



Poblaciones de Rana temporaria en los lagos y humedales del Alto Aragón occidental (Pirineo de Huesca, España)

Laura Caamaño Chinchilla¹ , Verónica Platas Mallo¹ , Nicolás Palanca Castán^{1,2} y Antonio Palanca Soler¹.

¹Laboratorio de Anatomía Animal, Facultad de Biología, Universidad de Vigo, España,

²Departamento de Neurociencia, Carl von Ossietzky University, School of Medicine and Health Sciences, Oldenburg, Alemania

Palabras clave: Lagos pirenaicos, Anfibios, *Rana temporaria*, canto, genética.

Resumen

Las poblaciones de *Rana temporaria* que habita el Alto Aragón occidental están sometidas a ambientes extremos de alta montaña pirenaica y a diversos impactos ambientales. Estas condiciones que dificultan un permanente contacto entre ellas originan una incipiente diferenciación que se pone de manifiesto en el presente estudio donde relacionamos la forma del canto inducido en hembras con las secuencias génicas. Nuestras investigaciones evidencian una gran correlación lineal ($R^2 = 0.936$, sig.=0,002) entre la matriz de distancias calculada con los cantos y la matriz de distancias genéticas. Este método no invasivo, económico y rápido, nos permitirá calcular en el futuro las barreras ecológicas que fragmentan los hábitats y ponen en peligro a las especies.

Material y métodos

Los especímenes de *Rana temporaria* fueron capturados en varias localidades del Alto Aragón occidental: a todos ellos se les indujo al canto mediante una ligera presión con la mano, registrándose el mismo con una grabadora digital (Sony dat TCD-D8) y un micrófono direccional (AKG C568EB) colocado a una distancia de 10 cm. Se observó el sexo y se midió su longitud del rostro a cloaca (SVL) y una selección de individuos de cada localidad, previo permisos adecuados de las autoridades de Medio Ambiente del Gobierno de Aragón, fueron sacrificados con clorobutanol y conservados en etanol de 95° para su posterior estudio genético.

Piezas del músculo e hígado fueron homogeneizados en Pgm tampón (1993, Hebert & Beaton). La electroforesis se llevó a cabo en acetato de celulosa (CA) placas de Helena Diagnostics, Texas. Se utilizó cuatro sistemas tampón diferentes para la separación de alozimas: fosfato tampón, pH 7.2 (PP 7.2); tris-maleico tampón, pH 7.0 (TM 7.0); tris-citrato tampón, pH 7.2 (TC 7.2); tris-glicina tampón, pH 8.5 (TG 8.5). Veinte sistemas enzimáticos proporcionaron datos sobre 24 presuntos loci de genes. Las frecuencias alélicas y estimaciones de población de la variabilidad genética fueron calculadas usando G-STAT (1997, Sigismund). Para calcular las distancias genéticas estándar utilizamos el método de Nei (1972).

Para el análisis acústico se seleccionaron manualmente, por cada canto muestreado, bandas de todo “notas” libres de interferencias eventuales. Cada una de las 272 notas obtenidas se caracterizaron mediante 33 parámetros acústicos, utilizando el software SoundRuler (2003-2007, Gridi-Papp). Estos parámetros hacen referencia a la amplitud, energía y frecuencia.

Mediante un análisis de componentes principales asignamos todos los parámetros a 8 componentes de los que los 6 primeros explican el 75% de la varianza. Seleccionamos como variables para los siguientes procesos los parámetros mejor correlacionados con cada uno de los 6 primeros componentes. La variable correspondiente al primer componente (que explica el 26% de la varianza) la escalamos en 5 intervalos tomando percentiles iguales que engloban el 20% de los casos cada uno. Tomando como variable de agrupación la variable escalada, a la que hemos asignando a cada uno de los intervalos un número correlativo (de 1 a 5) como valor y una letra (A, B, C, D y E) como etiqueta y como variables independientes las 6 variables seleccionadas anteriormente, hacemos un análisis discriminante usando matriz de covarianzas intra-grupos y guardando en nuevas variable el grupo de pertenencia pronosticado para cada uno de los valores de agrupación y las puntuaciones discriminantes. Observando los gráficos de grupos combinados correspondientes a los valores de las puntuaciones discriminantes de las funciones 1 y 2, simplificamos los valores de la variable de agrupación (en

nuestro estudio los reducimos a 4: A, B, C y D). Repetimos varias veces el análisis utilizando los grupos de pertenencia pronosticados como nuevas variables de agrupación hasta que el estadístico Lambda de Willks que contrasta todas las funciones del discriminante quede constante. Podemos anular datos que difieran significativamente de todos los valores (en nuestro caso anulamos 2 de 274).

