the null-model AUCs (the 95th percentiles of the null dataset were 0.618, 0.620, 0.629 and 0.619 for the present, CCSM, MIROC and LI, respectively). This indicates a good fit of the models.

SDM predictions based on current climate data showed a wide predicted distribution throughout the Pyrenean mountain chain (NE Iberian Peninsula), with some areas of suitable habitat southwards along the Montseny massif (Figure 4), although a slight disruption of the distribution can be observed when the connection area between the Pyrenees and Montseny is focused. The projection of this model onto Pleistocene climate surfaces indicates different periods of expansion and retraction. The predicted distribution based on LI conditions indicates lower surface of suitable habitat in comparison to the present predicted distributions. This model showed that the suitable distribution for *C. asper* during the last interglacial was restricted to the central areas of the Pyrenees, being almost absent southwards of the Montseny. During the last glacial maximum *C. asper* presented a range expansion. The predicted distribution spreads to lower altitudes, being absent from the highest parts of the mountain chain. A continuous predicted distribution from the Pyrenean chain to the southern Montseny massif is observed. The extent of range expansion is variable depending on the climatic model, being more apparent under the CCSM than under the MIROC. These models indicate that several areas of suitable habitat (potential glacial refuge) existed in the glacial periods.

Morphological data

MANOVA analysis found sexual (Wilk's Lambda = 0.143; P<0.0001) and population (Wilk's Lambda = 0.576; P<0.0001) significant differences without interaction between these two factors (Wilk's Lambda = 0.907; P=0.058). A posthoc test for unequal size showed no significant differences among sexes or populations in SVL and LI while HL and TH were the only sexually discriminant variables (Table 6). The length of the two limbs, HW (with the only exception of the comparison between western and eastern females) and TL (with the only exception of the comparison between western females and eastern males) indicated population and sexual differences. The Discriminant analysis showed sexual separation based on the first canonic root (Figure 5); males have short and high tails, in comparison with females. Population differences were less marked and exclusively defined by the second canonic root. Males and females from eastern populations have longer limbs than western ones, while males from western populations have wider heads and longer tails than eastern ones.

Our analyses of coloration found striking differences between sectors defined by two traits: dorsal yellow spots and whitish margin of the snout (Figure 6). The first trait was never found in western populations (Chi-square test X²₁ = 106.312, P<0.001) and therefore is exclusive of the eastern populations. The coloration of the margin of snout is a new diagnostic character that is always

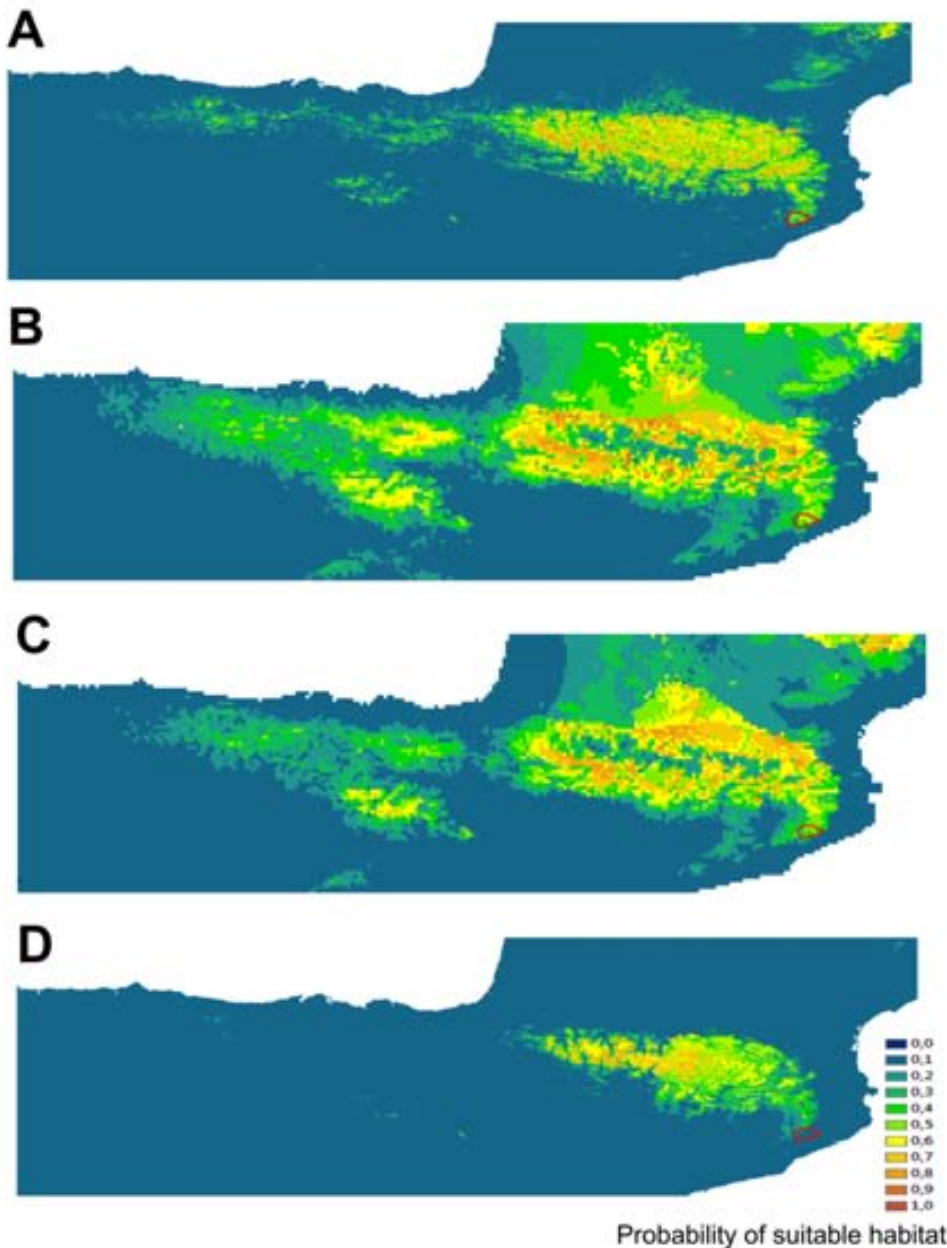


Figure 4. Predicted distribution models of *Calotriton asper*. (A) Present distribution using climate and topographic variables, landcover and lithology. Last Glacial Maximum based on (B) CCSM model and (C) MIROC model, and (D) Last Interglacial distributions using climate variables and lithology. Warmer colors represent areas of high habitat suitability. Red marks and arrows indicate the Montseny Mountain Natural Park. doi:10.1371/journal.pone.0062542.g004

present in males of the western sector, was found only in a female of the western sector, and it has never been found in male or female *C. arnoldi* of the eastern sector (Chi-square test $X^2_1 = 67.652, P < 0.001$).

Discussion

Evolutionary history of the genus *Calotriton*

Our study indicates that there is an unexpectedly high level of lineage sorting between the two *Calotriton* species and within *C. arnoldi*, both with nuclear and mitochondrial genes. Despite being phylogenetically very closely related [20], the network analysis of the nuclear gene fragment RAG-1 (Figure 3) shows that all 66

alleles of *C. asper* and all 150 alleles of *C. arnoldi* analyzed in the present study are unique for each species. Moreover, the analysis of all 315 mtDNA sequences of the *cyt b* gene of *C. asper* and all 105 sequences of *C. arnoldi* resulted in two independent networks with all sequences being unique for each species (Figure 2). These results indicate that, despite their geographic proximity and morphological similarity, there is no evidence of gene flow between these two species, i.e. there is no signal of genetic introgression between them. This is especially relevant taking into account the short geography distance between the closest populations of each species (less than 25 km), the overall habitat similarity and the same courtship behavior based on female caudal

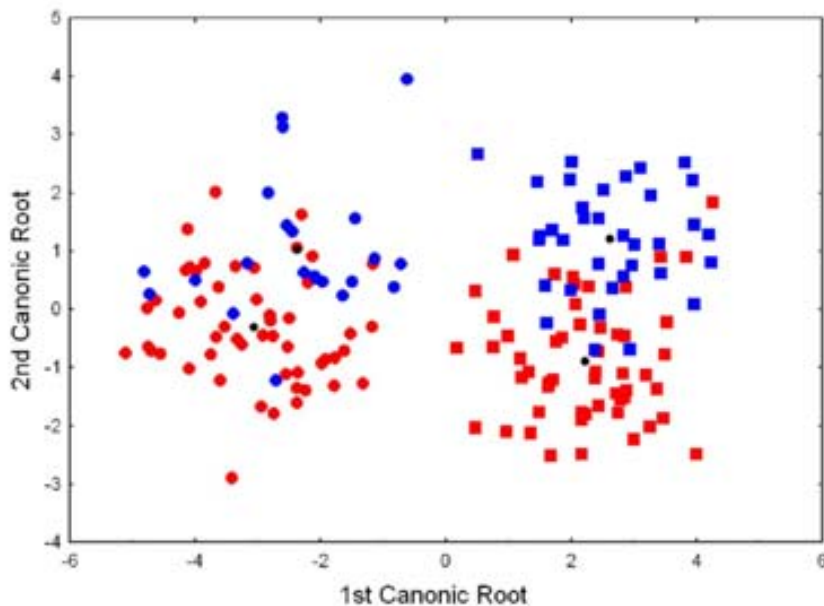


Figure 5. Discriminant canonical analysis scatterplot of males and females of *Calotriton arnoldi* from eastern and western sectors. Red squares and circles indicate eastern males and females, and blue squares and circles show western males and females, respectively. Black points are the mean values for each group.
doi:10.1371/journal.pone.0062542.g005

capture [54]. Strong intraspecific genetic structuring and inter-specific divergence is found in other salamanders including situations of sympatry, allopatry and parapatry in small mountain ranges with limited or complete absence of gene flow (see for example the salamanders of the *Plethodon ouachitae* complex [12], [55], [56]). The differences in the degree of genetic differentiation found between RAG-1 and *cyt b* are not surprising, especially if one takes into account that population history produces less phylogeographic signal with nuclear than with mitochondrial DNA data owing to their established divergence rates [15], [57], [58]. The results of the AMOVA confirm this noteworthy specific differentiation being statistically significant for both markers and, as above, more notable in the mitochondrial than in the nuclear data (with variances among species of over 90% and near 80%, respectively) (Table 4). This differentiation suggests that *Calotriton* species have not been in contact for a long time. These results are

in accordance with the speciation time determined for these species [20], which occurred during the Pleistocene, around 1.1–2 Mya.

As shown in Figure 4, suitable climatic conditions for *C. asper* seem to have been present in the Montseny massif without a prominent barrier, implying a possible contact zone at present and during the LGM. These results contrast with the genetic findings, as no signal of hybridization has been found between the two species. Moreover, *C. asper* has never been reported in the Montseny massif, which is occupied by *C. arnoldi* [20]. Therefore, although they seem to share a common potential niche, these species are completely isolated and their distributions appear to be disjoint. Thus, our results suggest that these sister species originated in allopatry during sharp Pleistocene glaciations, when some populations probably found refuge in the Pyrenean axial chain and others in the Montseny massif [20]. Secondly, the

Table 6. Weight coefficients of eight linear morphometric measurements for the two first canonic from discriminant analysis.

Variable	1st Canonic Root	2nd Canonic Root
SVL	-0.369	0.504
Head length	0.128	-0.395
Head width	0.144	0.541
Forelimb length	0.002	-0.372
Hindlimb length	0.414	-0.167
Limb interval	0.054	0.109
Tail length	-0.465	-0.881
Tail high	0.907	-0.109
Eigenvalues	7.024	0.762
% Cumulative proportion of variability	89.4	99.1

Eigenvalues and percentage of accumulated variance are listed.
doi:10.1371/journal.pone.0062542.t006

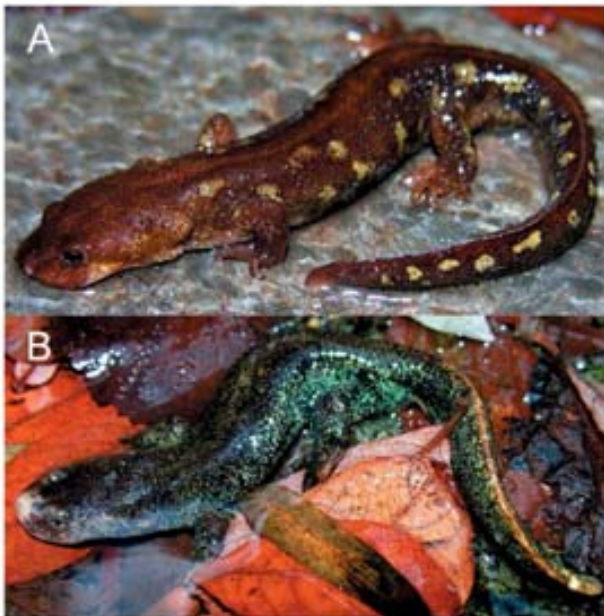


Figure 6. Characteristic patterns of coloration of newts belonging to the two sectors of *Calotriton arnoldi* range. (A) Adult female from the eastern populations showing yellow spots found in 78.8% of the individuals, and (B) adult male from the western populations with the whitish margin of the snout.
doi:10.1371/journal.pone.0062542.g006

species' potential distributions may exhibit spatial overlap with each other due to their present niche similarity [7]. Factors such as predators (e.g. brown trout [59]) or lack of time for secondary contact following vicariance [7] may explain why the *C. asper* population expansions did not reach the Montseny massif. According to these findings, despite that the actual predictive distribution of *C. asper* covers the Montseny massif, we were unable to detect any current or past hybridization events between these two species.

Regarding the SDM results and some fossil records from Cova Colomera (Montsec, Lleida) [60], it is suggested that *C. asper* has survived across the Pyrenean axial mountains, avoiding the highest altitudes during periods of sharp glacial climatic conditions (LGM). Paleoclimatic studies have detected periglacial events during the last glaciations [61], indicating alpine condition in the ridges of the Montseny separating the south (the Tordera Valley where *C. arnoldi* is distributed), from the north face of the massif. It is possible that these harsh environmental conditions could have prevented the expansion of the Pyrenean species to the Montseny during the LGM period. Climatic conditions during LI were in many aspects similar to current ones in the Western Mediterranean basin ([62] and references therein), thus it is not surprising the similarity found between LI and present SDM maps. The fact that *C. asper* can be found at high altitude [20] may explain that during warmer periods (LI and present) the species disappeared from lower altitudes. During the warmer periods, the distribution of this species has been confined to the Pyrenean and pre-Pyrenean mountains [63] (Figure 4). Although the Pyrenean newt is a highly polymorphic species [63], [64], [65], [66], the genetic results (only 8 and 2 haplotypes found for *cyt b* and RAG-1, respectively across more than 20000 km²) suggest that this widespread species presents a low level of genetic variability in the two genes analyzed here compared to its congener, the Montseny brook newt, which presents an extremely small

distribution range (20 Km²). Morphological differences may appear under local selection pressure in response to population specific ecological conditions [66]. These results indicate that not enough time has passed yet to find these phenotypic differences fixed into the genotype of the morphologically different populations of *C. asper*. The low genetic variability of *C. asper* may be explained by the much broader climatic suitability shown during the LGM that could allow the connection of populations and subsequent homogenization as a consequence of gene flow [46] and the subsequent recent re-colonization of the highest altitudes not long ago after the last glacial maximum [20], [67]. A similar pattern of low level of genetic variability is found in *Rana pyrenaica* [67], a species that shares geographical distribution and potential niche (mountain streams) with *C. asper*. Even though, owing to the discrepancies of high levels of variability found with AFLPs markers [39], further studies using faster markers like microsatellites are required to better understand its population structure.

Population structure within *Calotriton arnoldi*

Despite having been described in 2005 and its relevance from a conservation and evolutionary point of view, this is the first attempt to assess the level of genetic and morphological differentiation of *C. arnoldi*.

Here, the nucleotide and haplotype diversities have been analyzed to infer the genetic structure of the Montseny brook newt and the level of gene flow among populations on each side of the Tordera river valley. Our data show that despite having a distribution range 1000 times smaller than *C. asper*, the Montseny brook newt presents a similar level of genetic variability in the mtDNA and a higher level of genetic variability in the nDNA (Figures 2 and 3; Table 3). Whereas the mitochondrial data shown above for *C. asper* and Milá *et al.* [39] accounted for eight and five different haplotypes, respectively covering a distribution area of over 20000 km², the Montseny brook newt presents four different haplotypes but in less than 20 km². One of the possible explanations of these genetic differences between these two sisters species is that *Calotriton asper* has a higher dispersion capacity than *C. arnoldi*. The juveniles of the Pyrenean brook newt present a terrestrial phase that starts after metamorphosis and can last up to two years before they return definitively to the adult aquatic lifestyle. During this terrestrial period, juveniles change morphology and can disperse away from the stream in which they were born, contributing to the gene flow among populations [68]. Contrary to *C. asper*, it has been shown that the Montseny brook newt is completely dependent on water during its whole life, as none of the different life stages (from larvae to adult) have been found in land [20], [69]. Other adaptations to an exclusive aquatic lifestyle include extremely reduced lungs to reduce buoyancy and very thin and smooth skin (transparent underneath) to facilitate cutaneous respiration [20], [69]. This species is restricted to cold and well-oxygenated mountain streams. Therefore, it is unable to exchange individuals through a terrestrial environment or aquatic environments of unsuitable habitat (with waters above 15°C), which favors population isolation. The Sardinian brook newt, *Euproctus platycephalus*, a species that inhabits similar environments as *C. arnoldi*, presents a high genetic structure [70]. The authors suggest that effective population sizes may be large enough to allow such a complex diversification in a small distribution area. In our case, *C. arnoldi* not only presents a much smaller distribution range than *E. platycephalus*, but also its effective population size could be much smaller [27].

In general, the phylogeographic analyses of *C. arnoldi* are concordant with the geographical structure within its distribution range. Our data show a strong genetic differentiation at both the

mitochondrial and nuclear levels between eastern (A1–A3) and western (B1–B4) populations of *C. arnoldi* (Figures 1, 2 and 3; Table 5). The haplotype networks suggest a high degree of isolation between western and eastern populations, as all 63 cyt *b* and 84 RAG-1 sequences of the western populations and all 42 cyt *b* and 66 RAG-1 sequences of the eastern populations are unique for each geographical area (Figures 1, 2 and 3; Table 1). This striking level of isolation across such a small geographic distance is particularly clear and well supported by the results of the AMOVA and SAMOVA (Table 5). Despite the distance between the two population sectors is just around 6 km in a straight line, at present there is no possible connection between the western and eastern populations across suitable habitat. Even though they may be connected following the watercourse of the hydrographical basin, a distance of over 60 km should be covered. Moreover, the watercourse does not provide an adequate environment, due in part as a result of the characteristics of the stream but also because it descends below the 600 m, where water becomes too warm for the long-term survival of *C. arnoldi* [25].

In accordance with the results of the molecular analyses (see above), population distribution is a significant factor of morphological differentiation in *C. arnoldi*. MANOVA, discrimination analysis based on morphometric data, and patterns of coloration indicates a clear differentiation between the western and eastern populations, reinforcing their mutually isolation.

Implications for the conservation of *C. arnoldi*

One of the major objectives of any conservation plan is the maintenance of genetic variability [71]. The results obtained in this study will certainly be helpful for the conservation program of the Montseny brook newt. Habitat disturbance including large amounts of water extracted for commercial purposes, deforestation and the existence of tracks and roads that disrupt the brook continuity, are all major threats affecting this species [25], [26], [72] similarly to other isolated glacial amphibian relicts [73]. As a result, the Montseny is changing and drying out at a considerable pace and the distribution of *C. arnoldi* is being reduced dramatically

[27]. The low population size of the species together with its reduced and disturbed distribution area requires urgent management guidelines for the long-term survival of this species.

Population genetics is a useful tool for the planning and development of conservation programs [16], [70], [67]. The level of genetic structuring in *C. arnoldi* shown here would justify the conservation of two distinct management units (ESU, Evolutionary Significant Units [28]). To date, one of the management measures for the conservation of this species is the development of a captive breeding program, which started in 2007 by the Catalan Government. Based on biogeography, morphology and preliminary genetic data, the breeding program maintained individuals from both sectors separately into two ESU's. The present results confirm the need for continuing with the maintenance of two breeding stocks. Genetic data has played and will play an important role in the conservation of the Montseny brook newt, as for instance in guiding any introduction or translocation of individuals in order to maintain the genetic variation, and thus, guarantee the long-term viability of the populations [74].

Further genetic studies using microsatellites markers are in course to infer the current gene flow among populations and their possible isolation within sectors. This is of vital importance in order to establish whether further ESU's within sectors should be defined.

Acknowledgments

We are grateful to all members of the CRFS Torreferrussa, and especially to M. Alonso, F. Carbonell, E. Obon and R. Larios. Thanks also to A. Soler, for helping in some analyses and revising the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EV SC. Analyzed the data: EV SC FA. Wrote the paper: EV SC FA. Field sampling: EV SC FA. DNA sequencing and molecular analyses: EV SC. Species distribution modelling: EV. Morphological analyses: FA.

References

- Schmitt T (2007) Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology* 4: 11.
- Lowé J, Walker MJ (1997) *Reconstructing quaternary environments*: Longman London.
- Hewitt G (2011) Quaternary phylogeography: the roots of hybrid zones. *Genetica* 139: 617–638.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247–276.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy A-G, Cosson J-F (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453–464.
- Wake DB (2006) Problems with species: patterns and processes of species formation in salamanders. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 93: 8–23.
- Kozak KH, Wiens J (2006) Does niche conservatism promote speciation? A case study in North American salamanders. *Evolution* 60: 2604–2621.
- Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 359: 183–195.
- Jansson R, Dynesius M (2002) The fate of clades in a world of recurrent climatic change: milankovitch oscillations and evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: 741–777.
- Wiens John J (2004) What Is Speciation and How Should We Study It? *The American Naturalist* 163: 914–923.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge: Harvard University Press.
- Shepard DB, Burbink FT (2009) Phylogeographic and demographic effects of Pleistocene climatic fluctuations in a montane salamander, *Plethodon fourchensis*. *Molecular Ecology* 18: 2243–2262.
- Zhang P, Papenfuss TJ, Wake MH, Qu L, Wake DB (2008) Phylogeny and biogeography of the family Salamandridae (Amphibia: Caudata) inferred from complete mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 586–597.
- Zeisler I, Beebe TJC (2008) Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity* 101: 109–119.
- Bisconti R, Canestrelli D, Colangelo P, Nascetti G (2011) Multiple lines of evidence for demographic and range expansion of a temperate species (*Hyla sarda*) during the last glaciation. *Molecular Ecology* 20: 5313–5327.
- Mattocchia M, Marta S, Romano A, Sbordoni V (2011) Phylogeography of an Italian endemic salamander (genus *Salamandrina*): glacial refugia, postglacial expansions, and secondary contact. *Biological Journal of the Linnean Society* 104: 903–992.
- García-Porta J, Litvinchuk SN, Crochet PA, Romano A, Geniez PH, et al. (2012) Molecular phylogenetics and historical biogeography of the west-palaearctic common toads (*Bufo bufo* species complex). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63: 113–130.
- Steinfartz S, Veith M, Tautz D (2000) Mitochondrial sequence analysis of *Salamandra* taxa suggests old splits of major lineages and postglacial recolonizations of Central Europe from distinct source populations of *Salamandra salamandra*. *Molecular Ecology* 9: 397–410.
- Riberon A, Miaud C, Grossenbacher K, Taberlet P (2001) Phylogeography of the Alpine salamander, *Salamandra atra* (Salamandridae) and the influence of the Pleistocene climatic oscillations on population divergence. *Molecular Ecology* 10: 2555–2560.
- 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.
- Sexton JP, McIntyre PJ, Angert AL, Rice KJ (2009) Evolution and Ecology of Species Range Limits. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40: 415–436.
- Bosch J, Tejedo M, Lecis R, Miaud C, Lizana M, et al. (2009) *Calotriton asper*. IUCN 2012: IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1.



23. Amat F (2004) Distribució del trítol pirinenc (*Euproctus asper*) a la conca de la Tordera del Parc Natural del Montseny. Fase 2004. Barcelona: Servei de Parcs Naturals de la Diputació de Barcelona. 90-93.
24. Amat F, Carranza S (2005) Estudi demogràfic del trítol del Montseny (*Calotriton arnoldi*) al Parc Natural i Reserva de la Biosfera del Montseny. Barcelona: Servei de Parcs Naturals de la Diputació de Barcelona. 85-86.
25. Amat F, Carranza S (2007a) Projecte de conservació del trítol del Montseny (*Calotriton arnoldi*) en l'àmbit del Parc Natural del Montseny. Barcelona: Servei de Parcs Naturals de la Diputació de Barcelona i Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya. 1-127.
26. Amat F, Carranza S (2007b) Conservació del trítol del Montseny (*Calotriton arnoldi*) en l'àmbit del Parc Natural del Montseny. Barcelona: Forestal Catalana i Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya. 1-67.
27. Carranza S, Martínez-Solano I (2009) *Calotriton arnoldi*. IUCN 2012: IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1.
28. Ryder OA (1986) Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology & Evolution* 1: 9-10.
29. Carranza S, Arnold EN, Mateo JA, López-Jurado LF (2000) Long-distance colonization and radiation in gekkonid lizards, *Tarentola* (Reptilia: Gekkonidae), revealed by mitochondrial DNA sequences. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 267: 637-649.
30. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
31. Perera A, James Harris D (2010) Genetic variability within the Oudri's fan-footed gecko *Phyllotulus oudrii* in North Africa assessed using mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 634-639.
32. Posada D, Crandall KA (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in ecology & evolution* (Personal edition) 16: 37-45.
33. Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619-633.
34. Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1659.
35. Wright S (1965) The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating. *Evolution* 19: 395-420.
36. Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
37. Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11: 2571-2581.
38. Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
39. Mlá B, Carranza S, Guillaume O, Clabert 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: 108-120.
40. Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965-1978.
41. Otto-Bliesner BL, Marshall SJ, Overpeck JT, Miller GH, Hu A, et al. (2006) Simulating Arctic Climate Warmth and Icefield Retreat in the Last Interglaciation. *Science* 311: 1751-1753.
42. SPSS Inc (2009) SPSS for Windows, Release 17.0. Chicago: SPSS Inc.
43. Van Liedekerke M, Jones A, Panagos P (2006) European Soil Database (ESDB) v2.0. Raster Library - 1 km x 1km. In: Network ECatSB, editor. Ispra, Italy.
44. Abellán P, Arribas P, Svenning J-G (2012) Geological habitat template overrides late Quaternary climate change as a determinant of range dynamics and phylogeography in some habitat-specialist water beetles. *Journal of Biogeography* 39: 970-983.
45. Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231-259.
46. de Pous P, Mora E, Metallinou M, Escoriza D, Comas M, et al. (2011) Elusive but widespread? The potential distribution and genetic variation of *Hyalosaurus laetevirens* (Günther, 1873) in the Maghreb. *Amphibia-Reptilia* 32: 385-397.
47. Wilson JS, Pitts JP (2012) Identifying Pleistocene refugia in North American cold deserts using phylogeographic analyses and ecological niche modelling. *Diversity and Distributions* 18: 1139-1152.
48. Phillips SJ, Dudík M (2008) Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography* 31: 161-175.
49. Araújo MB, New M (2007) Ensemble forecasting of species distributions. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 42-47.
50. Elith J (2002) Quantitative methods for modelling species habitat: comparative performance and an application to Australian plants. In: Ferson S, Burgman M, editors. *Quantitative Methods for Conservation Biology*. New York: Springer. 39-58.
51. Beukema W, De Pous P, Donaire D, Escoriza D, Bogaerts S, et al. (2010) Biogeography and contemporary climatic differentiation among Moroccan *Salamandra atra*. *Biological Journal of the Linnean Society* 101: 626-641.
52. Raes N, ter Steege H (2007) A null-model for significance testing of presence-only species distribution models. *Ecography* 30: 727-736.
53. Warren DL, Gior RE, Turelli M (2010) ENMTools: a toolbox for comparative studies of environmental niche models. *Ecography* 33: 607-611.
54. Thiesmeier B, Hornberg C (1990) Zur Fortpflanzung sowie zum Paarungsverhalten der Gebirgsmolche, Gattung *Euproctus* (Gené), im Terrarium, unter besonderer Berücksichtigung von *Euproctus asper* (Dugès, 1852). *Salamandra* 26: 63-82.
55. Shepard DB, Burbink FT (2008) Lineage diversification and historical demography of a sky island salamander, *Plethodon oachitana*, from the Interior Highlands. *Molecular Ecology* 17: 5315-5335.
56. Shepard DB, Burbink FT (2011) Local-scale environmental variation generates highly divergent lineages associated with stream drainages in a terrestrial salamander, *Plethodon caudensis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59: 399-411.
57. Zhang D-X, Hewitt GM (2003) Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* 12: 563-584.
58. Brito P, Edwards S (2009) Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica* 135: 439-455.
59. Montori A, Llorente GA, Richter-Boix A (2008) Habitat features affecting the small-scale distribution and longitudinal migration patterns of *Calotriton asper* in a Pre-Pyrenean population. *Amphibia-Reptilia* 29: 371-381.
60. López-García J, Blain H-A, Allué E, Bañals S, Bargalló A, et al. (2010) First fossil evidence of an "interglacial refugium" in the Pyrenean region. *Naturwissenschaften* 97: 753-761.
61. Llobet S (1975) Materiales y depósitos periglaciales en el macizo del Montseny. Antecedentes y resultados. *Revista de Geografía* IX: 35-58.
62. Bardaji T, Goy JL, Zazo C, Hillaire-Marcel C, Dabrio CJ, et al. (2009) Sea level and climate changes during OIS 5e in the Western Mediterranean. *Geomorphology* 104: 22-37.
63. Montori A, Herrero P (2004) Caudata. In: Ramos MA, editor. *Amphibian, Lissamphibia*. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. 43-275.
64. Martínez-Rica JP (1980) Algunos datos sobre las poblaciones meridionales del trítol pirenaico *Euproctus asper* Dugès. *Studia Oecologica* 2: 135-154.
65. Serra-Gobo J, Uiblein FT, Martínez-Rica JP (2000) Variation in sexual dimorphism between two populations of the Pyrenean salamander *Euproctus asper* from ecologically different mountain sites. *Belgian Journal of Zoology* 130: 39-45.
66. Montori A, Llorente GA, García-París M (2008b) Allozyme differentiation among populations of the Pyrenean newt *Calotriton asper* (Amphibia: Caudata) does not mirror their morphological diversification. *Zootaxa* 1945: 39-50.
67. Carranza S, Arribas O (2008) Genetic uniformity of *Rana pyrenaica* Serra-Gobo, 1993 across its distribution range: a preliminary study with mtDNA sequences. *Amphibia-Reptilia* 29: 579-582.
68. Montori A (1988) Estudio sobre la biología y ecología del trítol pirenaico *Euproctus asper* (Dugès, 1852) en La Cerdanya: Universitat de Barcelona. 486 p.
69. Montori A, Campeny R (1991) Situación actual de las poblaciones de trítol pirenaico *Euproctus asper* en el macizo del Montseny. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 2: 10-12.
70. Lecis R, Norris K (2004) Population genetic diversity of the endemic Sardinian newt *Euproctus platycephalus*: implications for conservation. *Biological Conservation* 119: 263-270.
71. Avise JC, Hamrick JL (1996) *Conservation genetics, case histories from nature*. New York: Chapman & Hall.
72. Amat F (2005) Estat de conservació del trítol pirinenc (*Euproctus asper*) a la Reserva de la Biosfera i Parc Natural del Montseny. In: Barcelona Dd, editor. VI Trobada d'estudiosos del Montseny. 119-121.
73. Beukema W, Brakels P (2008) Discovery of *Salamandra atra aurorae* (Trevisan, 1982) on the Altopiano di Vezzena, Trentino (Northeastern Italy). *Acta Herpetologica* 3: 77-81.
74. Weitzman ML (1992) On diversity. *The Quarterly Journal of Economics* 107: 363-405.

Valbuena-Ureña E, Steinfartz S, Carranza S (2014) Characterization of microsatellite loci markers for the critically endangered Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*). *Conservation Genetics Resources* 6: 263-265.



Characterization of microsatellite loci markers for the critically endangered Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*)

E. Valbuena-Ureña · S. Steinfartz · S. Carranza

Received: 12 October 2013 / Accepted: 23 October 2013 / Published online: 31 October 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract Fifteen novel tetranucleotide polymorphic microsatellite loci are described and characterized for the critically endangered Montseny brook newt *Calotriton arnoldi*. Until now little is known about genetic variability and dispersal of this species across its very limited distribution area, mainly represented by two main sectors (eastern and western from the Tordera river valley). The level of genetic diversity of the new loci was assessed in 23 individuals from the eastern sector. Number of alleles per locus ranged from 2 to 8 (mean = 4.7) and observed and expected heterozygosity ranged from 0.087 to 1.000 and 0.162 to 0.814, respectively. Almost all loci were found to be in Hardy–Weinberg equilibrium and were not linked. These polymorphic loci can be used in population structure, gene flow, and population differentiation. The value of such information should be high for successful

management and conservation of this potentially highly threatened species.

Keywords *Calotriton arnoldi* · Montseny brook newt · Microsatellites · Conservation genetics · Captive breeding program

The critically endangered Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*) is one of the most endangered amphibians in Europe (Carranza and Martínez-Solano 2009). The current global population size is estimated at less than 1,500 mature individuals, limited to an area of only 20 km² in the Montseny Mountains Natural Park, NE Iberian Peninsula. Their disconnected populations are found in seven closely located brooks, fragmented into two main sectors (eastern and western) on both sides of the Tordera river valley and separated by an unsuitable habitat. To date, one of the management measures for the conservation of this species is the development of a captive breeding program, which started in 2007 by the Catalanian Government. This breeding program maintained individuals from both sectors separately into two evolutionary significant units. Previous genetic studies based on mitochondrial and nuclear sequence analysis suggested the isolation of eastern and western sectors confirming the need for the continuation of the maintenance of the two breeding stocks (Valbuena-Ureña et al. 2013). Furthermore, genetic studies applying high resolution genetic markers, such as microsatellite loci are needed to infer the degree of current gene flow among populations within sectors. The development of microsatellite markers in *C. arnoldi* should greatly enhance our understanding of this species in both an evolutionary and conservation oriented framework and should serve as an important tool for future studies aiming at: (1) assessing

E. Valbuena-Ureña (✉)
Unitat de Zoologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Catalonia, Spain
e-mail: emiliojavier.valbuena@uab.cat

E. Valbuena-Ureña
Centre de Fauna Salvatge de Torreferrusa, Catalan Wildlife Service—Forestal Catalana, Finca de Torreferrusa, Crta B-140, Km 4.5, 08130 Santa Perpètua de la Mogoda, Barcelona, Catalonia, Spain

S. Steinfartz
Department of Evolutionary Biology, Zoological Institute, Technische Universität Braunschweig, Mendelssohnstr. 4, 38106 Braunschweig, Germany

S. Carranza
Institute of Evolutionary Biology (CSIC-Universitat Pompeu Fabra), Passeig Marítim de la Barceloneta 37-49, 08003 Barcelona, Catalonia, Spain



levels of genetic diversity and population structure; (2) checking the genetic connectivity between populations within sectors and the degree of isolation; (3) determining which units are of particular importance for maintaining species genetic diversity; and (4) addressing these results to the conservation strategies by studying the effect of the captive breeding program on the genetic diversity of the species. Here, we describe new primer pairs for the successful amplification of 15 unlinked polymorphic loci for this species.

Genomic DNA was extracted from tail-tips of *C. arnoldi*. Tissue sampling and export were carried out under the authority permits. Microsatellite loci were isolated by Ecogenics GmbH (Switzerland) on the basis of fifteen individual DNA samples from the complete range of the

species. Size selected fragments from genomic DNA were enriched for simple sequence repeat (SSR) content by using magnetic streptavidin beads and biotin-labeled GTAT, GATA, AAC, AAG, TAC and ATC repeat oligonucleotides. The SSR-enriched library was analyzed on a Roche 454 platform using the GS FLX titanium reagents. In total 76804 sequence reads were obtained with an average length of 354 bp. Of these, 1,087 contained a tetra- or tri nucleotide microsatellite motif of at least 6 repeat units or either a dinucleotide motif of at least 10 repeat units. Suitable primers could be designed for 501 potential loci, of which 72 were tested for amplification and polymorphism. Total genomic DNA from the 15 individuals was extracted using DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). Reactions of 10 µl containing 1 × buffer, 200 µM of

Table 1 Characterization and level of variability at 15 microsatellite loci in A1 population ($n = 23$) of *Calotriton arnoldi*. Observed heterozygosity (H_O), expected heterozygosity (H_E), probability of Hardy–Weinberg equilibrium (P_{HW})

Primer ID	Sequences 5'-3'	Repeat motif	Allele range (bp)	No. of alleles	H_O	H_E	P_{HW}
Calam_02248	F: CACAACAACAGGCGAATGAC R: ACTTTAGGTCTTGCGTTGGC	(TATC) ₁₈	185–209	6	0.739	0.642	0.1161
Calam_29994	F: ACCAGCTGCACTCTGCTATC R: GTGCTGCTCATCAAATAGTCAAC	(TATC) ₈	169–173	2	0.087	0.162	0.1318
Calam_37825	F: CATCCTGTAGCAGGCCTTTG R: CTACCAGGGGTTGATCTCAGG	(AGAT) ₁₈	227–255	8	0.870	0.814	0.5412
Calam_14961	F: TTGAGAAATGCAAGGTCGCC R: GTCAGGATGACGCGTTTCG	(TATC) ₁₁	201–221	4	0.609	0.649	0.2238
Calam_15906	F: TCAATCAAGGGCAAGATGATGAC R: ACCAATGACCTATCACAGCC	(CTAT) ₁₄	113–125	4	0.913	0.702	0.1373
Calam_12022	F: CTCTCACGGAAAAGCTCAGG R: GCGTGGCCCAATACATATTCC	(TCTA) ₁₄	224–248	5	0.391	0.430	0.0286
Calam_06881	F: AGCGCATTGCTGCCTGTG R: TACAGAGGGAGTGGGAGGAG	(AGAT) ₁₅	162–174	4	0.391	0.490	0.1454
Calam_50748	F: ATTGGGGTATATTGGGGCTC R: GGCATCCATCACCATTATCTATC	(AGAT) ₁₃	201–213	4	0.565	0.579	1.0000
Calam_36791	F: TTGGAGGTGTCATCAGTGGG R: AACCACAGAAATTCACCAGTC	(TCTA) ₁₈	128–148	5	0.826	0.729	0.8491
	F: GTAGGTTTGGTGCGAAGTGG R: GTACGAGATCTTCTCAGTGGC	(AGAT) ₁₅	224–236	4	0.478	0.410	1.0000
Calam_52354	F: AAAGTGTGGCATCTTGTGGC R: AGACAGCATCTGTGTCCTCTG	(ATCT) ₁₂	220–240	4	0.565	0.467	0.8995
Calam_30143	F: AGGTTAGGTTTAGGTTTACTGCAC R: AGCTTCGTCATTCTTGTACCC	(TCTG) ₇	190–230	5	0.609	0.690	0.5285
Calam_31321	F: GCTTACATCCATCCTTCTCGTC R: AGGCAGATGTTTTGATGGGTG	(ATCT) ₁₉	173–193	6	0.652	0.757	0.3864
Calam_15136	F: GCTAGTTTGCTTTGGCAGTTC R: CTGCCTTTGGCTAGGTTTCG	(TGTA) ₁₅	165–177	4	0.478	0.506	0.4615
Calam_37884	F: GGGGCGCAAGTTACAGTTAG R: ATGTAGTGTGGCAGGTGAGG	(ATAG) ₁₀	248–267	5	1.000	0.710	0.0013*
MI3	TGTAACGACGGCCAGT						

* P value < 0.01

dNTPs, 0.04 μM M13 tailed locus specific forward primer, 0.16 μM locus specific reverse primer, 0.16 μM universal M13 primer 5' -end labeled with FAM (Metabion), 0.5 units of HotStarTaq (Qiagen) were used to amplify each locus via the nested PCR procedure described by Schuelke (2000). The PCR profile was 95 °C for 15 min, 30 cycles of 30 s at 95 °C, 45 s at 56 °C (annealing temperature), 45 s at 72 °C, followed by 8 cycles of 30 s at 95 °C, 45 s at 53 °C and 45 s at 72 °C; and a final elongation phase of 30 min at 72 °C. PCR products were sized on an ABI3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using GENEMAPPER V4 (Applied Biosystems) to assign genotypes. The 15 loci were screened for polymorphism in 23 individuals of *C. arnoldi* from A1 population originating from the eastern sector. Standard population genetics parameters were estimated using GENEPOP V4.1.4 (Rousset 2008) and details of the 15 polymorphic microsatellite loci are shown in Table 1. We detected 2–8 alleles per locus (mean = 4.7) and observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity values ranged from 0.087 to 1.000 and 0.162 to 0.814, respectively. The loci generally conformed to Hardy–Weinberg (HW) equilibrium expectations, although locus Calam 37884 exhibited a heterozygote excess ($P < 0.01$), and no loci showed significant deviation from linkage disequilibrium. There was neither evidence for scoring error due to stuttering or due to large allele dropout and nor evidence for the presence of null alleles according to MICROCHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004).

The new fifteen polymorphic loci described here together with ten loci, which have been previously developed for *C. asper* and successfully cross-amplified in *C. arnoldi* (Drechsler et al. 2013) provide a powerful tool to challenge urgently needed conservation genetics studies in this

critically endangered European amphibian. In turn, these new markers are also likely to be applicable for its closely related sister species, the Pyrenean brook newt *C. asper*.

Acknowledgments We are grateful to all members of the CRFS Torreferrussa, and especially to M. Alonso, F. Carbonell, E. Obon and R. Larios. We also thank the DAAM department of the Generalitat de Catalunya and F. Amat. This research was supported by Miloca and Zoo de Barcelona (PRIC-2011).

References

- Carranza S, Martínez-Solano I (2009) *Calotriton arnoldi*. IUCN red list of threatened species. Version 2012.1 Accessed 04 July 2012
- Drechsler A, Geller D, Freund K, Schmeller DS, Künzel S, Rupp O, Loyau A, Denoël M, Valbuena-Ureña E, Steinfartz S (2013) What remains from a 454 run: estimation of success rates of microsatellite loci development in selected newt species (*Calotriton asper*, *Lissotriton helveticus*, and *Triturus cristatus*) and comparison with Illumina-based approaches. *Ecol Evol* 3(11):3947–3957. doi:10.1002/ece3.764
- Rousset F (2008) Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 8(1):103–106. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat biotechnol* 18(2):233–234
- Valbuena-Ureña E, Amat F, Carranza S (2013) Integrative Phylogeography of *Calotriton* Newts (Amphibia, Salamandridae), with Special Remarks on the Conservation of the Endangered Montseny Brook Newt (*Calotriton arnoldi*). *PLoS ONE* 8(6):e62542. doi:10.1371/journal.pone.0062542
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol EcolSS Notes* 4(3):535–538. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x

Fonts de les fotografies de la portada

Tritó del Montseny: Toni Llobet

Doble hèlix de DNA: Pray L. (2008) Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. Nature Education 1(1):100

Aquesta tesi ha estat desenvolupada amb el suport de:





Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Biociències
Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia
Unitat de Zoologia

Tesi doctoral

Conservation genetics of the critically endangered Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*).