A continuación asignamos a cada ejemplar el número de datos que corresponden a cada tipo de valor utilizado en la última variable de agrupación considerada. Obteniendo una matriz reducida donde consideraremos cada ejemplar como nuevo dato, siendo las variables los valores de agrupación (A, B, C y D) a los que consideramos notas del canto (figura 1). A partir de esta matriz clasificamos los individuos o las localidades que integran éstos en conglomerados jerárquicos guardando la matriz de distancias euclídeas que compararemos con la matriz de distancias genéticas (figuras 3 y 4) mediante grafos y regresiones lineales.

Las localidades en las que se muestreó el canto y se procesó material genético fueron (figura 2): Aguas Tuertas (42°49' N/0°35' W) 4 especímenes (2 hembras), Canal Roya - Anayet (42°46' N/0°26' W) 4 especímenes (2 hembras), Respomuso (42°49' N/0°17' W) 4 especímenes (1 hembra) y Barranco de Ordiso (42°43' N/0°9' W) 6 especímenes (4 hembras). Nuestro equipo realizó, con este y otro material, un estudio exclusivamente genético (2002.- Veith).

Resultados obtenidos

Hemos diferenciado cuatro notas que se repiten y componen los cantos de las hembras (figura 1), con una Lambda de Wilks de 0,043 (sig. 0,000). Hemos calculado con ellas las distancias de canto y genéticas (figura 3) entre cuatro poblaciones de localidades situadas en longitudes diferentes y latitudes y distancias en línea recta similares (figura 2).

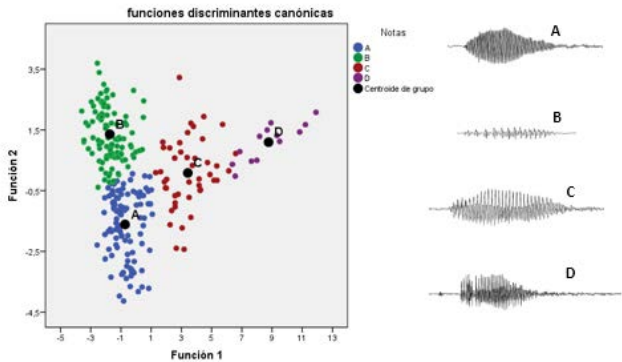
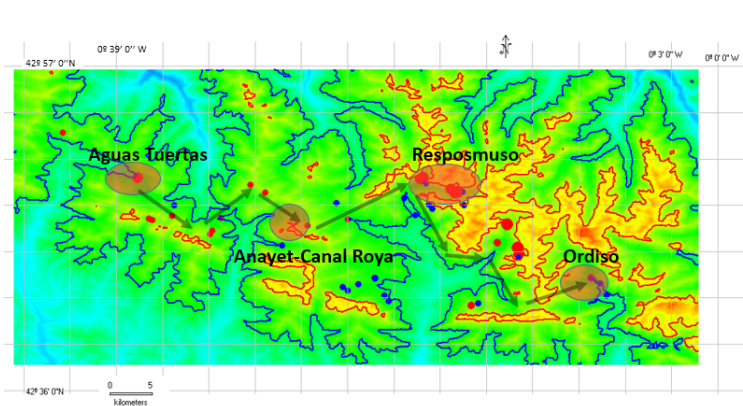


Figura 1.- Clasificación de los datos obtenidos del canto inducido en ejemplares de *Rana temporaria* hembras del Alto Aragón occidental e imagen de la amplitud de las notas correspondientes a los centroides de grupo.



F
inal
ment
e al
com
par
am-
bas
ma-
tri-
ces
de
dis-

tancias hemos obtenido una regresión lineal (figura 4) con valores de: R cuadrado = 0.936 y sig.=0,002.