Memòria de tesi doctoral presentada per Emilio Valbuena Ureña per a optar al grau de Doctor en Biologia Animal sota la direcció del Dr. Salvador Carranza, i la tutorització de la Dra. Maite Carrassón López de Letona.

Aquesta tesi s'ha inscrit dins del programa de doctorat de Biologia Animal, de la Universitat Autònoma de Barcelona.

El director
Salvador Carranza
Institut de Biologia Evolutiva (CSIC -
Universitat Pompeu Fabra)



La tutora
Maite Carrassón López de Letona
Universitat Autònoma de Barcelona



El doctorand
Emilio Valbuena Ureña

Bellaterra, Juliol 2015

A l'Anna, a la Berta i al Bernat

We do not inherit the Earth from our forefathers; we borrow it from our children

Kashmiri proverb

AGRAÏMENTS

Arribat a aquest punt no m'ho puc creure...començo a escriure els agraïments! ...i això vol dir que ha començat el final d'un intens camí que ha durat 5 anys...uf! que ràpid passa el temps! Vaig començar portant un hortet ecològic, i ara casat, dues criatures... Acaba una etapa i comença una nova. Reflexionant, durant aquest camí n'hi ha hagut de tots els colors, i més si es comparteix l'activitat investigadora amb d'altres activitats professionals. Així, m'adono que són moltes les persones a les que els he d'agrair per ajudar-me a començar, elaborar i finalitzar aquesta tesi... i espero no deixar-me a ningú!

En primer lloc agrair la confiança i el saber fer del meu director de tesis en Salvador Carranza. Sense tu aquesta tesi no hauria estat possible! Encara recordo com em vas encoratjar des del principi quan et vaig proposar embarcar-me en fer una tesi, mentre fèiem un cafè en un bar de Barcelona. I és que no tan sols t'he d'agrair el teu suport, l'orientació, la perspectiva i els consells tan valuosos en l'àmbit científic, que ha fet possible realitzar aquest projecte, sinó també el teu saber fer com a persona, el teu tracte i la teva capacitat de transmetre optimisme i fer equip... gràcies Salvi! Per confiar en mi, i per donar-me l'oportunitat de continuar amb la recerca més enllà de la tesi.

A la meva tutora Maite Carrassón pel seu suport acadèmic i els teus consells, així com a tots els companys de la Unitat de Zoologia. Per poder utilitzar el molecular-lab en els meus inicis de la tesi (gràcies Fernando!), a l'Ana, i a tu Francesc, per tantes xerrades intentant entendre el món animal. Als companys que han passat per la unitat i amb els que hem compartit part del viatge de la tesi... Laies (aranya i laieta), Cecília, Núria,... Al Manolo i la Pilar... sou genials! ho solucioneu tot!

A tots el companys del Centre de Recuperació de Torreferrussa... a l'Ana, l'Albert, la Berta, la Conxi, el Gregori, el Joan, la Laura, i el Rafa, ... i en especial al Rubén, a la Mònica, al Francesc, a l'Elena i a la Raquel... per compartir el treball del dia a dia amb aquesta curiosa i apassionant espècie i amb d'altres bestioles..., per l'ajuda en el mostreig de camp... el dia de demà podrem muntar un ciber-tritó amb tots els bocinets...eh Mònica i Elena!

Al Parc Natural del Montseny (Diputació de Barcelona), en especial al Dani Guinart, així com a la Direcció General del Medi Natural i Biodiversitat (Generalitat de Catalunya): Jordi, Manel, Siscu, gràcies pel vostre suport i les autoritzacions! A tota la gent que col·labora i treballa per la conservació del tritó del Montseny: Yago Alonso, Albert Martínez-Silvestre (CRAC-COMAM), Manel Aresté (Zoo de Barcelona), Jaime Bosch (MNCN-Madrid), Sito Padrós (Servei de Diagnòstic Patològic de Peixos-UAB), als companys del Centre de Fauna del Pont de Suert i tots els voluntaris/estudiants que ajuden al dia en les feines de Torreferrussa.

Al Fèlix per la seva ajuda incondicional en el mostreig i per compartir els seus coneixements sobre aquesta espècie.

Al Toni Llobet, agrair la seva generositat per autoritzar-me a utilitzar el dibuix del gran protagonista.

A Sebastian Steinfartz, thanks for the hard lab work, and thanks for opening my eyes and seeing further from the results. For sharing your point of view always integrating many pieces of this puzzle! We finally told a wonderful story.... Vielen Danken!

Als cresins, en especial a la Sandra amb qui varem començar en aquest viatge, cadascú en el seu món (tot i que ens vam conèixer al mateix, netejant gàbies a TF!), i al Nitú per ajudar-me tant en l'inici a través del "PCR-consulting".

Als meus pares que m'han criat, han patit sempre (i m'han deixat fer!) el meu interès amb les bestioles, i sempre m'han animat a estudiar el que m'agrada. A la meva germana Mary, al meu cunyat Mario, que m'han donat el seu suport tot i no entendre ben bé si estic estudiant o treballant, i perquè serveix tot el que faig. Als meus nebots Mario i Marc, per la seva il·lusió, curiositat i alegria que hem contagien i em donen ganes i forces. Als meus sogres, Àngel i Montse, així com al meu cunyat Marc, per tantes hores de chec-cangur (i carmanyoles!) que han fet possible treure temps d'on no hi ha...

Als amics, en especial al Carlos i Miguel i al tot el grup dels "notas" per tantes hores compartides, i per aquestes impressionants calçotades que fem de tant en tant. Carlos, et prometo que algun dia anirem a la muntanya només a caminar! Segur que ets el "technical engineering" amb més coneixements de zoologia de la història!!

A tu Anna... per ser com ets i ajudar-me tant! Fa poc vaig veure un monòleg que parlava de com valorar a les persones... era una fórmula molt simple: $V = (C + H) \times A$, on C (el coneixement) i H (l'habilitat) són importants, sobretot a nivell professional; de fet a la fórmula sumen. Però el que realment és important és la A, l'actitud... aquesta multiplica! I és que la teva A val molt! Tu m'has transmès sempre una visió positiva i m'has ajudat a veure que, per tot, hi ha solució. I és que durant la tesis hi ha hagut de tots els colors, però sempre amb la teva actitud de no veure problemes sinó solucions, hem tirat endavant! I per, com tu dius, compartir tots els petits grans moments del dia a dia... continuem el viatge!

I als meus peques, Berta i Bernat, pel temps que us he robat i per tantes alegries que m'esteu donant. No hi ha millor remei pels mals de caps que un “Papa!”, un petó i una abraçada gegant. És com si comencés el dia de nou! Per la vostra curiositat i ganes d'aprendre, per la vostra alegria amb les petites sorpreses de la vida quotidiana que em fan ser molt feliç. Tot i que sé que us dedicareu al que vulgueu (segur que algo de lletres!), espero que sapiguem transmetre-us el respecte per la natura i pels que en ella hi viuen.

I a l'espècie objecte de tot aquest lio, que m'ha donat l'oportunitat d'aprendre molt. I a tots els individus que es van deixar veure durant el treball de camp i van “cedir generosament” un trosset de l'extrem distal de la seva cua per avançar en el seu coneixement i conservació. Gràcies!

*In the end we will conserve only what we love; we will love only what we understand;
and we will understand only what we are taught*

Baba Dioum, 1968

I. Abstract/Resum	1
II. Introducció	9
II.1. Els amfibis i la crisi de la biodiversitat	11
Vulnerabilitat dels amfibis	12
Causes del declivi	13
II.2. El rol de la genètica en els programes de conservació	15
La importància de la genètica en poblacions petites	16
La genètica de conservació en la gestió ex situ	19
Els marcadors moleculars	23
II.3. El gènere <i>Calotriton</i>	28
II.4. L'espècie estudiada, <i>Calotriton arnoldi</i>	31
Identificació de l'espècie	31
Distribució i hàbitat	34
Ecologia i comportament	36
Factors s'amenaça	38
Conservació de l'espècie	40
III. Justificació i objectius	47
IV. Integrative Phylogeography of <i>Calotriton</i> Newts (Amphibia, Salamandridae), with Special Remarks on the Conservation of the Endangered Montseny Brook Newt (<i>Calotriton arnoldi</i>).	53
V. Characterization of microsatellite loci markers for the critically endangered Montseny brook newt (<i>Calotriton arnoldi</i>).	69
VI. Advantage or burden – habitat fragmentation in a critically endangered amphibian species (<i>Calotriton arnoldi</i>) and its implicacions for species conservation.	75
VII. Evaluating the ex situ conservation project of the critically endangered Montseny brook newt (<i>Calotriton arnoldi</i>): are we going in the right direction?	115
VIII. Resum dels resultats i discussió general	147
VIII.1. Resum dels resultats	149
VIII.2. Discussió general	150
VIII.2.1. Implicacions en la conservació	151
Definició de les unitats de conservació/maneig en l'espècie	151
Vulnerabilitat de l'espècie	154
Gestió de les poblacions salvatges i captives	156
VIII.2.2. Futures línies de recerca	157
IX. Conclusions	161
X. Bibliografia	167

*Living wild species are like a library of books still unread.
Our heedless destruction of them is akin to burning the library without ever having
read its books*

Gary Snyder



Many scientists agree that we are achieving the midst of the sixth great mass extinction, what it has been named as “biodiversity crisis”. Anthropogenic pressure is affecting both directly or indirectly natural environments. The amphibians are one of the most severely affected groups, and are the only ones catalogued globally at risk. The climate change, pollution, emerging diseases, habitat loss, introduction of invasive species and harvesting are probably the main factors that have contributed most to the overall decline of this group; in fact, surely the global decline of amphibians is due to the synergy of these factors. In that sense, conservation genetics will be a crucial tool for managing these endangered species. The main concern of this discipline is the identification and protection of the evolutionary potential of endangered species through understanding the importance of genetic diversity in preventing the extinction of species. The loss of genetic diversity and changes in the genetic structure can affect the long-term survival of a species, especially in small and endangered populations. One of the main threats affecting small populations is inbreeding depression due to genetic drift. This could drive the species to the extinction vortex. Molecular markers are a very useful tool in conservation genetics to evaluate and manage the genetic state of these populations. The Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*) is one of the most endangered vertebrates in Europe and it is classified as critically endangered by the International Union for Conservation of Nature (IUCN). This species is endemic to the Montseny Natural Park (NE Iberian Peninsula). Its disconnected populations are found within a restricted altitudinal range in seven geographically close brooks, occupying a total area of 8 km². Moreover, its habitat is fragmented into two main sectors (eastern and western) on both sides of the Tordera river valley and separated by unsuitable terrestrial habitat. The current census population size of this species has been estimated at less than 1500 adult individuals. Recent human activities such as the extraction of large amounts of water for commercial purposes, deforestation and the building of tracks and roads are disturbing the habitat and are affecting the species negatively. The main goal of this thesis is to provide basic knowledge about the genetics of the Montseny brook newt to contribute towards the conservation of this emblematic species. The main aim of this thesis is to identify the different management units in order to apply appropriate conservation measures. To achieve this goal, we have explored the biogeography of the species (Chapter IV), the design of polymorphic markers (Chapter V), the characterization and genetic structure of its populations (Chapter VI) and the ex situ reproductive program (Chapter VII) by analyzing sequence data of two genes, one mitochondrial and one nuclear, together with 24 microsatellite markers. Within this thesis, we confirm the validity of the two species of *Calotriton*. Despite the limited distribution range of the Montseny brook newt compared to its sister species, the Pyrenean brook newt, *C. arnoldi* presents a high genetic structure. The morphological and molecular analyses suggest two geographically distinct population groups, to the east and west of the Tordera river valley, with no gene flow between them. The fifteen polymorphic loci



described in this thesis, together with nine loci previously developed for *C. asper* that successfully cross-amplified in *C. arnoldi*, provided a powerful tool for the conservation genetics studies presented in this Thesis. The fragmentation of the species' natural habitat has resulted in a strong genetic division of population in two sectors, with no detectable migration between them. Although estimates of effective population size suggest critically low values for all populations, no evidence of high levels of inbreeding was found. Thus, the levels of genetic diversity of *C. arnoldi* are comparable to other amphibian species with much larger distribution ranges. This is one of the few species in which habitat fragmentation does not seem to have had a negative effect on an evolutionary time scale. It is suggested that this species could have developed reproductive strategies (eg, mate choice) to deal with their small populations. However, it is warned that fragmentation of natural habitats should be assessed as a distinct factor than habitat loss or degradation. The effect of both factors should be considered independently in planning strategies for the conservation of endangered species. The strong genetic structure observed in this species suggested that both sectors should be considered as two separate management units for conservation, both in situ and ex situ. In terms of ex situ conservation, it is concluded that, currently, the genetic diversity of captive populations and its representativeness are good but not optimal. New genetic material should be incorporated into the captive stock through the introduction of new unrelated individuals or their sperm. It is strongly recommended to maintain the two different breeding lines independently to avoid cross-fertilization between them and consequently possible outbreeding depression effects. In addition, it is recommended to keep an open-program to allow in situ continuous gene flow to captive populations to avoid adaptation to captivity in successive generations. The knowledge provided by this research is relevant to the conservation and management of the Montseny brook newt. The knowledge of the biology of this species is scarce due to the difficulty of observing and studying it in the wild. This information, however, is needed to assess the risk of extinction and thus to determine proper management actions. In this case, the genetic information has been of paramount importance to increase this knowledge, helping to fill some important gaps in the knowledge of the population dynamics of *C. arnoldi* and to provide some strategies and recommendations to be considered in its conservation plan.

Molts científics estan d'acord que estem enmig de la sisena gran extinció en massa, el que s'ha anomenat com la crisi de la biodiversitat. La forta pressió antropogènica està afectant ja sigui directament o indirectament els ambients naturals. Els amfibis són un dels grups més afectats i són els únics catalogats globalment en perill. El canvi climàtic, la contaminació, les malalties emergents, la pèrdua d'hàbitat, la introducció d'espècies invasores i la seva explotació són probablement els principals factors que més han contribuït a la disminució general d'aquest grup; de fet, el declivi global dels amfibis és segurament causa de la sinergia d'aquests factors. En aquest sentit, la genètica de conservació és una eina fonamental a considerar en la gestió d'aquestes espècies en perill d'extinció. La principal preocupació de la disciplina és la identificació del potencial evolutiu de les espècies en perill, a través de la comprensió de la importància de la diversitat genètica en la prevenció de l'extinció d'espècies. La pèrdua de la diversitat genètica i els canvis en l'estructura genètica poden afectar la supervivència a llarg termini d'una espècie, sobretot en petites poblacions en perill d'extinció. Una de les principals amenaces que afecten les petites poblacions és la depressió endogàmica causada per la deriva genètica. Això podria conduir a l'espècie al vòrtex d'extinció. Els marcadors moleculars han estat considerats una eina útil en la genètica de la conservació per tal d'avaluar i gestionar l'estat genètic d'aquestes poblacions. El tritó del Montseny (*Calotriton arnoldi*) és un dels vertebrats més amenaçats d'Europa i està classificat com en perill crític per la Unió Internacional per a la Conservació de la Naturalesa (IUCN). Aquesta espècie és endèmica del Parc Natural del Montseny (NE de la Península Ibèrica). Les seves poblacions desconnectades es troben dins d'un rang altitudinal restringit en set torrents propers geogràficament, ocupant una superfície total de 8 km². A més, el seu hàbitat està fragmentat en dos sectors principals (oriental i occidental) a banda i banda de la vall del riu Tordera, i separats per hàbitat terrestre inadequat. El cens actual poblacional d'aquesta espècie ha estat estimat en menys de 1.500 individus adults. L'activitat humana recent, com l'extracció de grans quantitats d'aigua per a fins comercials, la desforestació i la construcció de pistes i camins estan pertorbant l'hàbitat i estan afectant negativament a aquesta espècie. L'objectiu principal d'aquesta tesi és proporcionar coneixements bàsics sobre la genètica del tritó del Montseny perquè siguin útils per a la conservació de l'espècie. Aquesta tesi pretén ser d'utilitat en la identificació de les diferents unitats de gestió i l'aplicació de mesures de conservació. Per aconseguir aquest objectiu principal, s'ha explorat la biogeografia de l'espècie (Capítol IV), s'ha dissenyat nous marcadors microsatèl·lits polimòrfics (Capítol V), s'ha caracteritzat i estudiat l'estructura genètica de les seves poblacions (Capítol VI) i s'ha avaluat el programa ex situ (Capítol VII), mitjançant l'anàlisi de dades de seqüència de dos gens, un mitocondrial i un nuclear, juntament amb 24 marcadors microsatèl·lits. Dins d'aquesta tesi, confirmem la validesa de les dues espècies de *Calotriton*. Malgrat que el rang de distribució del tritó del Montseny és limitat, en comparació amb la seva espècie germana el tritó pirinenc *C. asper*, *C. arnoldi* presenta un alt grau d'estructuració



genètica. Les anàlisis morfològiques i moleculars suggereixen dos grups poblacionals geogràficament diferents, sense flux genètic entre ells, l'oriental i l'occidental. Els quinze *loci* polimòrfics descrits en aquesta tesi, juntament amb els nou *loci* que s'han desenvolupat prèviament per a *C. asper* que han amplificat amb èxit a *C. arnoldi*, han proporcionat una poderosa eina per als estudis de genètica de la conservació. La fragmentació de l'hàbitat natural d'aquesta espècie s'ha traduït en una forta divisió de genètica de les poblacions en els dos sectors, sense migració detectable entre ells. Tot i que les estimacions de la mida efectiva de la població suggereixen valors críticament baixos per a totes les poblacions, no presenta evidència d'alts nivells d'endogàmia. Per tant, els nivells de diversitat genètica de *C. arnoldi* són comparables a altres espècies d'amfibis amb rangs de distribució molt més gran. Aquesta és una de les poques espècies en què la fragmentació de l'hàbitat no mostra efectes negatius en una escala de temps evolutiu. Aquesta espècie pot evolucionar a través d'estratègies de reproducció (per exemple, l'elecció de parella o *mate choice*) per fer front a les seves poblacions petites. No obstant això, s'adverteix que la fragmentació dels hàbitats naturals s'ha d'avaluar com un factor diferent a la pèrdua o degradació de l'hàbitat. L'efecte de tots dos factors han de ser considerats de manera independent en les estratègies de planificació per a la conservació d'espècies en perill d'extinció. La forta estructura genètica observada en aquesta espècie suggereix que tots dos sectors han de ser considerats com dues unitats de gestió independents per a la conservació, tant in situ com ex situ. En termes de conservació ex situ, es conclou que, en l'actualitat, la diversitat genètica de les poblacions captives i la seva representativitat són bones, però no òptimes. Es suggereix que s'hauria d'incorporar nou material genètic en les poblacions captives, a través de la introducció de nous individus no relacionats o del seu esperma. Es recomana mantenir les dues línies de cria de forma independent i evitar el creuament entre elles per tal d'evitar possibles efectes de depressió per exogàmia. A més, es recomana mantenir un programa de cria obert per permetre el flux de gens de les poblacions in situ cap a les poblacions captives per tal d'evitar l'adaptació a la captivitat a les generacions successives. El coneixement proporcionat en aquesta tesi és rellevant per a la conservació i gestió de tritó del Montseny. El coneixement de la biologia d'aquesta espècie és escassa a causa de la dificultat de l'observació i l'estudi de l'espècie en estat salvatge. Aquesta informació, però, és necessària per avaluar el risc d'extinció i així determinar-ne una gestió adequada. En aquest cas, les dades genètiques han estat molt útils per augmentar aquest coneixement, ajudant a omplir algunes llacunes importants en la dinàmica poblacional de l'espècie i proporcionant algunes estratègies i recomanacions que s'han que tenir en compte en el pla de conservació.

Nature is not a place to visit. It is home

Gary Snyder



II. INTRODUCCIÓ

1. ELS AMFIBIS I LA CRISI DE LA BIODIVERSITAT

Els amfibis moderns o lissamfibis són una subclasse de vertebrats que habiten tots els continents excepte l'Antàrtica, i actualment estan representats per tres ordres: anurs, urodels i gimnofions. L'interès en aquest grup ha augmentat en les últimes dècades; gràcies a la integració de diferents tècniques genètiques, morfològiques i biològiques, conjuntament amb un augment en els esforços d'exploració al camp, la descripció d'espècies ha augmentat de manera constant des de la dècada de 1940 (Figura 1) (Glaw i Köhler 1998; Köhler *et al.* 2005; Vieites *et al.* 2009). Des de 1985 fins a l'actualitat el nombre total d'espècies reconegudes s'ha incrementat de 4014 (Frost 1985) a més de 7400 espècies (AmphibiaWeb 2015).

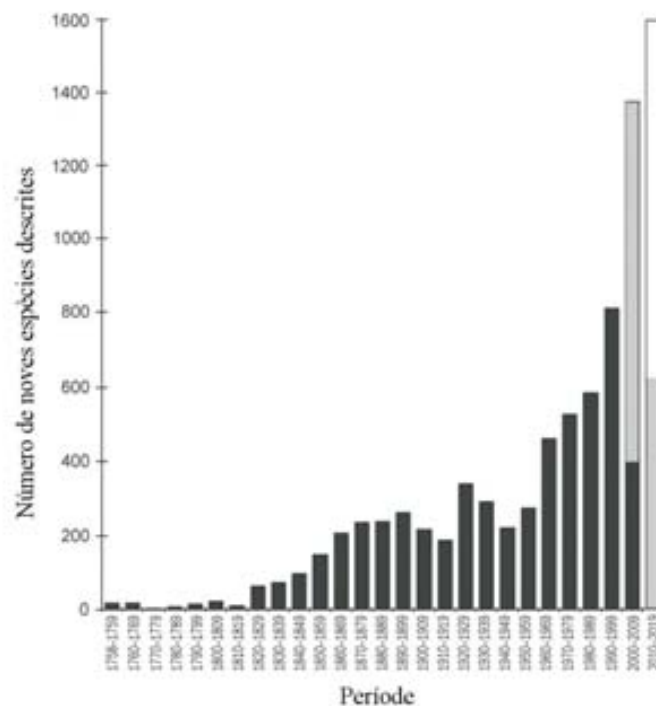


Figura 1. Descripció de noves espècies d'amfibis per dècades a escala mundial (modificat de Köhler *et al.* 2005). Les columnes negres mostren les dades fins al 2003 (Köhler *et al.* 2005), les columnes en gris mostren el període 2004-2014 (AmphibiaWeb 2015), i la columna en blanc correspon a l'expectativa per al període 2015-2019, si la taxa del 2010-2014 continua igual.

Aquest interès en el grup, però, ha contribuït en donar a conèixer el preocupant estat de conservació en què es troba. L'alarma va sorgir als anys 80 quan la comunitat científica va evidenciar una desaparició generalitzada de les poblacions d'amfibis, inclús en zones ben conservades (Angulo *et al.* 2006). En un inici aquesta preocupació va ser presa amb escepticisme per la fluctuació natural que poden patir les poblacions d'amfibis (Pechmann i Wilbur 1994). La primera avaluació exhaustiva de l'estat de conservació d'aquest grup publicada per Stuart *et al.* (2004) va determinar la magnitud de la crisi. Segons aquest treball,



de les 5743 espècies reconegudes fins llavors, gairebé un terç estaven globalment amenaçades, és a dir, catalogades per la IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) com a vulnerable, en perill o en perill crític. Aquesta situació és més crítica que en d'altres grups com les aus o els mamífers, on trobem en situació d'amenaça el 12% i el 23% de les espècies respectivament. A més, en els amfibis, el 43.2% de les espècies estan en declivi i gairebé el 30% estan poc estudiades i se'n desconeix la seva situació. Tot i que aquesta avaluació s'ha reafirmat recentment (Hoffmann *et al.* 2010), aquests percentatges s'han de considerar com estimacions aproximades com a conseqüència del ràpid ritme de descripció de noves espècies – espècies per tant no avaluades – i a la gran proporció d'amfibis amb dades insuficients per determinar el seu estat de conservació. Així, els nous descobriments si bé poden contribuir a la riquesa general d'espècies d'amfibis, podrien també fer que augmentés la proporció d'amfibis amenaçats. A més, la predicció del risc d'extinció de les espècies d'amfibis catalogades per la IUCN com a “dades insuficients” mostra que aquestes espècies poden estar més amenaçades que les espècies ja avaluades (Howard i Bickford 2014). Estudis recents han demostrat que la taxa de disminució i extinció dels amfibis no té precedents, sent la taxa d'extinció mitjana de les últimes dècades unes 200 vegades més gran que la dels últims 350 milions d'anys (Roelants *et al.* 2007). Així, és evident doncs la necessitat de conservar aquest grup.

Vulnerabilitat dels amfibis

Alguna de les particularitats més important dels amfibis és la seva dependència a l'aigua i/o un elevat grau d'humitat. Els seus cicles de vida són generalment complexes, fet que contribueix a augmentar la seva sensibilitat envers les alteracions de l'hàbitat. Els cicles de vida poden transcórrer en zones ben diferenciades, ja que la majoria presenten una fase terrestre i una altra d'aquàtica, de manera que els amfibis reflecteixen els efectes combinats de les interaccions entre els ecosistemes a través de totes les etapes de la seva vida (García-González 2012). A més a més, els amfibis tenen una especial sensibilitat fisiològica a les condicions ambientals, ja que presenten una pell molt permeable. És per això que seran dels primers taxons en veure's afectats per les alteracions ambientals (Wake 1991).

Les anàlisis fetes per Sodhi *et al.* (2008) amb el 45% dels amfibis coneguts fins aleshores (2583 espècies) va revelar que les espècies d'amfibis amb una àrea petita de distribució i una estacionalitat pronunciada de temperatura i precipitacions són més propenses d'estar a la llista vermella de la IUCN, conjuntament amb aquelles afectades per la pèrdua de l'hàbitat i l'elevada densitat humana. Aquest mateix estudi conclou doncs que les espècies d'amfibis amb rangs restringits s'han de prioritzar alhora de conservar aquest taxó.

Causas del declivi

Els amfibis es veuen afectats tant per les condicions actuals de canvi climàtic com per les modificacions antropogèniques dels seus hàbitats naturals (Beebee i Griffiths 2005; Stuart *et al.* 2004), factors que durant les últimes dècades han anat en augment. El canvi climàtic, la pol·lució, les malalties emergents, la pèrdua d'hàbitat, la introducció d'espècies invasores i la sobreexplotació, són segurament els principals factors que han contribuït més al declivi global d'aquest grup (Figura 2). Segurament la disminució global dels amfibis es deu a la sinèrgia d'aquests factors (Sodhi *et al.* 2008; Wake 2012).

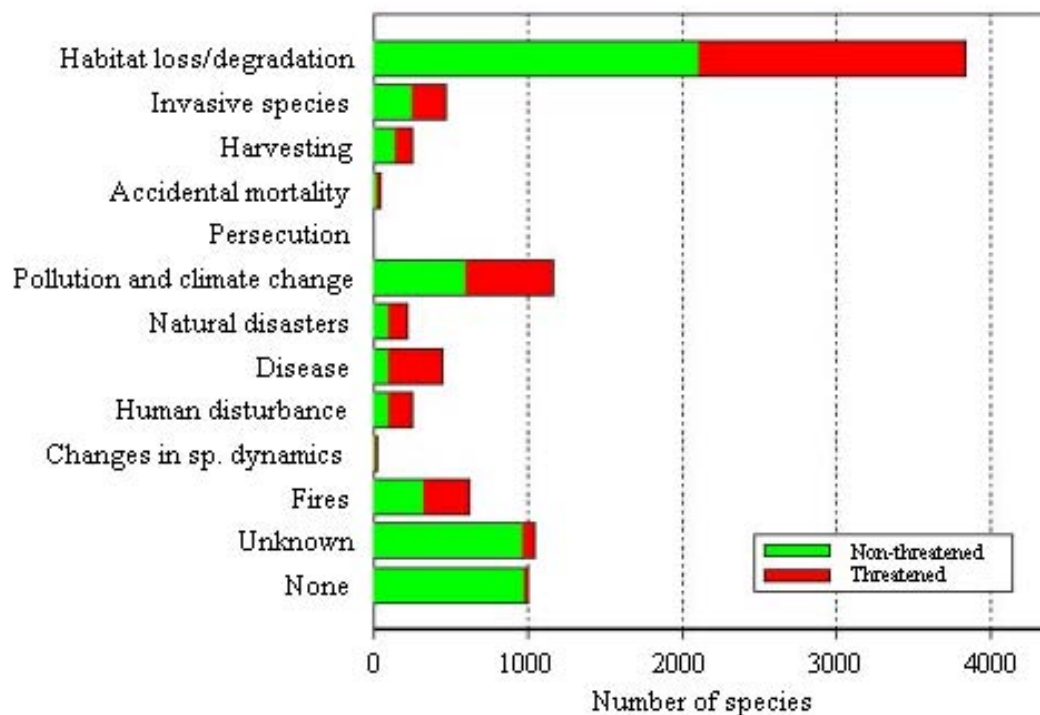


Figura 2. Principals factors d'amenaça dels amfibis a nivell mundial. Font: IUCN (2008).

Els amfibis són extremadament sensibles als petits canvis de temperatura i humitat. Els canvis a nivell global (dessecació, augment de la temperatura, rajos UV, etc.) poden alterar la demografia de les poblacions d'amfibis, i poden disminuir-ne les funcions immunes i augmentar-ne la sensibilitat als contaminants químics. Així mateix, la pol·lució (per exemple per pesticides, metalls pesants, etc) pot tenir un efecte letal o subletal en els individus, i afectar-los directament o indirectament provocant alteracions en el comportament, desenvolupament i disminució de l'èxit reproductor (Young *et al.* 2001).



L'emergència de noves malalties pot afectar puntual però ràpida i greument les poblacions dels amfibis, provocant greus descensos poblacionals i inclús l'extinció d'algunes espècies (IUCN 2008). Estan descrites principalment dues malalties que afecten a nivell mundial als amfibis, la quitridiomicosis i la infecció per ranavirus. La quitridiomicosis és una malaltia causada per un fong, *Batrochytrium dendrobatidis*, que viu exclusivament a l'aigua o en ambients humits (Bosch *et al.* 2001). La infecció sembla ser capaç d'afectar a més de 6000 espècies d'amfibis d'arreu del món, i ha estat anomenada la pitjor malaltia infecciosa que s'hagi registrat mai en vertebrats, en termes de nombre d'espècies afectades i de la propensió a dur-les a l'extinció (Gascon *et al.* 2007). El problema és tan greu, i té repercussions tan serioses, que l'Organització Mundial per a la Sanitat Animal l'ha inclòs com a malaltia de declaració obligatòria per la gran amenaça que representa per a la biodiversitat del planeta. El fong envaeix la pell dels amfibis, n'altera l'equilibri iònic i n'acaba desencadenant una aturada cardíaca. Investigadors d'arreu del món treballen a contrarellotge per intentar desxifrar la manera d'aturar el desencadenant de la malaltia. Més recentment s'ha descrit una espècie nova de fong, *B. salamandrivorans*, aïllat en *Salamandra salamandra* (Martel *et al.* 2013), restringit i altament patògen en urodels (Martel *et al.* 2014). Per altra banda, la infecció per ranavirus és una altra malaltia, també de declaració obligatòria, que pot provocar una mortalitat massiva en les poblacions de moltes espècies d'amfibis (Price *et al.* 2014). En aquest cas, es tracta d'una malaltia vírica, causada pel gènere *Ranavirus*, membres de la família Iridoviridae. Aquesta es transmet pel contacte entre individus, ja sigui directe o bé a través d'aigües infectades. La infecció pot causar greus hemorràgies, tan internes com externes. Donat, no obstant, que alguns individus poden estar infectats sense mostrar signes de la malaltia, el contacte entre individus pot fer que la infecció es propagui amb rapidesa.

A banda de les malalties emergents, la reducció de l'hàbitat es postula com un altre factor destacat en el declivi dels amfibis, i el més important en els amfibis tant de la Península Ibèrica (Stuart *et al.* 2004) com a nivell europeu (Temple i Cox 2009). La capacitat de dispersió i connectivitat de les poblacions juguen un paper fonamental en la viabilitat de les poblacions (Cushman 2006). L'efecte de la fragmentació de l'hàbitat ha sigut causa de molta controvèrsia, i es discuteix en detall al Capítol VI d'aquesta tesi; moltes espècies d'amfibis es veuen perjudicades per la fragmentació de les poblacions, fet que comportaria una disminució de la mida poblacional, fent-les més susceptibles a l'extinció (veure l'apartat de la importància de la genètica en poblacions petites); no obstant, algunes espècies, si bé segurament poques, no sembla que es vegin afectades, com és el cas del tritó del Montseny, *Calotriton arnoldi*. Cal diferenciar, però, la fragmentació de l'hàbitat de la pèrdua i destrucció de l'hàbitat. En aquest últim cas, és àmpliament conegut que té un evident efecte negatiu per a les poblacions d'amfibis, i és un dels principals factors de davallada.

Durant les últimes dues dècades, nombrosos estudis han conclòs que la introducció d'espècies exòtiques, si bé no a una escala mundial, contribueixen a la disminució i inclús a l'extinció local de les poblacions d'amfibis (Kats i Ferrer 2003). Aquestes espècies introduïdes poden, a la llarga, afectar negativament les espècies autòctones per competència, depredació, hibridació i introducció de patògens (Pleguezuelos 2002). Un exemple clar n'és el ferreret, *Alytes muletensis* a les Illes Balears, on la introducció de la serp d'aigua *Natrix maura* va causar la desaparició de la majoria de les poblacions de ferreret, quedant només restringit a aquells indrets de difícil accés per l'espècie introduïda (Piña 2014). Així mateix, les zones on s'ha introduït la gambúsia, o espècies de peixos d'interès per a la pesca continental coincideixen amb zones on s'ha detectat declivi de poblacions d'amfibis, ja que causen un gran efecte negatiu, depredant sobretot larves i adults (Bosch 2003).

Per últim, els amfibis són beneficiosos per l'home i es venen utilitzant durant dècades, tant com aliment, com animals domèstics, o bé per les seves propietats medicinals. En molts casos són espècies protegides, i la seva recollida sovint és il·legal i crea tràfics lucratiu (Jensen i Camp 2003). Recentment, la tinença d'espècies exòtiques d'amfibis ha guanyat popularitat; tanmateix, el principal perill rau en la introducció de malalties emergents o el potencial efecte invasor de la pròpia espècie exòtica. Fisher i Garner (2007) suggereixen que el comerç global d'amfibis pot ser el responsable de l'expansió de *B. dendrobatis* a través de la difusió d'exemplars infectats. A més, la captura i tinença il·legal d'espècies autòctones també pot suposar un expoli de les seves poblacions naturals, contribuint a la seva amenaça.

2. EL ROL DE LA GENÈTICA EN ELS PROGRAMES DE CONSERVACIÓ

Una de les premisses prèvies necessàries per a la bona gestió d'un taxó és, en primer lloc, generar coneixement bàsic sobre el què s'ha de conservar, com per exemple aspectes fonamentals com la correcta descripció i identificació de l'espècie/taxó a conservar, la biologia, el comportament i la demografia; aquesta informació és necessària per poder-ne fer una avaluació de l'estat de conservació i el grau d'amenaça i tendència, i així, finalment, elaborar unes línies de gestió idònies.

La biologia de la conservació és una ciència multidisciplinària que aborda moltes d'aquestes qüestions preliminars, integrant diverses disciplines amb l'objectiu comú de mantenir la biodiversitat. Tot i que la conservació de la biodiversitat depèn principalment de la protecció del medi ambient i del manteniment de l'hàbitat, la genètica de la conservació és una disciplina que juga un paper molt important dins la biologia de la conservació. La preocupació fonamental



d'aquesta disciplina és la identificació i protecció del potencial evolutiu de les espècies amenaçades, a través de la comprensió de la importància de la diversitat genètica en la prevenció de l'extinció d'espècies (Frankham *et al.* 2010). La pèrdua de diversitat genètica i els canvis en l'estructura genètica poden afectar la supervivència a llarg termini d'una espècie. La genètica de poblacions és un punt clau per entendre aquests processos. En la majoria dels casos, la retenció de la variació genètica i potencial evolutiu associat ha de ser un aspecte essencial a tenir en compte en la conservació de les poblacions i espècies (Wan *et al.* 2004). La variació genètica facilita el canvi evolutiu dins les poblacions, el que permet a les espècies evolucionar en resposta als canvis ambientals.

La importància de la genètica en poblacions petites

Existeixen dos tipus principals d'amenaques, deterministes i estocàstiques, que poden afectar a la mida poblacional d'una espècie, i fins i tot, provocar-ne l'extinció (Caughley 1994). Les amenaces deterministes són, per exemple, la destrucció de l'hàbitat, la contaminació, la sobreexplotació, la translocació d'espècies, i el canvi climàtic global. En canvi, les amenaces estocàstiques són aquelles que provoquen canvis aleatoris de tipus genètic, demogràfic o ambiental, com per exemple, les variacions en les taxes de natalitat i mortalitat de la pròpia espècie, que poden donar lloc a fluctuacions demogràfiques, especialment crítiques si la població inicial ja és reduïda. A més a més, les fluctuacions ambientals i catàstrofes naturals poden agreujar aquesta situació conduint a l'espècie a una situació crítica.

Un dels principals efectes de les amenaces estocàstiques en poblacions petites és la deriva genètica. Per tant, la comprensió de la deriva genètica i les seves conseqüències és extremadament important per a la conservació de les espècies (Allendorf i Luikart 2007). La deriva genètica (o la deriva al·lèlica) és el canvi en la freqüència d'una variant del gen (al·lel) en una població a causa del mostreig aleatori dels individus, ja que els al·lells presents en la descendència són una mostra dels al·lells dels progenitors. Així doncs, el canvi en la freqüència de certs al·lells específics d'una població, o al·lel rars, serà determinat per la deriva genètica, fet que en determinarà el seu destí i pot causar-ne la desaparició, reduint, per tant, la variació genètica. En poblacions reduïdes, els canvis en la freqüència dels al·lells causats per la deriva són majors, el que pot arribar a provocar la "fixació" d'un al·lel, de manera que per atzar alguns altres es perdin. Per tant, en poblacions petites, s'espera que disminueixi l'heterozigosi (i augmenti l'homozigosi), a causa de la pèrdua progressiva d'al·lells provocats per deriva genètica. Aquestes poblacions reduïdes perden, llavors, diversitat genètica i són més susceptibles a l'extinció (Allendorf i Luikart 2007).

La mida de la població és extremadament important en l'avaluació de les prioritats de conservació d'una espècie. Els taxons amb poblacions de mida petita són més vulnerables a l'extinció, ja que poden estar subjectes a la ràpida disminució dels seus efectius, per diferents causes. No obstant, alhora d'establir la mida poblacional per qüestions de conservació s'han de considerar que diversos factors, com ara el nombre d'individus que es reproduïxen (i no el total de totes les edats), la proporció de sexes, i les diferències en l'èxit reproductiu entre els individus, poden afectar a la supervivència de l'espècie envers una situació crítica. Així, el nombre real d'individus en una població natural (anomenada mida de cens, N_c) no és suficient per predir la taxa de deriva genètica (Allendorf i Luikart 2007). És per això que, en genètica de la conservació, s'utilitza el concepte de mida efectiva de la població, per fer front a la discrepància entre la mida poblacional real i la mida rellevant per a establir la taxa de la deriva genètica. La mida efectiva de la població (N_e) es defineix com el número d'individus que són capaços de reproduir-se d'una població ideal (N) que donarà lloc a la mateixa quantitat de deriva genètica que en la població real considerada, és a dir donarà lloc a la mateixa quantitat de dispersió de freqüències al·lèliques sota condicions a l'atzar de deriva genètica, o bé els mateixos nivells de consanguinitat que la població considerada. La mida efectiva és un paràmetre clau que està inversament relacionat amb la deriva genètica i la taxa d'endogàmia (Frankham *et al.* 2010).

L'endogàmia és una conseqüència més de les poblacions amb mides petites. L'endogàmia es produeix quan els individus relacionats s'aparellen entre si, i els seus efectes nocius són àmpliament coneguts. Els al·lels recessius només poden ocórrer en la descendència si són presents en els genomes dels progenitors. En conseqüència, com més estretament relacionats siguin els progenitors, més probabilitat d'expressió dels gens deletaris en homozigosi pot tenir la descendència (Figura 3), el que pot augmentar les possibilitats de la descendència de ser afectats per trets recessius o perjudicials. En general, això condueix a una disminució de l'aptitud biològica d'una població, l'anomenada depressió endogàmica (*inbreeding depression*, ID). Així doncs, l'endogàmia provoca un augment de l'homozigosi i descens de l'heterozigosi. Això farà disminuir alhora l'avantatge heterozigòtica, reduint la capacitat d'adaptar-se a possibles canvis en les poblacions naturals.

La ID és sovint el resultat d'un coll d'ampolla poblacional. Un coll d'ampolla és la contracció significativa dels efectius d'una població durant un curt període de temps a causa d'algun esdeveniment ambiental a l'atzar. En un veritable coll d'ampolla poblacional, les probabilitats de supervivència de qualsevol membre de la població són purament aleatòries, i no pas per cap avantatge genètica inherent particular. El coll d'ampolla pot donar lloc a canvis radicals en les freqüències al·lèliques, completament independents de la selecció natural. Després d'un coll d'ampolla, l'espècie experimenta les mateixes conseqüències que en l'efecte



fundador. En aquestes, s'estableix una nova població a partir d'un reduït nombre d'individus, transportant només una petita fracció de la variació genètica de la població original. Això donarà lloc a la pèrdua de variació genètica, així com l'augment de l'endogàmia entre el reduït número de fundadors, factors que contribueixen, de nou, a la depressió endogàmica.