Figura 2.- Mapa de altitudes del Alto Aragón occidental y la vertiente francesa (al norte) en el que se indican con cirulos los lagos muestreados: en los círculos rojos se confirmó la presencia de ranas. Se rotulan las cuatro localidades en las que se muestreó el canto y se obtuvo material para el posterior análisis genético. En azul se representan las cotas de 1.600 m de altitud y en rojo las de 2.400 m definiendo ambas el hábitat de la *Rana temporaria* en el Pirineo occidental (2003,Vences et al.). Con flechas negras especulamos las posibles comunicaciones entre las poblaciones de ranas estudiadas (ver figura 3).

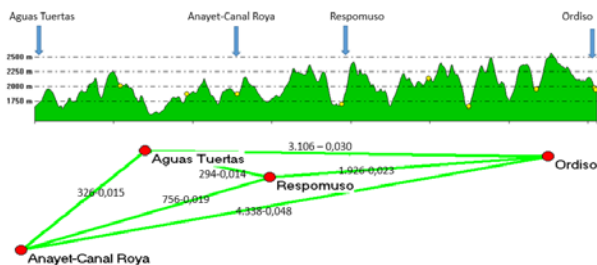


Figura 3.- Perfil de las posibles comunicaciones entre las poblaciones de ranas estudiadas (ver figura 2). Grafo en el que están indicadas sobre los vectores los valores de las distancias considerando el canto (primer término) y las distancias genéticas (segundo término).

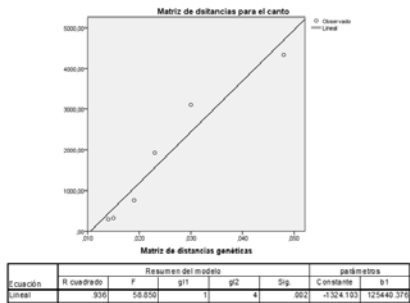


Figura 4.- Gráfico con la línea de regresión calculada con los valores de la matriz de distancias del canto y la matriz de distancias genéticas. Se adjunta tabla de estadísticos.

Conclusiones

Los cantos inducidos en las hembras de *Rana temporaria* del Alto Aragón occidental caracterizan las poblaciones de estos anfibios de la misma forma que lo hacen los análisis genéticos. Una relación entre grupos filogenéticos y grupos bioacústicos ha sido confirmada en *Pleurodema thaul* (anfibio de Chile) por Nelson et al. (2013). Las distancias entre cantos nos indican las distancias reales que tendrían que recorrer las ranas de una población (Respomuso por ejemplo) para ponerse en contacto con otra (Ordiso) y esta característica puede definirnos las barreras geográficas naturales y artificiales o las barreras ecológicas que pueden aislar excesivamente a núcleos enteros de ranas y llevarlos a la posible extinción. Con este método no invasivo, económico y rápido podemos ayudar a entender y, seguramente, arbitrar soluciones para parar el descenso progresivo de la abundancia de éste anfibio.

Bibliografía citada

1993.- Hebert, P. D. N. & Beaton, M. J.,: Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis. Helena Laboratories, Beaumont.

1997.-Sigismund, H. R.,- GSTAT, version 3. München.

1972.- Nei, M., .- Genetic distance between populations. *Amer. Nat.*, 106: 283–292.

2002.- Veith, M., Vences, M., Vieites, D. R., Nieto-Roman, S. and Palanca Soler, A.- Genetic differentiation and population structure within Spanish common frogs (*Rana temporaria* complex; Ranidae, Amphibia). *Folia Zoologica*. 51(4): 307-318.

2003.- Vences, M., Kurt Grossenbacher; Marta Puente; Antonio Palanca-Soler y Vieites, D.R..- The Cambalès fairy tale: elevational limits of an other amphibians in western Europe revisited. *Folia Zoologica* 52(2); 189-2002.

2003 – 2007.- Gridi-Papp, M (ed.). SoundRuler: Acoustic Analysis for Research and Teaching. <http://soundruler.sourceforge.net>.

2013.- Nelson A. Velásquez, Jesus Marambio, Enzo Brunetti, Marco A. Méndez, Rodrigo A. Vásquez and Mario Penna.- Bioacoustic and genetic divergence in a frog with a wide geographical distribution. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2013, 110, 142–155.