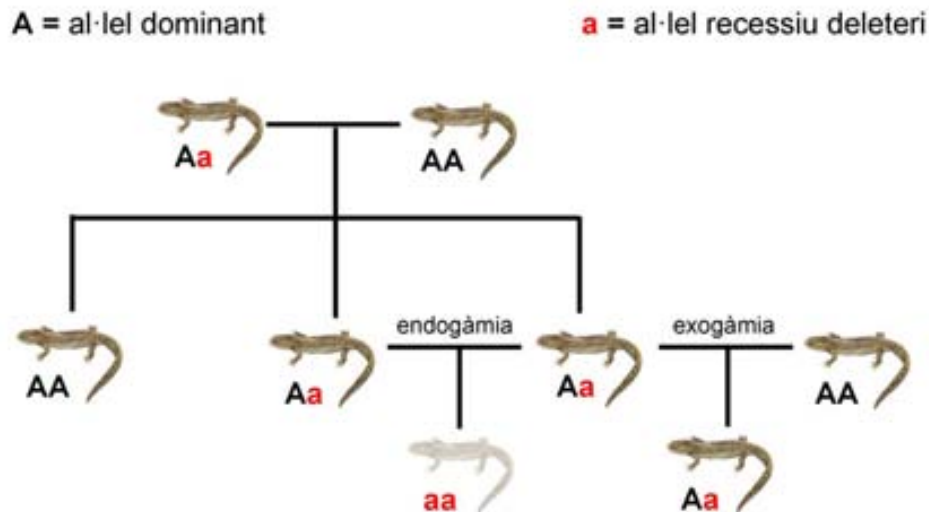


Figura 3. Exemple de depressió per endogàmia. Els al·lells deleteris recessius es fan més patents en creuament endogàmics.

Així doncs, avui dia és àmpliament conegut que la depressió endogàmica pot augmentar la vulnerabilitat de la població mitjançant la interacció amb la variació ambiental aleatòria, per no parlar dels factors deterministes incloent amenaces específiques del taxó com les anteriorment esmenades (ex. degradació de l'hàbitat, malalties emergents i espècies invasores).

Les poblacions reduïdes són les més susceptibles, doncs, a ser afectades per els efectes de la deriva genètica i per la depressió endogàmica. Aquests factors, a la vegada, poden fer disminuir encara més la població efectiva, entrant en un espiral que pot conduir a les espècies a l'extinció, l'anomenat vòrtex de l'extinció (Figura 4).

Donada doncs la vulnerabilitat de les espècies amb poblacions reduïdes, és essencial avaluar-ne el passat i present de la història evolutiva d'aquestes espècies, ja que ens permetran inferir com han respost a determinats successos (p.ex. coll d'ampolla, efecte fundador). El maneig del taxó dependrà en gran part del coneixement del potencial evolutiu de les seves poblacions (Sherwin *et al.* 2000). Així doncs, l'estudi de la variació genètica actual també ens permetrà investigar com la pèrdua d'aquesta pot afectar al futur potencial d'aquest taxó.

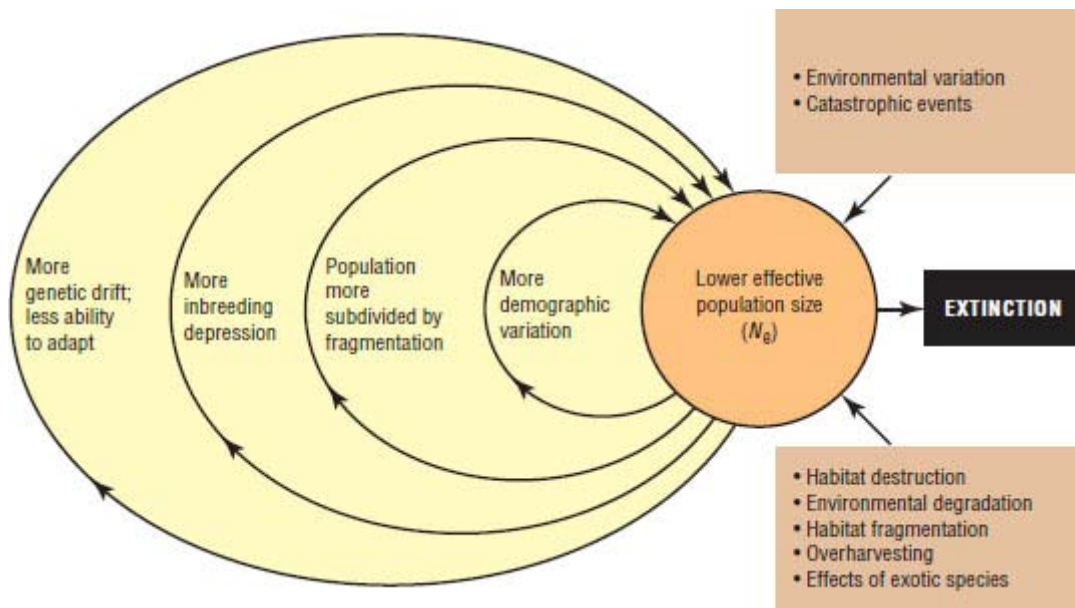


Figura 4. Diagrama del vòrtex de l'extinció. Una vegada l'espècie entra en l'espiral, les seves poblacions disminueixen progressivament, el que a la vegada, provoca efectes negatius sobre aquestes fent més aguda la disminució. Font: Primack i Bacon (2011).

La genètica de conservació en la gestió ex situ

La genètica no tan sols és important per a les tasques de conservació in situ, si no també en els casos en els què és necessària una gestió ex situ de l'espècie. En aquest sentit, tot i que la cria en captivitat ha estat motiu de controvèrsia com a eina per a la conservació (Snyder *et al.* 1996), en molts casos (p.ex. els amfibis), es considera una part essencial dins el pla de la recuperació d'aquestes espècies per tal de mitigar la pèrdua de diversitat (Zippel *et al.* 2011). No obstant, el maneig de les poblacions captives ha d'estar ben dissenyat, ja que pot ser crucial per a la recuperació de les espècies amenaçades (Frankham 1995). Una gestió deficitària de les poblacions captives pot comprometre la viabilitat dels objectius establerts per a la conservació de l'espècie (Figura 5). Les poblacions captives sovint presenten mides petites a causa de les limitacions espacials o financeres de les organitzacions que les administren, i al número de fundadors que es poden extraure de la natura sense posar en perill encara més la població d'origen. Això fa doncs, com s'ha discutit en l'apartat anterior, que les poblacions captives siguin vulnerables a la pèrdua de diversitat genètica per deriva genètica i depressió endogàmica, perdent així potencial evolutiu. En aquest sentit, la contribució de la genètica serà una eina important a tenir en compte en el maneig de les poblacions captives per tal de minimitzar els diversos fenòmens negatius que les poden afectar.

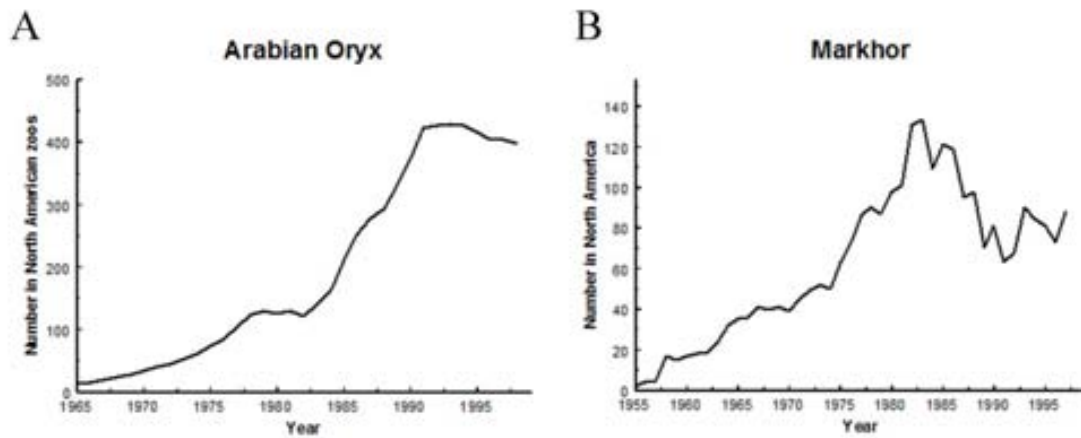


Figura 5. Exemple de la diferència en els resultats obtinguts en dos programes de cria en captivitat de dos bòvids amenaçats. Una bona gestió demogràfica i genètica del programa ex situ de l'orix aràbic (*Oryx leucoryx*)(A); programa ex situ amb escassa gestió del marjor (*Capra falconeri*)(B). Font: Lacy (2009).

Els programes de cria en captivitat no només han de tenir com a objectiu produir un gran nombre d'individus, sinó que també han d'aconseguir mantenir una alta proporció de la diversitat genètica que està present en la població salvatge. Un dels problemes freqüents en el moment de la fundació de l'estoc (pool gènic de la població salvatge) és la pèrdua de diversitat genètica (Leus 2011). Quan un petit nombre d'individus – els futurs fundadors – és extret de la població salvatge original més gran, aquests fundadors contenen només una mostra de la diversitat genètica que està present en la població salvatge. Com més gran és el número de fundadors, més diversitat genètica es representa a la població captiva. Així, un dels aspectes més rellevants al iniciar una nova població ex situ és obtenir un número suficient de fundadors representatius per garantir la conservació de l'espècie. No obstant, en espècies amenaçades, quan les poblacions captives es creen, en la natura, l'espècie en risc s'ha reduït a un petit nombre. En aquests casos, la diversitat genètica inicial alhora d'establir els fundadors pot ser limitada. Per tant, al iniciar un programa de cria en captivitat amb la finalitat de recuperar una espècie amenaçada serà essencial determinar l'origen dels individus així com identificar i seleccionar els individus genèticament més valuosos. Generalment amb 20 fundadors no relacionats s'aconsegueix un equilibri entre la diversitat genètica capturada (estimada al voltant del 97.5% de la població salvatge) i el número d'individus que han de ser extrets de la població amenaçada (Leus i Lacy 2009). Això però, s'ha de considerar com un mínim teòric, ja que només es podrà considerar fundador aquell individu que es reproduïx donant descendència viable. Serà de vital importància establir el número mínim de fundadors representatius per a cada espècie.

Una vegada seleccionats els fundadors, l'objectiu genètic dels programes de cria en captivitat és mantenir poblacions ex situ "auto-sostenibles", és a dir, poblacions capaces de

conservar un alt percentatge de la variabilitat genètica de la població fundadora durant la duració del programa de cria, com per exemple 100 anys, equivalent al temps requerit per a la recuperació de l'hàbitat (Frankham *et al.* 2010). No obstant, no és rar que, durant el desenvolupament dels programes *ex situ*, puguin sorgir problemes per ID. Per minimitzar al màxim aquests problemes, s'ha d'establir els nivells de variació genètica a preservar. Amb un 90% de la diversitat genètica conservada es pot esperar que corresponen a un nivell mitjà d'endogàmia del 10%, si no s'inclouen nous fundadors (Frankham *et al.* 2010). Per tant, la meta del 90% es creu que és un compromís acceptable entre la pèrdua d'una petita quantitat de diversitat genètica (i com a conseqüència d'acceptar un nivell moderat de consanguinitat), i el maneig de mides de població captives petites. En alguns casos però, aquesta meta no és realista per la precària situació de conservació de l'espècie, com per exemple en el cas del linx ibèric. En aquesta espècie l'objectiu de conservar el 90% de la diversitat genètica durant 100 anys no es podia assumir per la impossibilitat d'aconseguir el número de fundadors necessaris, i a la disponibilitat i recursos econòmics per al programa. En aquest cas, es va optar per un objectiu més realista, conservar el 85% de la diversitat durant 30 anys (Lacy i Vargas 2004). Per tal d'assolir la meta genètica, no només n'hi haurà prou en fer una bona elecció dels fundadors (com anteriorment s'ha esmenat), sinó que també es requereix d'una detallada avaluació de les relacions entre fundadors per tal de minimitzar al màxim l'aparellament entre parentius. Tot i que tradicionalment els estocs captius han estat manejats a través dels anàlisis de pedigrí (*studbooks*), la incorporació de marcadors moleculars pot ser particularment valuosa, i més encara quan els pedigrís són incomplets (Gilbert 2011).

A més a més, alhora de crear un nou programa de cria en captivitat no només s'haurà de procurar maximitzar la conservació de la diversitat genètica salvatge, sinó també mantenir el potencial evolutiu de l'espècie. En aquest sentit, s'ha de tenir en compte que en moltes espècies l'existència d'unitats intraespecífiques amb suficient divergència evolutiva fa que s'hagi de requerir una conservació independent entre aquestes. En aquests casos, serà important determinar les unitats de maneig captives i determinar-ne la seva gestió futura. Al gestionar una espècie amenaçada que presenta diferents línies evolutives, no només ens enfrontem a la depressió per endogàmia dins de cada població aïllada, com anteriorment s'ha explicat, sinó que també s'ha de plantejar si l'espècie pot patir depressió per exogàmia (*outbreeding depression*, OD), ja que la barreja de poblacions aïllades divergents pot portar conseqüències negatives (Figura 6). Mentre que els efectes de la ID estan àmpliament estudiats, els efectes de l'OD no ha estat gaire empíricament demostrats, ja que aquests es poden manifestar en una segona generació, inclús després d'haver-se observat heterozigosi a la primera generació (Edmands 2007). Els amfibis, donades les altes diferenciacions genètiques que sovint presenten entre poblacions, podrien ser particularment sensibles a l'OD (Sagvik *et al.* 2005). L'OD es dona



quan la descendència dels encreuaments entre individus de diferents llinatges tenen condicions físiques i/o reproductives més baixes que la progènie dels encreuaments entre individus del mateix llinatge. Aquest fenomen pot ocórrer de diferents maneres; en primer lloc, els genotips intermedis obtinguts del creuament podrien ser desfavorits o perdre adaptabilitat en un determinat ambient on sigui més avantatjós algun dels genotips dels llinatges originals. En segon lloc, podria donar-se la ruptura de compatibilitats bioquímiques o fisiològiques entre gens de les diferents poblacions. Un tercer efecte de l'OD és la pèrdua de l'especiació al·lopàtrica d'una població aïllada particular; en molts casos, l'especiació al·lopàtrica ajuda a mantenir la diversitat genètica de l'espècie ja que contribueix a la particularitat de les poblacions retenint trets exclusius de cada població. Per tant, tenint en compte els efectes d'una possible OD, el creuament entre llinatges divergents només s'hauria de contemplar en aquells casos en els que s'hagi demostrat clarament greus efectes per ID i, sempre que es pugui, havent testat els efectes de la hibridació durant al menys dues generacions (Edmands 2007).

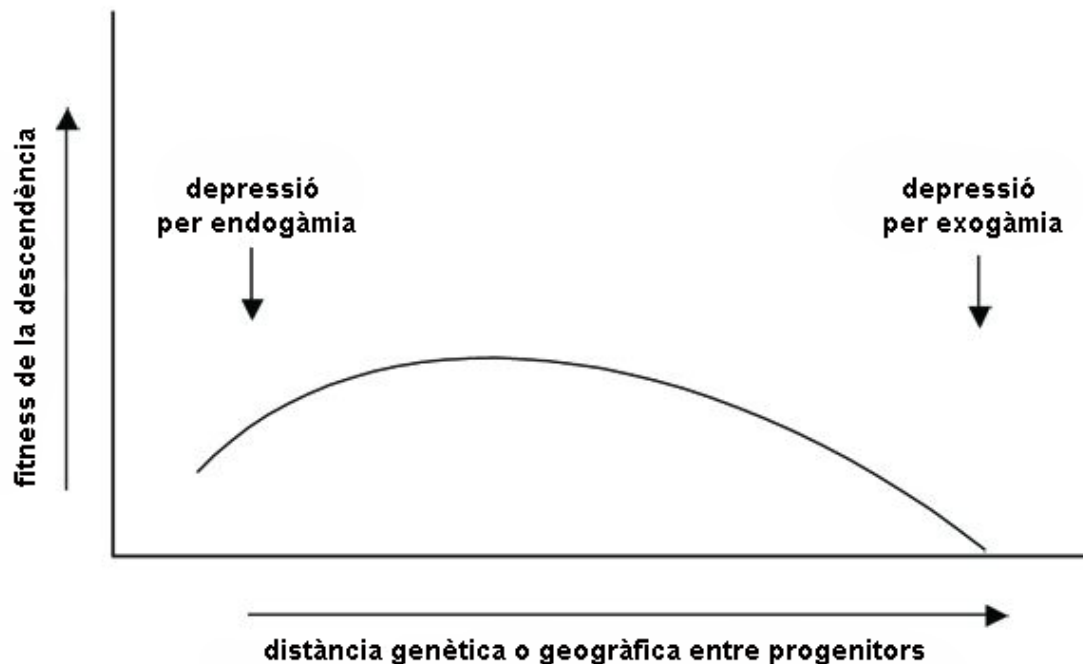


Figura 6. Zones de depressió per endogàmia i per exogàmia en funció de la distància entre progenitors. L'aparellament entre parents molt pròxims pot comportar depressió per endogàmia, mentre que la descendència de parents genèticament molt diferents (o organismes de poblacions divergents) poden patir depressió d'exogàmia.

Així doncs, l'ús de marcadors moleculars s'ha destacat com una eina essencial per tenir un bon coneixement de l'estat de les poblacions, no tan salvatges sinó també captives.

Els marcadors moleculars

Els marcadors moleculars són segments d'ADN que permeten inferir sobre la identitat, demografia, història i evolució d'un individu, població o espècie. Aquests són molt útils en genètica de la conservació per tal d'avaluar i gestionar l'estat genètic de les poblacions. En l'última dècada, l'avanç tècnic dels marcadors moleculars ha permès la utilització de diversos mètodes d'anàlisi genètica de les poblacions; actualment, existeixen una àmplia gamma de marcadors genètics disponibles. No obstant això, la utilització indiscriminada d'aquests marcadors pot donar lloc, potencialment, a interpretacions inadequades. És, per tant, molt important fer una bona selecció de l'eina adequada, i aquesta dependrà de l'objectiu específic d'estudi (Taula 1).

Taula 1. Principals tipus de marcadors utilitzats en genètica de la conservació, incloent les principals aplicacions de cadascun d'ells. Font: ConGRESS (<http://congressgenetics.eu>) i Martínez (2014).

Marcador	Genoma	Cost	Temps de desenvolupament	Polimorfisme (abundància)	Neutral / Codificant	Requereix informació de seqüència	Principals aplicacions
Alozimes	Nuclear	Baix	Baix	Baix	Codificant	No	Diversitat genètica, estructura poblacional, adaptació
AFLPs	Nuclear	Baix	Baix	Alt	Ambdós	No	Demografia, estructura poblacional
RAPDs	Nuclear	Intermig	Intermig	Intermig / Alt	Ambdós	No	Demografia, estructura poblacional
Seqüenciació de gens d'ADN	Nuclear / Mitocondrial	Intermig / Alt	Baix / Intermig	-	Ambdós	Si	Identificació d'espècies, filogènia, filogeografia, demografia, estructura poblacional, adaptació
Microsatèl·lits	Nuclear	Intermig	Intermig	Alt	Neutral (excepte vinculat a locus funcional)	Si	Endogàmia, identificació individual, parentiu, demografia, estructura poblacional
SNPs	Nuclear / Mitocondrial	Intermig / Alt	Intermig / Alt	Alt	Ambdós	Si	Endogàmia, identificació individual, parentiu, demografia, estructura poblacional, adaptació

La seqüenciació de gens mitocondrials i nuclears de còpia única van revolucionar la comprensió del procés evolutiu de les poblacions en els últims 25 anys. L'aparició dels microsatèl·lits i els SNPs (polimorfismes d'un sol nucleòtid) els darrers anys han obert noves possibilitats en l'estudi de genètica de poblacions. Una recerca feta a l'ISI Web of Knowledge dels estudis publicats fins al 2014 en l'àrea de conservació de la biodiversitat, utilitzant com a paraules claus “*microsatellite*” i “*conservation*”, i “*single nucleotide polymorphism*” i “*conservation*”, mostra com la utilització d'aquests marcadors per a estudis en la genètica de la conservació ha augmentat notablement durant la última dècada (Figura 7).

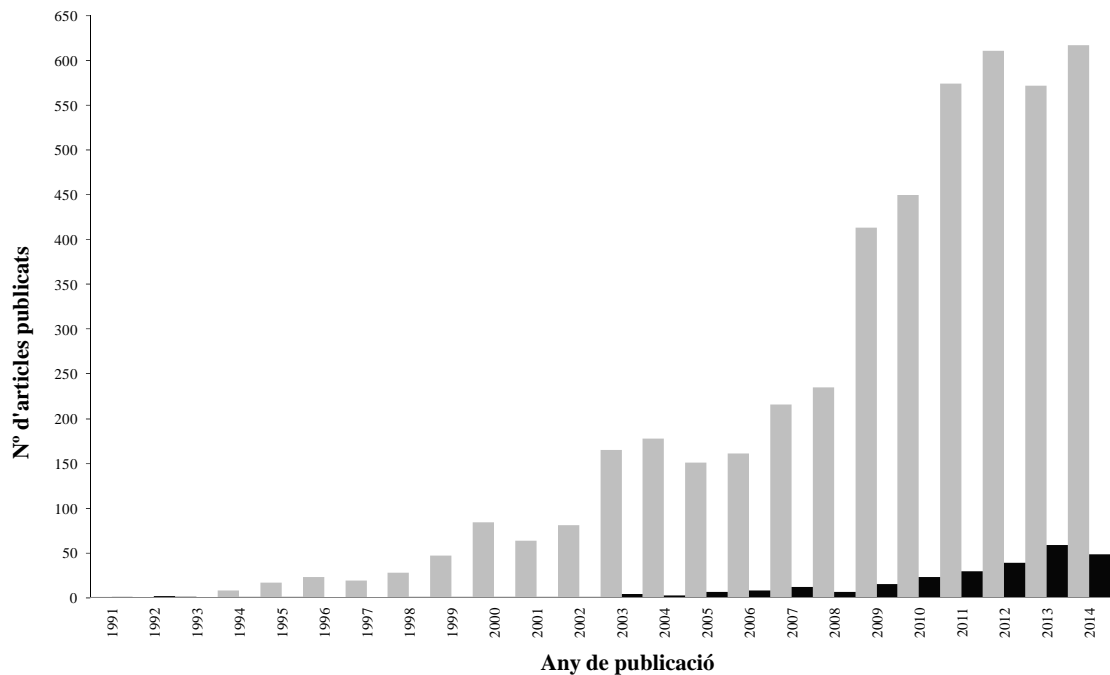


Figura 7. Nombre de publicacions per any des del 1991 fins al 2014 segons l'ISI Web of Knowledge. Els criteris de búsqueda han estat “microsatellite” i “conservation” (barres grises) i “single nucleotide polymorphism” i “conservation” (barres negres), tot filtrant els resultats per l'àrea de recerca de “biodiversity conservation”.

El coneixement de les seqüències d'ADN ha esdevingut indispensable per a la recerca biològica bàsica i per a nombrosos camps aplicats com és el cas de la genètica de la conservació. L'estudi utilitzant la combinació de marcadors d'ADN nuclear de còpia única (ADNn) i d'ADN mitocondrial (ADNmt) ha demostrat ser efectiu per a realitzar estudis filogenètics. L'ADN nuclear és l'ADN diploide contingut dins el nucli de les cèl·lules dels organismes eucariotes, i codifica per la majoria del genoma en aquests organismes. Aquest presenta herència mendeliana, i incorpora doncs informació d'ambdós progenitors. Les regions codificants d'ADNn són molt conservades (evolucionen lentament), i per tant, són bons marcadors per a estudiar les relacions filogenètiques entre taxons. En funció del nivell taxonòmic a resoldre (per exemple, fílum, família, gènere) es seleccionaran regions codificants més o menys conservades; la SSU (*nuclear small subunit*) és més conservada que la LSU (*large subunit*), i serà doncs utilitzada per resoldre filogènies a nivell de fílums, classes o ordres. En canvi, la LSU, més gran i amb una taxa d'evolució més ràpida, serà més utilitzada per nivells categòrics inferiors, com famílies o gèneres. L'ADNmt evoluciona més ràpidament que l'ADNn de còpia única; per exemple, en primats superiors muta 10 vegades més ràpid (Brown et al. 1979). Aquesta ràpida evolució es deu, en part, a la baixa eficiència de reparació de l'ADN polimerassa mitocondrial, i a l'alta concentració de mutàgens resultants dels processos

metabòlics de la mitocondria (Li 1997). Aquests fets fan que l'ADNmt pugui ser molt variable en vertebrats, proporcionant una alta resolució en estudis filogeogràfics. Una de les característiques típiques del genoma mitocondrial és que aquest és d'herència materna, i per tant, no es recombinava; per això, la inferència de les relacions evolutives obtingudes a partir d'aquest s'han interpretat com una filogènia matriarcal. Al tractar-se d'un genoma haploide, les diferents variants gèniques que poden presentar s'anomenen haplotips i no al·lels, a diferència del que passa amb l'ADNn. El fet que sigui haploide, però, farà que en resoldre la història evolutiva de poblacions, només se'n obtingui una visió parcial. Així doncs, per a estudis poblacionals, els marcadors d'ADNmt seran relativament limitats, i serà necessari incorporar dades nuclears de mutació ràpida, com són els microsatèl·lits (Godinho *et al.* 2008).

Els microsatèl·lits són seqüències d'ADN de ~ 100 pb constituïdes per unitats de 2 a 6 pb repetides consecutivament (Chambers i MacAvoy 2000). Els microsatèl·lits també són coneguts com repeticions curtes en tàndem (STR: *Short Tandem Repeats*) o repeticions de seqüència simple (SSRs: *Simple Sequence Repeats*). Aquests, presents en tots els organismes eucariotes, es localitzen en qualsevol lloc del genoma, encara que són menys abundants en els exons que en les regions no codificants. Tot i que se solen considerar marcadors neutres, s'ha demostrat que poden intervenir en diversos processos biològics, incloent la regulació de l'expressió gènica, l'organització de la cromatina, la regulació de la replicació, la recombinació i el cicle cel·lular (Li *et al.* 2002). Els microsatèl·lits són inherentment inestables, amb una taxa de mutació estimada en eucariotes molt superior a la de l'ADN de còpia única (Ellegren 2000); tot i que varia entre espècies, pot arribar a valors de 10^{-2} - 10^{-3} mutacions per *locus* i per generació. Generalment presenten un gran nombre d'al·lels per *locus* que donen lloc a elevats nivells de variabilitat (Fernández-Cebrián 2011). S'han proposat diversos models de mutació per explicar com evolucionen els microsatèl·lits. El model de dues fases (*Two Phase Model*, TPM) (Di Rienzo *et al.* 1994) és actualment el model de mutació més acceptat. Aquest considera que les mutacions dels microsatèl·lits impliquen la pèrdua o guany d'una unitat de repetició (*Stepwise Mutation Model*, SMM), i menys freqüentment de diverses unitats de repetició (*Infinite Alleles Model*, IAM). Així doncs, la mida del nou al·lel dependrà de la mida que tingués aquest abans de mutar. Aquests canvis al·lèlics apareixen com a conseqüència del desplaçament de les cadenes aparellades durant la replicació, o com a resultat de l'intercanvi desigual de fragments d'ADN entre cadenes cromosòmiques per un alineament erroni, o per conversió gènica durant la recombinació.

El desenvolupament de marcadors microsatèl·lits és un procés laboriós que requereix un coneixement previ del genoma de l'organisme a estudiar, per tal de poder identificar les repeticions i poder dissenyar els encebadors específics. Les variants al·lèliques s'amplifiquen mitjançant PCR i es separen en funció de la seva grandària utilitzant un seqüenciador automàtic.



Generalment els microsatèl·lits s'han de desenvolupar *de novo* per a cada espècie a estudiar, ja que freqüentment no poden ser utilitzats els ja dissenyats per a espècies pròximes (*cross-amplification*) degut a l'acumulació de mutacions flanquejants que impedeixen la hibridació dels encebadors. Fins fa relativament poc temps, el desenvolupament de múltiples *loci* era molt costós econòmicament i en temps. Al llarg dels últims 25 anys, s'han produït successives millores del mètode de seqüenciació ja anomenat com seqüenciació de "primera generació". En els últims deu anys, però, l'escenari ha canviat radicalment gràcies a la introducció de les anomenades tècniques de seqüenciació massiva en paral·lel (també coneguda com la seqüenciació de pròxima generació, NGS). Les NGS són capaces de generar desenes de milions de lectures de seqüència (Figura 8), suplint la carència d'informació genòmica en espècies poc estudiades. Aquest procediment es porta a terme en plataformes com ara Roche/454, Illumina o AB SOLiD, i es pot encarregar a serveis externs especialitzats. Aquestes noves tecnologies, doncs, han permès el disseny de múltiples microsatèl·lits de manera menys tediosa i abaratint relativament els costos derivats d'aquest. El genotipat posterior de múltiples *loci* en un elevat nombre de mostres es pot optimitzar amb l'ús de la PCRs *multiplex*, que permet amplificar simultàniament diversos *loci* en una mateixa reacció.

L'abundància dels microsatèl·lits en el genoma, juntament amb el fet que presenten herència mendeliana, expressió codominant i un alt grau de polimorfisme, els converteixen en uns marcadors excel·lents per als estudis de la genètica de poblacions en la conservació d'espècies.

Els SNPs són un tipus de marcadors codominants, que es troben tant en regions codificants com no codificants, i són molt freqüents en el genoma. En aquests, la variació es deu al canvi d'una base per una altra en un lloc específic del genoma. Tot i que, en teoria, per cada SNP podria existir quatre al·lels, solen ser bial·lèlics, per la baixa freqüència de substitucions nucleotídiques i l'existència d'un biaix en les mutacions (Vignal *et al.* 2002). Aquests són menys polimòrfics que els microsatèl·lits; no obstant això, el baix polimorfisme pot ser compensat gràcies al genotipat massiu de grans grups d'SNPs. Com es veu en el gràfic anterior (Figura 4), els SNPs encara són una eina molt recentment utilitzada però que, en un futur, donat l'alt nombre de marcadors genètics neutres inclosos dins d'aquest grup, pot augmentar la precisió per avaluar paràmetres clàssics dins la genètica de poblacions, i així ajudar a resoldre moltes qüestions rellevants per a la correcta gestió i maneig d'espècie amenaçades.

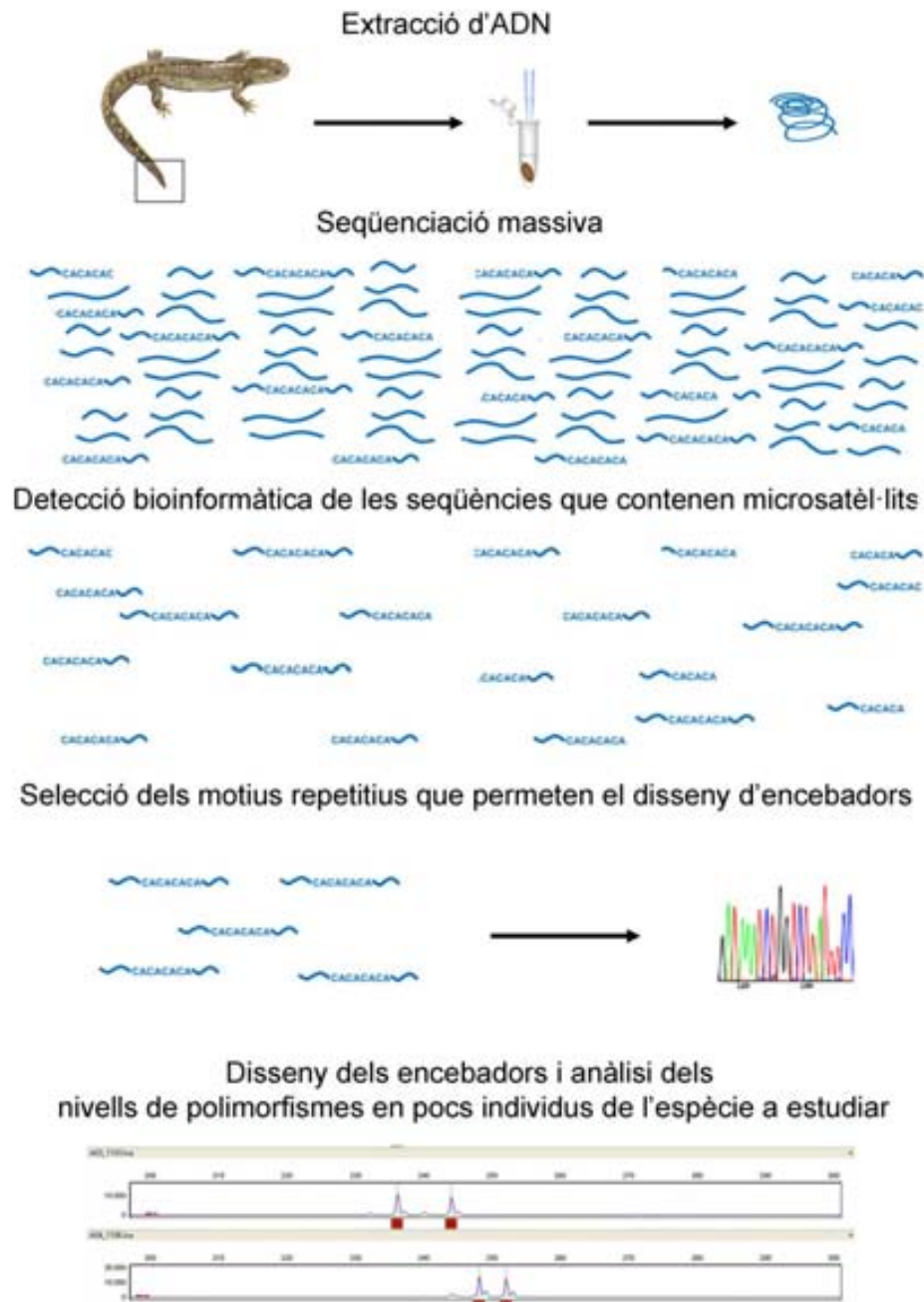


Figura 8. Metodologia utilitzant les NGS (*Next Generation Sequencing*) per al disseny de microsatèl·lits polimòrfics, utilitzant com a exemple el tritó del Montseny.

El nombre de marcadors moleculars recomanats variarà en funció del tipus de marcador i en funció de l'espècie a estudiar. Segons ConGRESS (*Conservation Genetic Resources for Effective Species Survival*; <http://congressgenetics.eu>; Hoban *et al.* 2013) el nombre de gens mitocondrials i/o nuclears de copia única utilitzats per a l'estudi de genètica de poblacions d'espècies rares o endèmiques varia entre 1-3. En el cas dels microsatèl·lits, el poder estadístic



dels marcadors dependrà del grau de polimorfisme de cada *locus*. Generalment, si els marcadors presenten alts nivells de polimorfismes, es poden utilitzar un nombre relativament baix – menys de 20, i inclús menys de 10 (Wan *et al.* 2004). Tot i que els SNPs han crescut en popularitat molt recentment, el nombre de SNPs a utilitzar encara no ha estat avaluat; tot i així, alguns projectes de SNPs poden tenir centenars o inclús milers de marcadors. Així mateix, el nombre d'individus a analitzar és també un factor decisiu per a una correcta avaluació. En espècies amb mides poblacionals petites o de difícil accés, el nombre ideal d'individus mostrejat per població a nivell teòric és de 20-50 aproximadament segons ConGRESS.

En la present tesi s'han utilitzat un marcador nuclear de còpia única (RAG1), un marcador mitocondrial (Cyt *b*) i 24 marcadors microsatèl·lits. El RAG1 (*Recombination Activating Gen*) és un gen nuclear del sistema immunitari que codifica un enzim funcional en la reordenació i recombinació dels gens de la immunoglobulina i receptors dels limfòcits T. Aquest ha estat àmpliament utilitzat en treballs filogenètics de vertebrats (Wang *et al.* 2014). El citocrom *b*, Cyt *b*, és un component del grup III de la cadena respiratòria. Aquest està involucrat en el transport d'electrons i generació d'ATP, i per tant, desenvolupa un paper vital en la cèl·lula. El Cyt *b* conté tant regions d'evolució ràpida com regions d'evolució lenta, i per això ha estat utilitzat habitualment per determinar les relacions filogenètiques de gran magnitud així com per analitzar divergències més recents a nivell poblacional. En aquesta tesi s'han escollit aquests dos marcadors, juntament amb una bateria de 24 marcadors microsatèl·lits, amb la finalitat de resoldre tant les qüestions filogenètiques entre les dues espècies del gènere *Calotriton*, com per fer l'anàlisi filogeogràfic i de la genètica poblacional del tritó del Montseny (*C. arnoldi*).

3. EL GÈNERE *CALOTRITON*

Actualment, la família Salamandridae és un dels grups més diversos d'urodels amb 21 gèneres i més de 100 espècies reconegudes (AmphibiaWeb 2015) amb una àmplia distribució que s'estén per Europa, el nord d'Àfrica, Àsia i Amèrica del Nord. Tradicionalment, s'ha dividit en dos grans subgrups: "les veritables salamandres" (gèneres *Chioglossa*, *Lyciasalamandra*, *Mertensiella* i *Salamandra*) i els tritons (la resta de gèneres actuals) (Zhang *et al.* 2008). Dins d'aquests últims hi ha una tendència evolutiva constituïda per tritons que habiten medis aquàtics d'aigües corrents, fredes i oxigenades, els tritons de muntanya. Fins a la publicació de Carranza i Amat (2005), els tritons de muntanya europeus es consideraven dins del gènere *Euproctus* Gène, 1839. Aquest incloïa tres espècies, una a la Península Ibèrica (*E. asper*) i dues a les Illes Tirrèniques (*E. montanus* a Còrsega i *E. platycephalus* a Sardenya). Fins aleshores, tot i les similituds morfològiques entre aquestes tres espècies i un escenari biogeogràfic àmpliament

acceptat, l'estat monofilètic d'aquest gènere havia estat qüestionat diverses vegades a nivell morfològic (Boulenger 1917; Despax 1923) i genètic (Gasser 1975; Steinfartz *et al.* 2002). Carranza i Amat (2005) utilitzant tres gens mitocondrials (*Cyt b*, 12S i 16S) van demostrar que *Euproctus* era, en realitat, un gènere polifilètic, ja que el tritó de muntanya del Pirineu estava més a prop filogenèticament als tritons del gènere *Triturus* que de la resta de les espècies del gènere *Euproctus*. Així, van separar els tritons de muntanya europeus en dos gèneres diferents, *Euproctus* per a les dues espècies de tritons tirrènics i *Calotriton* Gray, 1858 per als tritons de muntanya ibèrics (Figura 9).

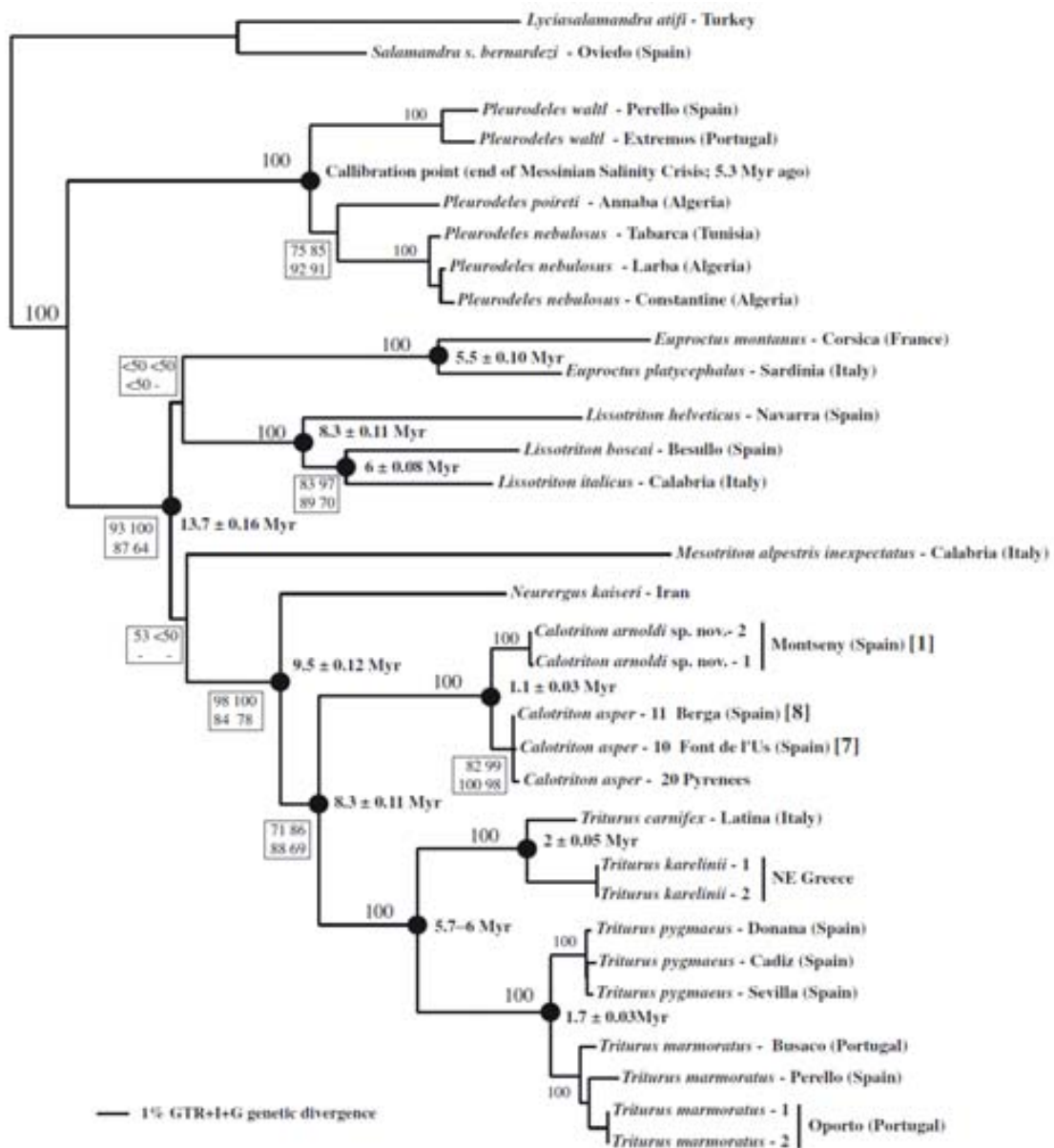


Figura 9. Arbre filogenètic segons la màxima versemblança (Maximum likelihood, ML) per alguns representants de la família Salamandridae segons Carranza i Amat (2005), combinant seqüències de tres gens mitocondrials, *Cyt b*, 16S i 12S.



Dins d'aquests últims, les diferències observades a nivell morfològic, osteològic i genètic indicaven que les poblacions del Montseny han evolucionat independentment de totes les altres poblacions de tritó pirinenc des de fa més d'un milió d'anys, d'acord amb les anàlisis de rellotge molecular. Com a conseqüència, Carranza i Amat (2005) van descriure les poblacions de tritó del Montseny com a una nova espècie dins del gènere *Calotriton*, anomenada *C. arnoldi*, en honor a l'herpetòleg Dr. E.N. Arnold, en reconeixement a la seva gran contribució al millor coneixement de l'herpetologia europea.

Així doncs, el gènere *Calotriton* actualment consta de dues espècies, el tritó pirinenc (*C. asper*) distribuït a llarg dels Pirineus i pre-Pirineus, i la nova espècie descrita, *C. arnoldi*, endèmic del massís del Montseny. Tot i ser tritons similars, difereixen en les una sèrie de característiques.

En primer lloc, la divergència sense corregir en l'ADN mitocondrial entre les dues espècies és de 4,1% en el Cyt *b*, 1,2% en el 12S rARN i 0,7% en el 16S rARN.

En segon lloc, a nivell osteològic, les apòfisis transverses de les quatre primeres vèrtebres caudosacrals de *C. arnoldi* són curtes i orientades posteriorment uns 45° (al igual que la majoria de les espècies de salamàndrids), mentre que en el tritó pirinenc són llargues i estan disposades gairebé perpendicularment respecte l'eix vertebral (condició derivada) (Figura 10). Així, en aquest cas, el tritó del Montseny conservaria la condició primitiva, i el tritó pirinenc la condició derivada, probablement com una adaptació més al tipus d'amplexus present en els tritons de muntanya europeus (Amat i Carranza 2006).

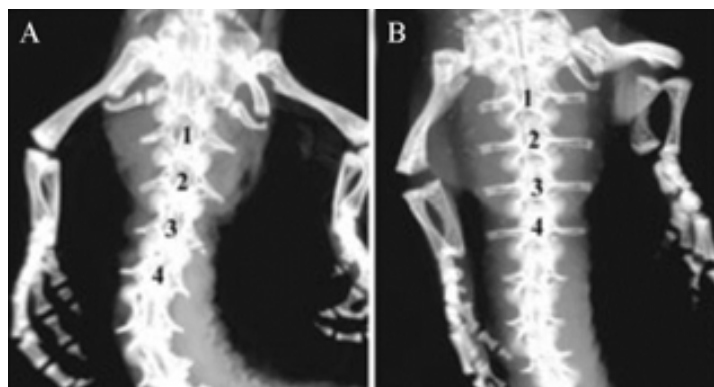


Figura 10. Diferències osteològiques de les apòfisis de les quatre primeres vèrtebres caudosacrals entre *Calotriton arnoldi* (A) i *C. asper* (B) segons Carranza i Amat (2005).

Per últim, a nivell morfològic les diferències més destacables rauen en la granulositat i pigmentació de la pell així com en la morfologia cloacal de les femelles (Figura 11). El tritó del

Montseny presenta menys protuberàncies cutànies queratinitzades, i menys desenvolupades que en el tritó pirinenc, donant-li un aspecte més llis i suau a la seva pell; a més, en *C. arnoldi*, aquestes són totalment absents en la regió ventral. A nivell de pigmentació, el patró present al tritó del Montseny és únic i molt distintiu entre les dues espècies; dorsalment presenta una coloració amb tons xocolata, en alguns casos acompanyada de taques de color groc verdós i sense la línia groga vertebral característica del tritó pirinenc (sobretot en els joves); a nivell ventral, la gola és d'un color marfil; a més, el ventre és translúcid de color crema amb un petit puntejat fosc, que fins i tot deixa veure els ovòcits en el cas de les femelles madures, tret que difereix molt del tritó pirinenc (opac i amb grans taques fosques). Per últim, en les femelles, la protuberància cloacal és també un tret distintiu; en el cas del tritó del Montseny aquesta és totalment tubular des de la base, amb un color vermellós a la punta, a diferència de la morfologia cònica sobre una base àmplia d'aspecte bulbós, present en l'espècie pirinenca (Figura 11C-F).



Figura 11. Diferències entre la granulositat i pigmentació de la pell entre *Calotriton arnoldi* (A) i *C. asper* (B), i detalls de la morfologia cloacal de *C. arnoldi* (C i D) i *C. asper* (E i F). Fonts: A, Valbuena-Ureña *et al.* (2013); C-F, Carranza i Amat (2005).

4. L'ESPÈCIE ESTUDIADA, *CALOTRITON ARNOLDI*

Identificació i descripció de l'espècie

El tritó del Montseny és un amfibi de mida petita, amb una longitud corporal màxima de 102.62 mm en les femelles i 102.25 mm en el mascles, sent generalment més petit que el tritó pirinenc (Carranza i Amat 2005). L'adult presenta un cos robust i deprimit, sense cap cresta dorsal ni caudal (Figura 12). Té un cap curt, aplanat i ample amb uns ulls petits situats lateralment amb l'iris daurat. Les extremitats són primes i curtes, ben desenvolupades i sense membranes interdigitals, amb els dits aplanats recoberts a la part distal per una estructura cònica per augmentar l'adhesió. La cua és llarga, comprimida lateralment i acabada en un marge obtús.



La pell és generalment llisa, amb petites protuberàncies còrnies al llarg de tot el cos excepte a la part ventral. La pigmentació dorsal és típicament d'un color bru uniforme amb una tonalitat de color xocolata amb diferències poblacionals. Els individus de les poblacions que es troben a l'est del riu Tordera (sector oriental) poden presentar taques irregulars de color groc pàl·lid en els flancs de la cua i el cos, mentre que els individus de les poblacions localitzades a l'oest del riu Tordera (sector occidental) tenen el típic color fosc, marró xocolata sense taques, i els mascles presenten un musell despigmentat (Amat i Carranza 2007a, b; Carranza i Amat 2005); veure l'apartat referent a la distribució). La regió ventral és translúcida – amb fol·licles visibles en femelles gràvides – d'un color crema amb taques fosques aproximadament del mateix color que el dors, que consisteix en un puntejat fosc que es desenvolupa millor als costats. A la regió posterior de la gola, prop dels punts d'inserció de les extremitats anteriors, presenta una gran taca de color marfil (Figura 12F).

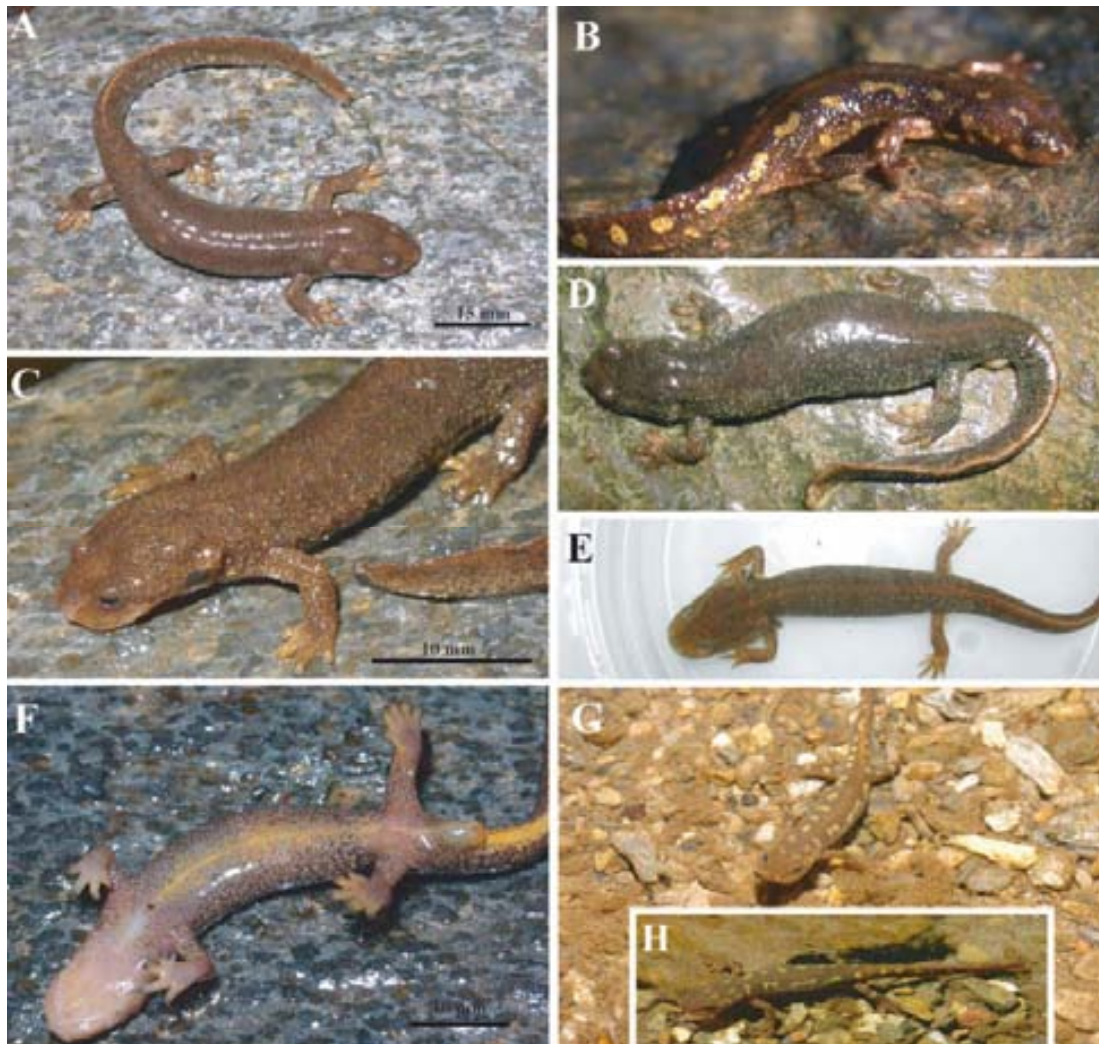


Figura 12. Diferents detalls de la morfologia externa de *Calotriton arnoldi* segons Carranza i Amat (2005). Femella amb la típica coloració xocolata uniforme (A, C i D), mascle del sector oriental amb taques groguenques als costats del cos i la cua (B), larva del sector occidental (E), vista ventral d'una femella (F), i individus juvenils del sector oriental (G i H).

L'espècie presenta un acusat dimorfisme sexual. Els mascles tenen un cos més llarg, un cap més ample i una cua més curta, alta i musculada que les femelles. La regió cloacal és també un tret distintiu entre mascles i femelles: en la majoria de salamàndrids, la cloaca dels mascles és més gran i més inflada que en les femelles (Kühnel *et al.* 2010); en canvi, en el tritó del Montseny, la cloaca de les femelles està més desenvolupada amb una morfologia allargada d'aspecte tubular, a l'extrem del qual es troba l'obertura cloacal, segurament com una adaptació a l'ovoposició de la posta entre les escletxes de pedres; els mascles presenten una cloaca bulbosa, amb una obertura a la regió central.

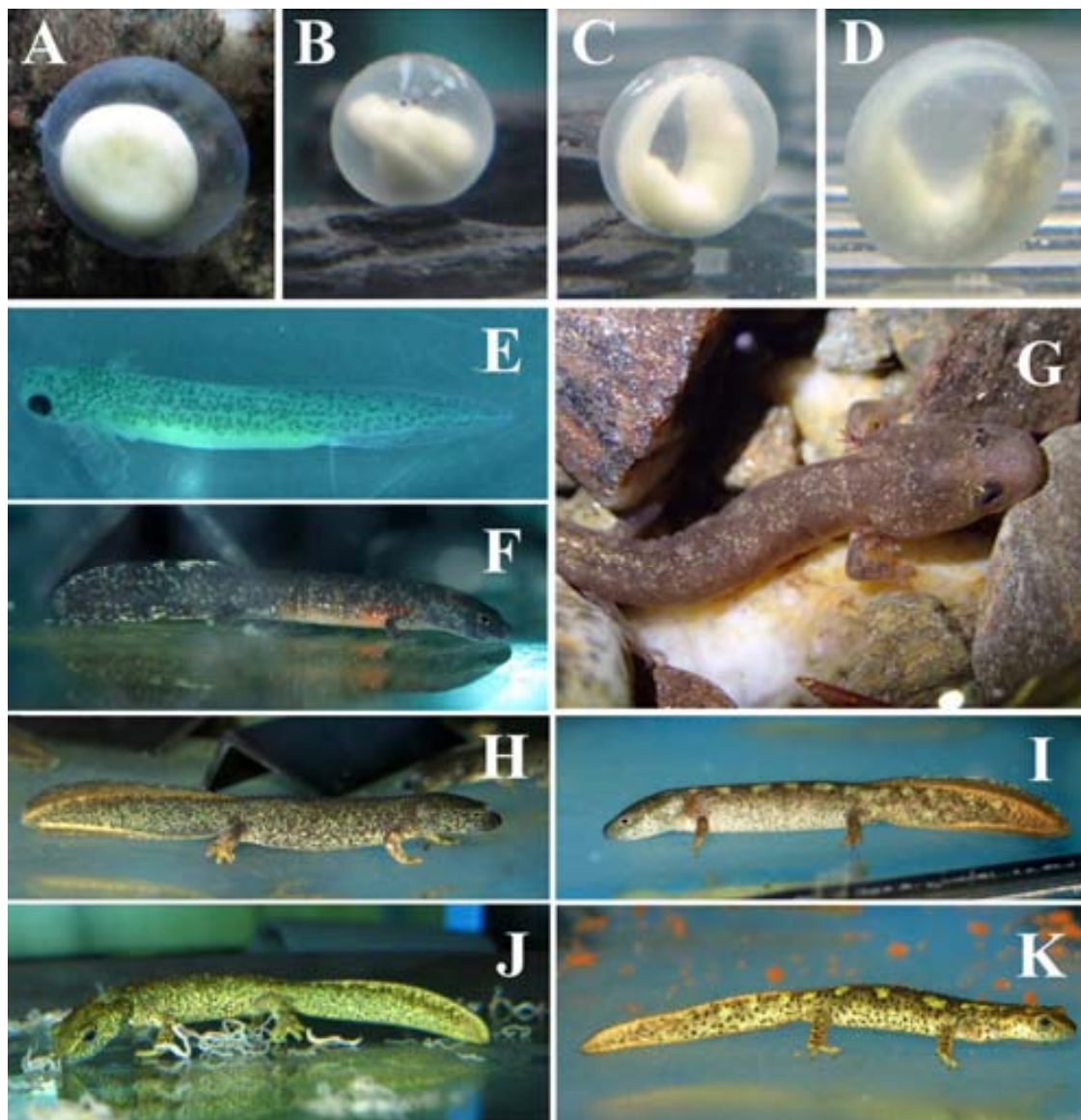


Figura 13. Detall de diferents estats de desenvolupament, des d'ou fins a juvenil (post-metamòrfic), de *Calotriton arnoldi*. Ous en diferents estats de desenvolupament (A-D), larva acabada d'eclosionar (E), larva de menys d'un any (F), detall de la part anterior d'una larva de menys d'un any (G), larves d'aproximadament dos anys del sector occidental (H) i oriental (I), i post-metamòrfics del sector occidental (J) i oriental (K). Veure apartat següent (Distribució i hàbitat). Font: G, David Nicolau.



Les larves són molt semblants a les del tritó pirinenc, amb un cap típicament deprimat i més llarg que ample acabat en un musell arrodonit. El cos és allargat i generalment més prim que el cap, amb una pigmentació molt semblant als adults i sovint amb les taques grogues més patents (Figura 13). La cua és de menor longitud que el cos, amb una cresta caudal que es perllonga dorsalment fins a la part posterior del cos, a l'alçada de les extremitats posteriors. L'extrem caudal és arrodonit i les extremitats són curtes amb els dits acabats amb un estoig corni.

Distribució i hàbitat

Espècie endèmica del massís del Montseny, al nord-est de la Península Ibèrica. Les poblacions més properes de tritó pirinenc es troben a uns 25 km de distància, a la vessant sud del pantà de Susqueda (Baucells *et al.* 1998). Actualment el seu rang de distribució s'estima aproximadament en 8 km², restringit a uns pocs torrents de la conca de la Tordera. L'extensió lineal total de distribució de l'espècie (calculat al llarg dels diferents torrents) és de menys de 5,8 quilòmetres en el 2008 (Amat i Carranza 2009). S'han descrit un total de set torrents ocupats, distribuïts en dos sectors poblacionals situats a ambdós costats de la vall del riu Tordera. Aquests dos sectors estan separats per menys de 5 kilòmetres de distància en línia recta, i per prop de 40 km seguint la conca hidrogràfica. El sector oriental és el primer que es va descriure per Montori i Pascual (1981) i inclou 3 torrents. El sector occidental, descrit recentment per Amat (2004) comprèn 4 torrents. D'acord amb Montori i Pascual (1981) i Carranza i Amat (2005), i amb la finalitat de no divulgar la ubicació dels torrents per raons de conservació, ens referim als torrents orientals com A1, A2 i A3, i als quatre torrents occidentals com B1, B2, B3 i B4 (Figura 14). L'espècie ha desaparegut d'un tram d'una de les primeres localitats on es va descobrir (A2), segurament com a conseqüència de la forta sequera que pateix aquest tram de torrent. Durant els últims anys, s'està treballant per establir noves localitats fruit dels treballs de recuperació de l'espècie (Amat *et al.* 2014; Carbonell *et al.* 2014a).

Montori i Campeny (1991), en el seu estudi sobre la demografia dels tritons al Montseny, estimaven poblacions de 60-100 individus pels torrents del sector oriental. Més tard, en el marc d'un estudi demogràfic per la conservació del tritó del Montseny, s'han obtingut estimes de 70 a 330 individus per torrent, donant una població total estimada per l'espècie de 1000-1500 individus adults (Amat i Carranza 2005, 2007a, b). Les densitats però varien segons la població, entre 0,2 i 1,1 adults per metre de torrent, trobant les majors densitats al sector oriental (Amat *et al.* 2014).

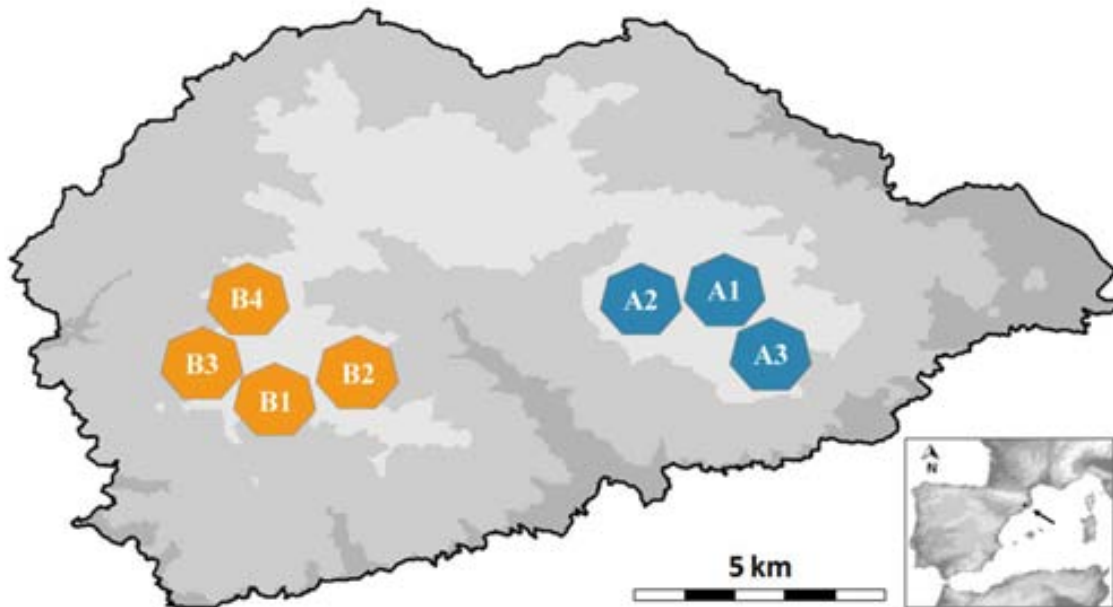


Figura 14. Distribució de les poblacions de *Calotriton arnoldi*. Localitats del sector oriental de la vall del riu Tordera (A1-A3) i localitats del sector occidental (B1-B4).

Els torrents que formen l'hàbitat del tritó del Montseny es caracteritzen per ser estrets, amb un fort desnivell i un substrat d'esquist fortament fissurat i càdtic, que dóna lloc a una gran diversitat d'ambients (cascades, descarregadors i basses) on es refugia l'espècie (Figura 15). Generalment presenten poc cabal d'una aigua molt neta, pobre en matèria orgànica i en partícules en suspensió, freda i oxigenada. Aquests es troben en altituds entre 600 i 1200 m, amb una abundant cobertura vegetal, preferentment de faig (*Fagus sylvatica*), però també d'alzina (*Quercus ilex*) i verns (*Alnus glutinosa*), que proporciona un ambient fresc i humit (Amat i Carranza 2007a, b).

Dos dels aspectes bàsics que limiten l'espècie a aquests ambients són la presència permanent d'aigua i la temperatura d'aquesta. L'higroperíode d'aquests torrents pot estar marcat per una sequera superficial estival i de vegades hivernal, però sempre conservant un cabal d'aigua subterrani on es poden refugiar els individus. Respecte a la temperatura, segons el seguiment realitzat al torrent B1 durant el 2006, la temperatura de l'aigua pot variar de 1,2°C a 20,9°C (9,7°C de mitjana), mentre que la temperatura exterior és més elevada (15,4 °C de mitja i un interval que va dels 8,2°C a 26,4°C al costat del torrent). Dins d'aquest interval, sembla ser que el rang tèrmic òptim per l'activitat de l'espècie està entre els 4 i els 14°C (Amat i Carranza 2007a). Així doncs, és possible que les poblacions no es trobin per sota dels 600 m d'altitud probablement per raons tèrmiques, ni per sobre dels 1200 m per la falta d'aigua en aquests trams de torrents.



Figura 15. Hàbitat característic de *Calotriton arnoldi*. Torrents amb descarregadors i basses amb aigües netes, fredes i ben oxigenades (A-C); aspecte d'un torrent en època estival, amb sequera superficial (D).

Ecologia i comportament

És una espècie present en hàbitats molt fissurícoles i preferentment nocturna, la major part dels individus desenvolupa la seva activitat a l'interior del torrent. Només els podem trobar en superfície, a la llera dels torrents, quan les condicions són favorables, és a dir, quan el cabal de l'aigua és elevat i la temperatura és moderada (entre els 4 i els 14°C). Així, l'activitat superficial de l'espècie és màxima a la primavera i a la tardor, amb una disminució d'aquesta al hivern i a l'estiu. Com a estratègia antidepredadora, quan són molestats, tant els adults com els juvenils segreguen per tota la superfície dorsal una substància blanquinosa d'aspecte mucós, que fa una forta olor sintètica, probablement amb l'objectiu de ser menys atractius als depredadors.

El tritó del Montseny sembla ser estrictament aquàtic durant tots els estadis de vida (de larves fins a adults) i realitza desplaçaments curts al llarg del torrent. A diferència del tritó pirinenc, mai s'han trobat individus post-metamòrfics en el medi terrestre (Carranza i Amat 2005; Montori i Campeny 1991). Aquesta dependència total de l'aigua podria estar marcada tant per aspectes fisiològics de l'espècie com per aspectes ambientals. La morfologia de l'espècie concorda perfectament amb aquests hàbits totalment aquàtics: la pell molt prima (transparent en la part ventral) per facilitar l'intercanvi de gasos, i la reducció extrema dels pulmons, fa pensar en una dependència total al medi aquàtic per realitzar la respiració. D'altra banda, l'ambient terrestre força mediterrani segurament no reuneix les condicions òptimes per la presència de subadults, al igual que succeeix en les poblacions del tritó pirinenc localitzades en ambients extrems, sobretot als límits de la seva àrea de distribució (Montori i Campeny 1991; Montori i Llorente 2014).

Poc es coneix sobre la dieta de l'espècie. Únicament s'ha descrit la depredació de larves de *Salamandra salamandra* per part d'adults i un comportament actiu en la recerca de preses sota les pedres (Amat i Carranza 2011). Molt probablement, al igual que el tritó pirinenc, l'alimentació sigui fauna aquàtica reòfila (principalment invertebrats) i secundàriament, preses terrestres que cauen a l'aigua accidentalment. En captivitat accepten gairebé qualsevol tipus d'invertebrat que li càpiga a la boca, així com restes trossejades de vertebrats.

A la natura poc es coneix de la biologia reproductora de l'espècie. Mai s'han observat ous ni larves de petita mida, i en alguns torrents ni tan sols immadurs. Sí que s'han observat amplexus, principalment a la primavera i secundàriament a la tardor. En aquesta espècie, al igual que en el tritó pirinenc i els tritons de muntanya tirrènics, l'amplexus representa una adaptació a la vida reòfila. El mascle immobilitza a la femella amb la cua i de vegades també amb la boca, i amb les potes posteriors li transfereix l'espermatòfor (Figura 16).



Figura 16. Amplexus de dos exemplars de *Calotriton arnoldi*. Font: Francesc Carbonell.



En captivitat, els coneixements de la biologia reproductiva són més compleerts (Carbonell *et al.* 2011). Els amplexus s'observen pràcticament durant tot l'any, amb una major freqüència durant la primavera. Les femelles dipositen i adhereixen els ous individualment entre les escletxes de les pedres, des de febrer fins a novembre, amb un màxim a la primavera. Les postes són variables, d'uns 50 ous per femella, amb un màxim observat de 161 (Carbonell *et al.* 2010, 2014b). Els ous mesuren uns 5 mm de diàmetre. Són esfèrics, de vegades amb un aplanament del pol animal i presenten un embolcall gelatinós transparent envoltat per una fina làmina adhesiva (Figura 13A-D). Entre els 10,5°C i els 13°C l'eclosió es dona aproximadament en 50 dies (Alonso 2013). Només al voltant del 50% dels ous en captivitat són viables. L'altre 50% no sobreviu, ja que no són fèrtils, avorten o les larves moren al poc de néixer (Carbonell *et al.* 2014b). Acabades d'eclosionar, les larves mesuren poc més d'un centímetre, són blanquinoses amb una lleu pigmentació a la part dorsal, amb uns ulls vistosos de color negre, sense balancins i generalment amb les extremitats anteriors visibles (Figura 13E). El desenvolupament larvari també depèn de la temperatura. Sota el rang de temperatures al que són mantingudes les larves en captivitat (interval de 8°C al hivern i 15°C a l'estiu aproximadament), el desenvolupament larvari es perllonga per més d'un any, podent arribar a produir-se la metamorfosi dels sis mesos com a mínim als dos anys edat com a màxim. La maduresa sexual l'assoleixen entre els quatre i els cinc anys aproximadament.

Factors d'amenaça

Les principals amenaces que afecten la supervivència d'aquesta espècie són principalment la pèrdua i alteració dels fràgils hàbitats aquàtics, com són els trams superiors dels torrents de muntanya.

A curt termini, uns dels factors que més amenacen aquesta espècie són la sobreexplotació dels aqüífers i la dessecació dels torrents ocupats. Tractant-se d'una espècie estrictament aquàtica, la dessecació dels rierols de muntanya és l'amenaça més immediata. L'explotació de l'aigua a nivell comercial i privat afecta greument la seva disponibilitat, produint la dessecació del torrent. Així, la disminució del nivell de la capa freàtica de tot el massís causa la dessecació completa de les conques altes.

L'explotació forestal afecta greument la qualitat i idoneïtat de l'hàbitat de l'espècie. L'eliminació o substitució de la coberta vegetal que protegeix les rieres, per una banda, fa augmentar la temperatura de l'aigua ja que n'augmenta la insolació; per l'altra banda, produeix el col·lapse de la llera del torrent, disminuït la disponibilitat de refugis com a conseqüència de la deposició de sediments per l'augment de l'erosió.

Així mateix, les vies de comunicació sobre els hàbitats del tritó generen trams inhabitables i poden constituir barreres, deixant aïllades les poblacions dins d'un mateix torrent.

Durant del seguiment regular que s'està realitzant en l'espècie, s'han documentat diferents tipus d'anomalies morfològiques. Per una banda, s'ha trobat la presència de melanomes (Figura 17) amb una prevalença important en el conjunt de la població adulta del sector oriental (27%) i anecdòtica en el sector occidental (Martínez-Silvestre *et al.* 2011). Aquests autors han observat una clara correlació entre la mida corporal i la presència d'aquests tumors. L'etiologia i les conseqüències encara es desconeixen, però es creu que són benignes i que estan produïts per l'acció d'algun factor d'estrès ambiental. D'altra banda, s'han trobat un total de 3 tipus de malformacions: polidactília, ectrodactília i cua bífida (Figura 17; Martínez-Silvestre *et al.* 2014). En aquests casos, afecten per igual als dos sectors poblacionals i la incidència total és de prop del 4% en la població adulta analitzada. Les causes podrien estar relacionades amb la regeneració de parts amputades, com a conseqüència de les agressions intraespecífiques observades, i són independents a la presència dels melanomes. Actualment, encara es desconeix si aquestes malalties i malformacions poden ser nocives per l'espècie, però en qualsevol cas, s'ha de fer un seguiment d'aquestes per establir-ne la seva prevalença i possible efecte negatiu.

Per últim, un factor que encara no s'ha detectat però podria afectar greument les poblacions de tritó del Montseny és l'aparició d'algun brot de malalties emergents, ja que aquestes són una causa d'amenaça de gran importància pels amfibis (Wake 2012), com ja s'ha esmenat anteriorment en l'apartat de causes del declivi dels amfibis.

A llarg termini, l'escalfament global és la major amenaça a la qual s'enfronta aquesta espècie, ja que pot provocar un augment de la temperatura i períodes de llargues sequeres que comprometen la viabilitat de les seves poblacions. El desplaçament de la fageda, el bosc més favorable per l'espècie, cap a les zones més altes (Peñuelas i Boada 2003) i la seva substitució per l'alzinar és un bon exemple de la problemàtica que pot suposar per les seves poblacions.

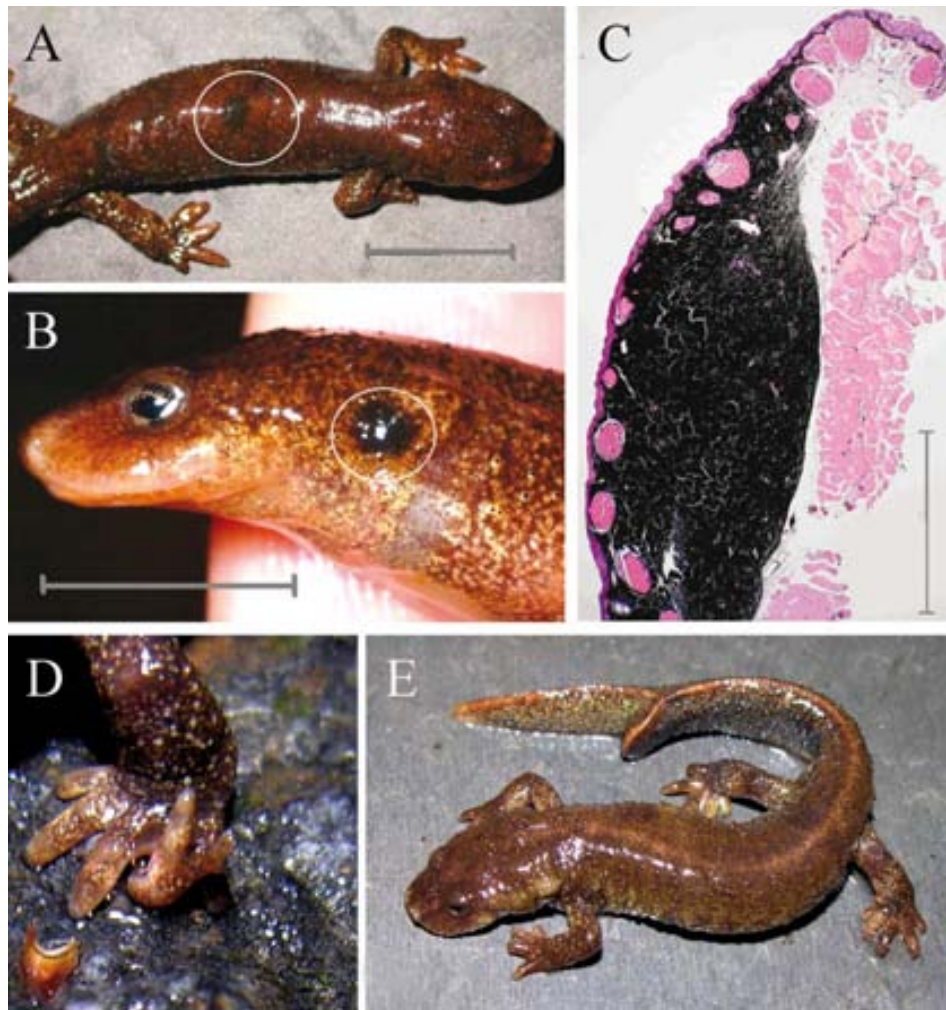


Figura 17. Fotografies de *Calotriton arnoldi* mostrant la presència de melanomes (A i B, bar = 1 cm), i secció histològica d'un melanoma (C) tenyida amb hematoxilina-eosina (bar = 1 mm); detall d'una extremitat d'un individu amb polidactília (D), i detall d'un individu amb cua bífida (E). Fonts: A-C, Martínez-Silvestre *et al.* (2011); D i E, Martínez-Silvestre *et al.* (2014).

Conservació de l'espècie

A nivell mundial, actualment l'espècie està catalogada com En Perill Crític (B2) a la Llista Vermella d'Espècies Amenaçades de la IUCN, donada la seva exigua àrea d'ocupació, i a que la qualitat del seu hàbitat i el nombre d'individus madurs està probablement en declivi (Carranza i Martínez-Solano 2009). A nivell estatal està catalogada com en Perill d'Extinció en el Catàleg Espanyol d'Espècies Amenaçades (Reial Decret 139/2011 de 4 de febrer, pel desenvolupament del Llistat d'Espècies Silvestres en Règim de Protecció Especial i del Catàleg Espanyol d'Espècies Amenaçades) al igual que en el Catàleg de Fauna Amenaçada de Catalunya, que està pendent d'aprovació.

A més, a nivell legal, l'espècie està protegida per:

- La Unió Europea sota la Directiva 92/43/CEE del Consell, de 21 de maig, relativa a la conservació dels hàbitats naturals i de la fauna i flora silvestres (Directiva d'hàbitats), inclosa en l'annex IV com a *Euproctus asper* (espècie d'interès comunitari que requereix una protecció estricta).
- L'estat Espanyol sota Llei estatal 42/2007, de 13 de desembre, del patrimoni natural i de la biodiversitat, annex II: espècie d'interès comunitari per a la preservació de la qual s'han de designar zones especials de conservació; inclosa en l'annex V com a *Euproctus asper*: espècie d'interès comunitari que requereix una protecció estricta.
- A Catalunya sota el Decret legislatiu 2/2008, de 15 d'abril, pel qual s'aprova el text refós de la Llei de protecció dels animals: espècie protegida de la fauna salvatge autòctona.

Cal remarcar que caldria una actualització de l'estat taxonòmic actual de l'espècie a nivell legal, donat l'estat crític de conservació en què actualment es troba.

L'any 2007 es va iniciar un projecte de conservació d'aquesta espècie, promogut per dues entitats que es coordinen entre sí: el Parc Natural i Reserva de la Biosfera del Montseny (PN-RB Montseny; Servei de Parcs Naturals, Diputació de Barcelona) i el Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural (DAAM) de la Generalitat de Catalunya (a través de la Direcció General de Medi Natural i Biodiversitat).

Totes les localitats del tritó del Montseny es troben dins del PN-RB Montseny, un espai natural protegit on la conservació del patrimoni natural i la biodiversitat és un objectiu prioritari. Dins del pla de conservació d'aquest territori (Barber *et al.* 2014) s'estableix com a prioritat, tota una sèrie d'actuacions encaminades al millor coneixent i a la conservació del tritó del Montseny (Taula 2). El seguiment anual de les poblacions que es realitza des del 2007 consisteix en mostrejar un total de set trams representatius de tota la seva distribució. Aquestes prospeccions es realitzen als mesos de primavera i tardor, èpoques de màxima activitat i detectabilitat de l'espècie. Les prospeccions consisteixen en comptabilitzar el nombre d'exemplars trobats i en fer una inspecció visual de l'hàbitat, per tal d'avaluar el manteniment de cada població i controlar la qualitat del seu hàbitat. Això ha permès confirmar l'estabilitat de la seva distribució geogràfica, a excepció del tram superior d'una població oriental (A2) que, com s'ha comentat anteriorment, l'espècie s'ha extingit. Aprofitant el seguiment des del 2007 al 2011, s'ha realitzat un mostreig per detectar la possible presència del fong *Batrachochytrium dendrobatidis*, causant de la malaltia de la quitridiomicosis, amb resultats fins aleshores negatius (Obon *et al.* 2013).

Taula 2. Plans d'acció, actuacions i objectius destinats a la conservació de *Calotriton arnoldi* inclosos dins del pla de conservació del Parc Natural i Reserva de la Biosfera del Montseny (Barber *et al.* 2014).

Pla d'acció	Actuació	Objectiu
Programes de recerca	Establiment de les àrees de distribució del tritó del Montseny	Establir les zones de distribució real del tritó del Montseny i proposar indrets potencialment adequats per a la seva futura reintroducció
	Determinació d'amenaques, grau d'afectació i ubicació del tritó del Montseny	Fer un inventari d'amenaques, valorar-ne els efectes sobre les poblacions de tritó del Montseny, ubicar-les geogràficament i proposar mesures per minimitzar-ne o eliminar-ne l'impacte negatiu
Programes de seguiment	Determinació de la biologia, demografia i ecologia del tritó del Montseny	Definir quin és el cicle biològic del tritó del Montseny, la demografia i l'estructura d'edats de les poblacions, així com les necessitats mediambientals que requereix, mitjançant el treball de camp i l'experimentació als centres de cria.
	Caracterització genètica dels dos nuclis de població del tritó del Montseny	Definir la variabilitat genètica entre els dos nuclis de tritó del Montseny, mitjançant marcador genètics mitocondrials i nuclears.
	Seguiment del estat de les poblacions del tritó del Montseny	Obtenir indicadors anuals de l'estat de conservació de les poblacions, detectar possibles amenaces i proposar actuacions si cal intervenir per millorar-ne l'estat de conservació.
Programes d'intervencions	Seguiment de les reintroduccions del tritó del Montseny	Disposar d'indicadors de resultats de les reintroduccions que es portin a terme i proposar millores en el Programa de reintroducció del tritó del Montseny.
	Seguiment de les accions de conservació del tritó del Montseny	Establir un seguiment durant els treballs d'accions de conservació, obtenir indicadors de resultats de les accions, valorant la incidència dels treballs realitzats, i proposar mesures que millorin l'efectivitat de les futures accions de conservació.
Programes de comunicació, educació i participació ambiental (CEAP)	Millorar les captacions d'aigua	Actualitzar la captació de particulars per assegurar cabals ecològics.
	Reintroduccions del tritó del Montseny	Assegurar la viabilitat de les poblacions de tritó del Montseny i ampliar-ne l'àrea de distribució.
Programes de comunicació, educació i participació ambiental (CEAP)	Les espècies vulnerables del Montseny i les seves amenaces	Donar a conèixer les espècies vulnerables i les amenaces que les afecten directament i les que afecten als seu hàbitat.
	La vulnerabilitat del tritó del Montseny	Conscienciar sobre la vulnerabilitat del tritó del Montseny i les amenaces que l'afecten.

Pel que fa als programes de recerca efectuats, s'han centrat en aspectes descriptius, amb la finalitat de poder definir la situació demogràfica, la fenologia, la distribució, la biologia i les amenaces per l'espècie (Amat i Carranza 2007a, b). En aquest sentit, els estudis genètics que es presenten en aquesta tesi formen part de la recerca efectuada dins d'aquests programes.

Donada la vulnerabilitat de l'espècie, actualment s'està redactant el Pla de Recuperació de l'Espècie a Catalunya, que inclou la cria en captivitat com una de les actuacions a realitzar. La principal finalitat d'aquesta és, per una banda, crear una reserva genètica amb l'objectiu de garantir la supervivència de les escasses poblacions en cas de catàstrofe, i per l'altre, disposar de suficients exemplars per a la creació de noves poblacions, i així ampliar la seva àrea de distribució. A més, el manteniment de l'espècie en captivitat permet obtenir informació aplicada a la conservació sobre la seva biologia difícil d'obtenir dels estudis de camp.

El projecte de cria es va iniciar al maig del 2007 al Centre de Fauna de Torreferrussa, que pertany al DAAM de la Generalitat de Catalunya. Seguint el principi de la precaució, i amb els coneixements que hi havia fins a la data a nivell genètic i morfològic, es va considerar oportú diferenciar entre dues unitats de maneig a mantenir (sector occidental i oriental), per tant dues línies de cria separades en paral·lel. Posteriorment, donada la vulnerabilitat que suposa tenir un únic centre de cria, enfront a possibles problemes que pogués patir l'espècie en captivitat, es va incorporar durant el 2012 el Zoològic de Barcelona per mantenir exemplars del sector oriental, i al 2013 el Centre de Fauna del Pont de Suert amb exemplars del sector occidental. D'aquesta manera es garanteixen dos centres de cria per a cadascuna de les unitats de maneig.

Els primers resultats de la cria en captivitat es van obtenir ja des del primer any, i fins al 2014 s'han obtingut més de 1500 exemplars (Carbonell *et al.* 2014b; Taula 3).

Taula 3. Resultats del programa ex situ de *Calotriton arnoldi* durant el període 2007-2014 obtinguts al Centre de Recuperació de Fauna Salvatge de Torreferrussa. Font: Carbonell *et al.* 2014b.

ANY	SECTOR ORIENTAL	SECTOR OCCIDENTAL	TOTAL
2007	19	29	48
2008	85	126	211
2009	51	152	203
2010	131	81	212
2011	63	101	164
2012	48	42	90
2013	164	113	277
2014	140	185	325
TOTAL	701	829	1530



Gràcies a aquests bons resultats, al 2010 es va iniciar un programa experimental per establir noves poblacions en hàbitats favorables, per tal d'augmentar l'àrea de distribució de l'espècie, mitjançant l'alliberament de larves i exemplars immadurs provinents de la cria en captivitat (Carbonell *et al.* 2014b). En aquest sentit, actualment s'està treballant en un total de quatre torrents potencials (dos per a cada sector poblacional) amb la finalitat d'avaluar l'èxit de la creació de noves poblacions com a estratègia per la conservació de l'espècie. Durant el període 2010-2014 s'han alliberat un total de 659 individus (207 a les noves localitats del sector oriental i 452 a les del sector occidental). El comportament críptic i fissurícola dels exemplars alliberats i el poc temps transcorregut dificulta l'avaluació d'aquestes introduccions. Els individus recapturats tenen una bona condició corporal, i inclús s'ha observat un amplexus en una de les poblacions introduïdes. No obstant, el baix nombre de recaptures obtingut fins a l'actualitat suggereix que, per tal de quantificar la supervivència dels individus introduïts, ha de transcórrer encara més temps i s'ha d'augmentar l'esforç de mostreig.

